



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



**Universidad de la República**

**Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas**

**Área Biología - Subárea Biología Celular y Molecular**

**Tesis de Maestría**

***ESTUDIO DE CAUSA Y PATOGENIA EN UN  
TIPO DE AZOOSPERMIA NO OBSTRUCTIVA  
HUMANA EMPLEANDO  
RATONES CON GENOMA EDITADO***

**Omar Ignacio García Martínez**

**Directora de tesis:** Rosana Rodríguez Casuriaga

**Co-directora de tesis:** Adriana Geisinger Wschebor

**LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA  
REPRODUCCIÓN, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
MOLECULAR, IIBCE**

**2024**

## DEDICATORIA

*A mi madre Mabel y mi padre Omar, por ayudarme y apoyarme incondicionalmente durante el desarrollo de este trabajo. Gracias por darme la oportunidad de llevar a cabo este sueño, sin ustedes nada de esto sería posible.*

*“La investigación científica original comienza en el preciso momento en que la sabiduría nos deja en la ignorancia”*

*Clemente Estable*

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Rosana Rodríguez Casuriaga, por aceptarme como su estudiante y permitirme llevar a cabo algo que siempre pensé inalcanzable. Por su apoyo, sus enseñanzas, y la enorme contribución a mi formación.

A mi co-tutora Adriana, por la oportunidad de llevar a cabo este proyecto, el apoyo, los consejos, la dedicación y su infaltable enseñanza.

A todos los integrantes del grupo de Biología Molecular del IIBCE por compartir muchos días de largos experimentos, por siempre estar con una respuesta a cualquier pregunta, aportando siempre algo para ayudar y dando ánimos.

A Federico Santiñaque, por su gran ayuda en todos los procesos de citometría, la buena onda y su disposición.

Al Dr. Ricardo Benavente por sus valiosas contribuciones y aportes.

A los integrantes de la UBAL del Instituto Pasteur de Montevideo, por su colaboración en este trabajo.

A los miembros del tribunal, Dr. Alejo Menchaca, Dra. Alejandra Kun y Dra. Rebeca Chávez por formar parte de esta última etapa.

Al PEDECIBA, por hacer posible la realización de esta tesis y apoyar mediante las alcuotas de estudiante (Ignacio García) e Investigadora (Rosana Rodríguez-Casuriaga).

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por brindarme apoyo económico con una beca de posgrado durante la realización de este trabajo (POS\_NAC\_2021\_1\_169992), y la financiación de la primera etapa de este trabajo (ANII\_FCE\_3\_2016\_1\_126285).

A la CSIC, por el proyecto Grupos I+D que también financió parte de este trabajo.

Al Departamento de Biología Molecular y el Laboratorio de Biología Molecular de la Reproducción del IIBCE donde se llevaron a cabo los experimentos realizados en este trabajo.

Finalmente, a todas las personas que ayudaron en la realización de este trabajo.  
Muchas Gracias.

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
PALABRAS CLAVE.....	2
ABREVIATURAS .....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Infertilidad .....	4
Infertilidad Masculina .....	4
Azoospermia .....	6
Gametogénesis masculina.....	7
Tipos celulares del testículo.....	8
Formación de la línea germinal masculina.....	9
Fases de la espermatogénesis .....	11
<b>Meiosis.....</b>	<b>15</b>
Meiosis I .....	16
Meiosis II .....	20
<b>El complejo sinaptonémico y su estructura molecular.....</b>	<b>20</b>
Elementos Laterales.....	23
Filamentos Transversos.....	24
Elemento Central.....	25
<b>Influencia de las mutaciones en componentes del complejo sinaptonémico: ratones <i>knock-out</i> e infertilidad humana. ....</b>	<b>27</b>
<b>Mutaciones asociadas a los componentes del elemento lateral del complejo sinaptonémico.....</b>	<b>28</b>
Mutaciones asociadas a filamentos transversos .....	30
Mutaciones asociadas al elemento central.....	31
<b>Modelos murinos generados mediante la tecnología CRISPR (“<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>”)).....</b>	<b>35</b>
JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES DIRECTOS .....	37
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	38
Hipótesis.....	38
Objetivos .....	38
Objetivo general .....	38



Objetivos específicos .....	38
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>40</b>
<b>Animales y aprobación ética .....</b>	<b>40</b>
<b>Diseño de moléculas para mutagénesis.....</b>	<b>40</b>
<b>Manipulación de ratones para la edición del genoma.....</b>	<b>41</b>
<b>Genotipado de ratones: amplificación por PCR estándar, purificación de bandas, secuenciación y análisis mediante enzimas de restricción. ....</b>	<b>42</b>
<b>Ensayos de fertilidad.....</b>	<b>46</b>
<b>Análisis Histológico .....</b>	<b>46</b>
Inclusión en resina epóxica .....	46
Cortes Semifinos .....	47
<b>Análisis por citometría de flujo (CMF) .....</b>	<b>47</b>
Suspensión de células testiculares .....	47
Análisis citométricos.....	49
Anticuerpos .....	49
Preparación de criosecciones .....	51
Preparación de esparcidos (" <i>spreading</i> ") .....	52
Incubación con anticuerpos sobre <i>spreading</i> .....	52
Incubación con anticuerpos sobre criosecciones.....	53
Microscopía confocal de fluorescencia: cuantificación y análisis de imágenes	54
<b>Ensayo de TUNEL ("Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling").....</b>	<b>57</b>
<b>Electroforesis de proteínas y Western-blot.....</b>	<b>57</b>
<b>Ensayos de RT-qPCR .....</b>	<b>58</b>
<b>Análisis estadísticos .....</b>	<b>59</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
<b>Desarrollo de un modelo murino humanizado para la mutación SYCE1 c.197-2A&gt;G.....</b>	<b>61</b>
<b>Individuos homocigotas, heterocigotas y WT fueron genotipados e identificados por secuenciación y ensayos con enzimas de restricción. ....</b>	<b>63</b>
<b>Los mutantes homocigotas presentan fenotipo infértil .....</b>	<b>67</b>
<b>Los machos mutantes homocigotas para la mutación Syce1 c.203-2 A&gt;G presentan un desarrollo testicular anómalo. ....</b>	<b>68</b>
<b>La mutación Syce1 c.203-2 A&gt;G en homocigosis genera un fenotipo testicular anómalo a nivel histológico.....</b>	<b>70</b>

<b>Los mutantes homocigotas carecen de células posmeióticas en sus testículos.....</b>	<b>74</b>
<b>La mutación <i>Syce1</i> c.203-2A&gt;G desencadenaría muerte celular programada.....</b>	<b>75</b>
La caspasa 3 activada se encuentra translocada al núcleo en mayor proporción en los espermatoцитos de individuos mutantes homocigotas.....	75
<b>Los testículos de individuos mutantes homocigotas presentan mayor proporción de células positivas a reacción de TUNEL.....</b>	<b>76</b>
La persistencia de rupturas de doble hebra sobre la cromatina de los espermatoцитos confirma la detención temprana en profase meiótica.....	78
<b>La mutación <i>Syce1</i> c.203-2A&gt;G determina diferencias en la estructura del CS al ser analizada por medio de microscopía láser confocal.....</b>	<b>80</b>
SYCP3 se encuentra cargada en el CS de los ratones homocigotas mutantes, pero no se logra una sinapsis cromosómica .....	81
<i>SYCE1</i> no se encuentra cargada en el CS en formación de los ratones homocigotas mutantes. ....	82
SYCP1 se encuentra cargada en el CS en formación de los ratones homocigotas mutantes, pero presenta una intensidad y un patrón de unión diferentes.....	83
SYCE3 se encuentra cargada al CS en formación en los mutantes homocigotas, pero presenta una marca diferente. ....	86
TEX12 no se detecta sobre el CS en formación de los mutantes homocigotas. ....	88
SIX6OS1 no se detecta sobre los CSs en formación de los mutantes homocigotas.....	89
En los espermatoцитos de los mutantes homocigotas, los cromosomas sexuales no se alinean.....	90
<b>En los testículos de los ratones mutantes homocigotas no se detecta producto del gen <i>Syce1</i> .....</b>	<b>91</b>
En los testículos de los ratones mutantes homocigotas para la mutación <i>Syce1</i> c.203-2A>G no se detecta la proteína trunca predicha. ....	91
Existen diferencias significativas en los niveles del ARNm de <i>Syce1</i> en los ratones homocigotas mutantes, con respecto a los de los ratones WT y heterocigotas.....	93
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>95</b>
<b>Algunas consideraciones sobre el abordaje empleado y las mejoras introducidas .....</b>	<b>95</b>
<b>Los ratones mutantes <i>KI Syce1</i> c.203-2A&gt;G reproducen el fenotipo de los pacientes infértiles. ....</b>	<b>97</b>

La mutación <i>Syce1</i> c.203-2A>G produce interrupción de la meiosis, y muerte celular programada.....	98
La mutación <i>Syce1</i> c.203 -2A>G acarrea problemas en el correcto ensamblaje del CS. ....	100
En las células meióticas de los individuos mutantes homocigotas no se forma el cuerpo XY .....	104
Sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la infertilidad .....	105
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>109</b>
<b>PERSPECTIVAS Y OTROS RESULTADOS PRELIMINARES</b> ...	<b>112</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>117</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>139</b>

## RESUMEN

La infertilidad es un problema que afecta a una considerable proporción de parejas en edad reproductiva, con una incidencia del 10-15%. Tanto los trastornos masculinos como los femeninos contribuyen a esta condición, y aproximadamente el 25% de los casos se clasifican como infertilidad idiopática debido a que su causa aún no ha sido identificada. En muchos casos, los errores durante la etapa meiótica parecen estar relacionados con la infertilidad idiopática tanto en hombres como en mujeres.

Un componente crucial durante la profase I meiótica es el complejo sinaptonémico (CS), una estructura proteica en forma de escalera que se forma entre los cromosomas homólogos. El CS desempeña un papel fundamental en el apareamiento de los cromosomas homólogos, y facilita la recombinación meiótica.

En estudios con pacientes infértiles se han identificado mutaciones en genes que codifican componentes del CS, lo que ha llevado a la hipótesis de que estas mutaciones podrían ser responsables del fenotipo infértil observado en estos individuos.

Utilizando la tecnología CRISPR/Cas9, hemos generado líneas de ratones modificados genéticamente que portan mutaciones equivalentes a las encontradas en pacientes infértiles, específicamente en el gen *Syce1*, codificante de un componente de elemento central del CS. Estos modelos murinos humanizados han sido cruciales para establecer una conexión entre casos de infertilidad humana y mutaciones específicas en el CS. En el desarrollo de esta tesis, se caracterizó una línea murina conteniendo una mutación que afecta el sitio aceptor de *splicing* del intrón 3-4 del gen *Syce1*, equivalente a una asociada a casos de azoospermia no obstructiva en humanos.

Entre los resultados más relevantes con respecto a la posible relación causal entre la mutación en estudio y el fenotipo infértil, los ratones homocigotos para la mutación no pudieron tener descendencia en los ensayos de fertilidad realizados. Asimismo, se encontraron diferencias significativas en el tamaño y contenido celular de las gónadas en comparación con las de los ratones heterocigotos y los ratones control. El análisis histológico reveló cambios evidentes en la morfometría de los túbulos seminíferos, y un epitelio seminífero

con espermatogénesis incompleta, con ausencia de células en fase posmeiótica (espermiogénesis). El análisis mediante citometría de flujo confirmó la ausencia de poblaciones celulares posmeióticas con contenido de ADN=C en los mutantes homocigotos. Estos resultados permitieron demostrar que la sola presencia bialélica de la mutación en el genoma del ratón, es suficiente para provocar azoospermia no obstructiva.

Con relación a los mecanismos que subyacen la enfermedad, los ensayos de inmunofluorescencia de los componentes del CS en los testículos adultos de los ratones mutantes homocigotos revelaron defectos meióticos, alteraciones en la sinapsis cromosómica y en el ensamblaje del CS. No se detectó en estos mutantes la presencia de proteína SYCE1 ni de otras proteínas que normalmente se cargan en el CS luego de la incorporación de SYCE1. Además, la cuantificación de los niveles de transcripción del gen *Syce1* en los testículos adultos mostró niveles significativamente menores en los ratones mutantes homocigotos que en los *wild type* (WT) y niveles intermedios en los ratones heterocigotos, lo que sugiere la degradación de los transcritos anómalos de *Syce1*.

En conclusión, estos resultados respaldan de manera sólida el papel causal de esta mutación en la azoospermia no obstructiva en pacientes masculinos, y sugieren que los mecanismos involucrados están relacionados con defectos en la sinapsis cromosómica resultantes de la ausencia de SYCE1.

## **PALABRAS CLAVE**

infertilidad, meiosis, complejo sinaptonémico, SYCE1.

## **KEY WORDS**

infertility, meiosis, synaptonemal complex, SYCE1.

## ABREVIATURAS

aa: aminoácidos

CMF: citometría de flujo

CS: Complejo Sinaptonémico

D: Diploteno

dpp: días posparto

DSB: Rotura de doble hebra ("*double strand break*")

EC: Elemento Central

EL: Elemento Lateral

HDR: Reparación dirigida por homología ("*homology-directed repair*")

L: Leptoteno

NHEJ: Unión de extremos no homólogos ("*non-homologous end joining*")

NMD: degradación de transcritos con codones de terminación prematuros ("*nonsense mediated decay*")

NOA: Azoospermia no obstructiva ("*non-obstructive azoospermia*")

OA: Azoospermia obstructiva ("*obstructive azoospermia*")

P: Paquiteno

PAM: Motivo Adyacente *Protospacer*

PGCs: Células germinales primordiales ("*primordial germ cells*")

POF: Insuficiencia ovárica prematura ("*premature ovarian failure*")

PTC: Codón de terminación prematura ("*premature termination codon*")

RC: Región Central

SSC: Células madre espermatogónicas ("*spermatogonial stem cells*")

ssODN: Oligonucleótidos de Cadena Sencilla ("*single strand oligonucleotides*")

Z: Zigoteno

## INTRODUCCIÓN

### Infertilidad

Se conoce a la fertilidad como la capacidad de lograr un embarazo clínico (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). Sin embargo, y de acuerdo con el glosario internacional más reciente sobre infertilidad y cuidado de la fertilidad, describiremos infertilidad como una condición médica caracterizada por la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses de relaciones sexuales regulares y sin protección, o debido a una capacidad reducida de reproducirse, ya sea de uno de los individuos, o de la pareja (Vander Borght *et al.*, 2018). Según la última definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la infertilidad se considera una enfermedad que genera una incapacidad debido al deterioro de una función (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017).

La infertilidad representa una preocupación a nivel mundial, afectando aproximadamente al 15% de las parejas (Agarwal *et al.*, 2015). Más de 186 millones de personas presentan casos de infertilidad, siendo una gran mayoría residentes de países en desarrollo (Inhorn *et al.*, 2015).

Aunque la infertilidad a menudo se clasifica como idiopática (es decir, de causa desconocida), existe una creciente evidencia que señala a los defectos genéticos como la causa subyacente en muchos casos (Bolor *et al.*, 2009; McLachlan *et al.*, 2010; O'Flynn *et al.*, 2010; Reijo *et al.*, 1995; Vicdan *et al.*, 2004; von Wettstein *et al.*, 1984). Dado que hay una amplia variedad de genes involucrados en la compleja regulación de la fertilidad humana, existe la posibilidad de que una multitud de errores genéticos diferentes puedan afectar la función reproductiva (Hann *et al.*, 2011). En particular, errores genéticos alojados en genes específicos de la meiosis deben ser considerados como factores que aportan a causas de infertilidad.

### Infertilidad Masculina

La causa de la infertilidad recae únicamente en el hombre en un 20-30% de los casos; sumado a esto, los hombres tienen injerencia en otro 20%, por lo cual las causas de infertilidad masculina tienen un aporte de entre 40-50% de los casos totales de infertilidad (Agarwal *et al.*, 2021).

Con el creciente reconocimiento de la importancia de este problema y su impacto en la salud mental y el bienestar de los hombres en todo el mundo, en

los últimos años ha surgido un gran interés en investigar y comprender las causas de la infertilidad masculina (Bardhi *et al.*, 2021).

Debido a la significativa contribución de los factores masculinos a la infertilidad en las parejas, así como a los altos niveles de factores desconocidos asociados a la infertilidad masculina, la falta de comprensión de los mecanismos subyacentes se presenta como uno de los desafíos más relevantes en este campo. Para abordar adecuadamente el problema, es fundamental investigar y comprender en profundidad los procesos biológicos y los factores que contribuyen a esta condición. A través de una mayor comprensión de los mecanismos subyacentes, se podrían desarrollar estrategias más efectivas para el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de la infertilidad masculina, lo que tendría un impacto significativo en la salud reproductiva de las parejas afectadas (Bardhi *et al.*, 2021).

El diagnóstico de infertilidad en hombres se basa principalmente en el análisis del semen (Babakhanzadeh *et al.*, 2020). Entre las diversas razones conocidas que contribuyen a la infertilidad masculina, las más importantes son los déficits hormonales, causas físicas, problemas relacionados con la calidad del semen, influencia del entorno y estilo de vida, así como factores genéticos (Krausz *et al.*, 2018; Winters 2014). Estos factores pueden interactuar de diversas maneras y afectar la capacidad reproductiva masculina. Sin embargo, aproximadamente el 40% de los hombres infértiles no presentan una causa clara identificable (infertilidad masculina idiopática). Para un abordaje integral de la infertilidad masculina, es fundamental considerar y evaluar cada una de estas posibles causas, lo que permitirá un diagnóstico más preciso y estrategias de tratamiento personalizadas (Babakhanzadeh *et al.*, 2020).

En aproximadamente el 15% de los casos de infertilidad masculina se han identificado factores genéticos como contribuyentes importantes. Estos factores genéticos se pueden clasificar en dos grupos principales: anomalías cromosómicas y mutaciones en un solo gen (Güney *et al.*, 2012; Stouffs, 2014). Las anomalías cromosómicas pueden involucrar cambios estructurales o numéricos en los cromosomas, como la presencia de cromosomas sexuales anormales o deleciones y duplicaciones cromosómicas. Por otro lado, las mutaciones de un solo gen implican alteraciones en la secuencia de ADN de un



gen específico, lo que puede afectar su función y tener un impacto negativo en la fertilidad masculina (Babakhanzadeh *et al.*, 2020).

### Azoospermia

La azoospermia, que se caracteriza por la ausencia completa de espermatozoides en la eyaculación, es un factor importante en la infertilidad masculina. La azoospermia se divide en dos categorías principales: azoospermia obstructiva (OA, por su nombre en inglés, “*Obstructive Azoospermia*”), que representa aproximadamente el 40% de los casos, y azoospermia no obstructiva (NOA, por “*Non-Obstructive Azoospermia*”), que comprende el otro 60% (Wu *et al.*, 2021). La OA consiste en la ausencia de espermatozoides en el eyaculado por una obstrucción en las vías de salida, si bien en el testículo los mismos se producen. En el caso de la NOA, la causa radica en la incapacidad de los testículos para producir espermatozoides. La NOA se clasifica clínicamente en cuatro tipos: NOA-I, donde no se encuentran espermatozoides; NOA-II, donde no se encuentran espermátidas; NOA-III, donde no se encuentran espermatoцитos; y NOA-SCO (sólo células de Sertoli), donde no se encuentran células espermátogénicas de ningún tipo (Han *et al.*, 2020). Esta clasificación es importante para el diagnóstico y la comprensión de la infertilidad masculina relacionada con la azoospermia, lo que permite una planificación de tratamiento más precisa y personalizada.

La etiología de la NOA es compleja, y puede dividirse en insuficiencia testicular primaria y secundaria. La insuficiencia testicular primaria se refiere a la patología que se encuentra directamente en el testículo, e incluye anomalías cromosómicas/genéticas, el síndrome de Klinefelter, tumores testiculares, testículos no descendidos y otras condiciones. Por otro lado, la insuficiencia testicular secundaria es causada por una secreción anormal de gonadotropinas por parte de la glándula pituitaria, lo cual contribuye a una estimulación insuficiente de las células de Leydig y las células de Sertoli en el testículo, afectando así la espermatogénesis (Wu *et al.*, 2021). Comprender la etiología subyacente a la NOA es fundamental para el diagnóstico y tratamiento adecuados de la infertilidad masculina, permitiendo un enfoque más específico y personalizado para cada paciente.

Como hemos mencionado, la NOA a menudo está asociada con mutaciones genéticas. Sin embargo, debido a la complejidad de la espermatogénesis humana, resulta difícil determinar el componente genético exacto de la infertilidad masculina, ya que se ha identificado la participación de más de 2.000 genes en este proceso (Kumari *et al.*, 2015).

Además de la azoospermia, existen otros tipos de alteraciones en los espermatozoides, ya sea afectando el número, morfología o motilidad de los mismos. En particular, los términos oligozoospermia y criptoospermia refieren a una baja concentración de espermatozoides en el eyaculado, respecto del valor de referencia considerado normal por la OMS. Un varón presenta oligozoospermia cuando tiene menos de 15 millones de espermatozoides por mL de eyaculado. En cambio, el diagnóstico es criptoospermia cuando el valor de la concentración espermática en el eyaculado es inferior a 100.000 espermatozoides por mL (Cascales *et al.*, 2015; McLachlan, 2012).

Considerando la importancia de la correcta generación de los gametos, y su alteración en los procesos de infertilidad masculina, es necesario detenerse a continuación en los mecanismos que conducen a la producción de gametos viables.

### Gametogénesis masculina

La gametogénesis es un fenómeno biológico fundamental que implica la producción de células reproductoras, o gametos, a partir de las células germinales.

En el curso de la gametogénesis, se lleva a cabo un tipo especial de división celular que implica una única duplicación del ADN seguida de dos divisiones consecutivas, tanto cromosómicas como citoplasmáticas, conocidas como meiosis I y meiosis II, respectivamente (Boitani *et al.*, 2016). A través de este proceso, ocurre una reducción en el material genético, pasando de ser diploide ( $2n$ ) a haploide ( $n$ ), en las células que están destinadas a la reproducción sexual. Este mecanismo es crucial para mantener la estabilidad del número de cromosomas en las especies.

Además de la función reductora de la meiosis, este proceso también es responsable de introducir variabilidad genética a través de la recombinación y la segregación de los cromosomas homólogos. Estos mecanismos desempeñan

un papel fundamental en la transmisión de una dotación genética única y específica a la descendencia, y todos ellos se llevan a cabo bajo un estricto control que previene la aparición de alteraciones que podrían afectar el desarrollo del futuro individuo (Hernández López, 2021).

En los individuos de sexo masculino, el proceso específico mediante el cual se generan los espermatozoides se conoce como espermatogénesis, y se caracteriza por la producción de espermatozoides. Durante la espermatogénesis, las células germinales masculinas se dividen y diferencian en espermatozoides maduros, células reproductivas masculinas especializadas capaces de fertilizar el óvulo durante la reproducción sexual. La espermatogénesis es un proceso complejo que se lleva a cabo en los testículos, dentro de los túbulos seminíferos, y su correcto funcionamiento es esencial para la fertilidad masculina y la perpetuación de la especie. (Hernández López, 2021)

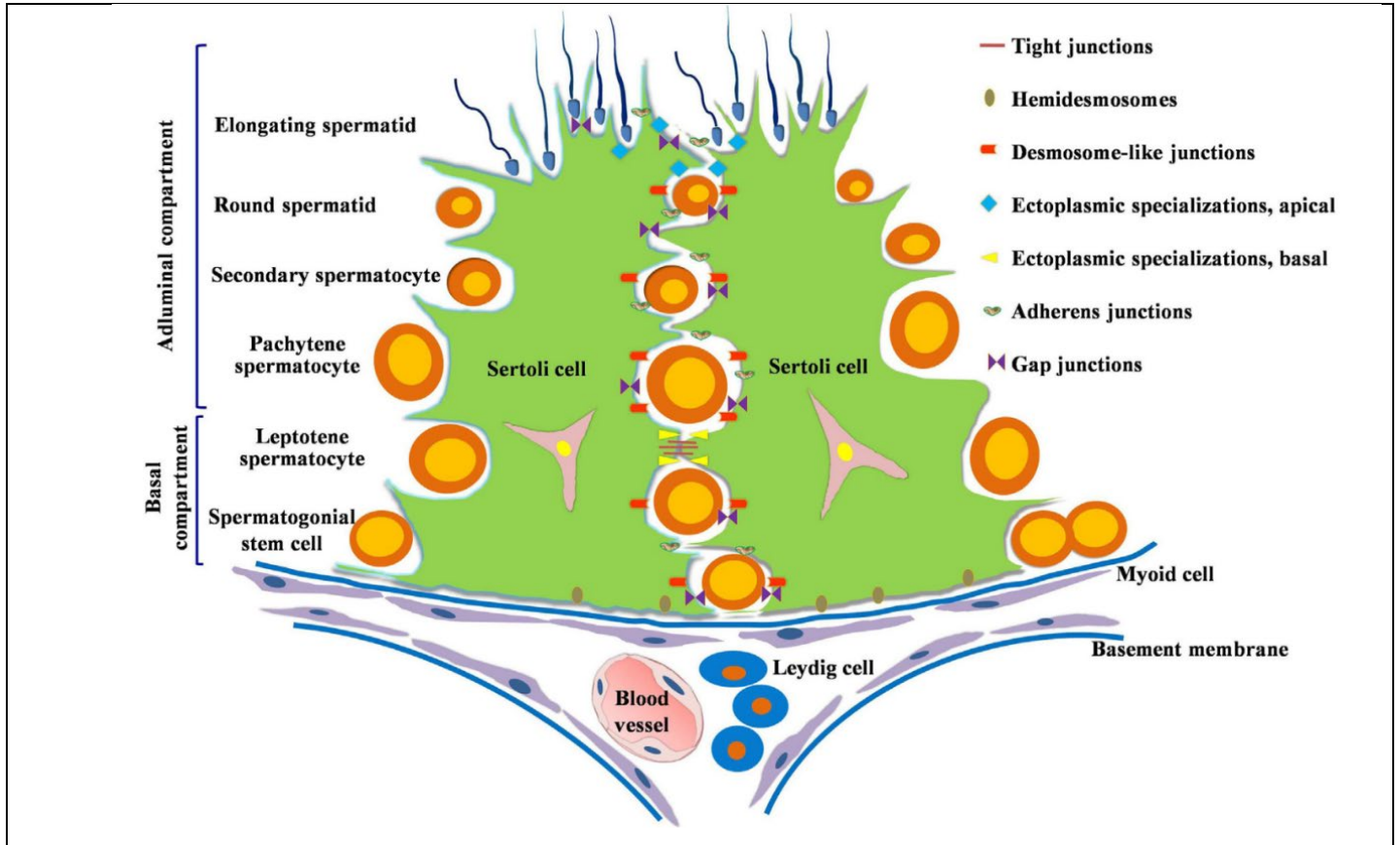
La espermatogénesis abarca numerosos eventos especializados de diferenciación, junto con cambios epigenéticos, cromosómicos y morfológicos (Kasak *et al.*, 2021; Veitia, 2020).

#### Tipos celulares del testículo

En los túbulos seminíferos de los mamíferos adultos, se encuentran presentes diversos tipos de que pertenecen tanto a la línea germinal como a las células somáticas. En la línea germinal, se pueden observar diferentes tipos de espermatogonias (De Rooij, 2001), meiocitos primarios en diferentes etapas de la primera profase meiótica, meiocitos secundarios, espermátidas redondas, espermátidas en diferentes fases de elongación, espermátidas elongadas y espermatozoides. Además, los túbulos seminíferos contienen células somáticas, las células de Sertoli, siendo éstas las células de sostén de la línea germinal.

Además de las células germinales y de Sertoli, los túbulos seminíferos están rodeados por células mioideas peritubulares y se encuentran inmersos en un estroma que contiene células de Leydig, productoras de testosterona, así como vasos capilares y linfáticos, que a su vez contienen macrófagos, fibroblastos, mastocitos, linfocitos, eritrocitos, entre otros tipos celulares (Clermont *et al.*, 1953; 1957; 1960). Dichas poblaciones celulares se disponen tal como se puede observar en el esquema presentado en la Figura 1.

Al observar los túbulos seminíferos, se pueden apreciar estas diversas células que se encuentran en diferentes estadios espermatoogénicos y que forman asociaciones celulares, cuya secuencia ordenada constituye un ciclo del epitelio seminífero (Leblond y Clermont, 1952).



**Figura 1. Diagrama de la estructura del túbulo seminífero.**

Esquema que corresponde a la estructura de los túbulos seminíferos. Se pueden apreciar las células de Sertoli, varios tipos de células germinales masculinas tales como los diferentes tipos de espermátocitos y espermátidas. Las células de Sertoli se encuentran a lo largo de la membrana basal de los túbulos seminíferos. Alrededor de la membrana basal se encuentran las células mioideas peritubulares, y entre los túbulos seminíferos vecinos, se pueden encontrar las células de Leydig ubicadas en el intersticio. Se muestran además los distintos tipos de uniones entre células de Sertoli y la división del túbulo en dos compartimentos (basal y adluminal). Extraído de Hai *et al.*, 2014.

### Formación de la línea germinal masculina

La población de células madre espermatoogoniales (SSCs) desempeña un papel crucial en la espermatogénesis, ya que debe ser capaz de autorrenovarse para mantener la reserva de células madre y, al mismo tiempo, generar células progenitoras que continúen a través del proceso de espermatogénesis para formar los espermatozoides. La determinación y el destino de estas SSCs están

influenciados por complejas interacciones entre las células germinales, las células somáticas del tejido testicular y diversos factores de crecimiento. (Griswold, 2016).

Es importante destacar que el funcionamiento adecuado de la población de SSCs es fundamental para el éxito de la espermatogénesis. Si hay una disfunción en la capacidad de autorrenovación de las SSCs o en la generación de células progenitoras, esto finalmente resultará en el fracaso de la espermatogénesis (Griswold, 2016).

Durante el desarrollo embrionario de los ratones, la formación de las líneas celulares germinales y somáticas en el testículo ocurre de manera independiente. Inicialmente, la gónada bipotencial se forma como un engrosamiento en el lado ventral del mesonefros alrededor del día embrionario E10. Durante los dos días siguientes, estas gónadas adquieren su especificidad sexual, principalmente debido a la expresión del gen *Sry* en las células que se convertirán en células de Sertoli del testículo (Griswold, 2016).

Las células germinales primordiales (PGCs) aparecen por primera vez en el epiblasto alrededor del día embrionario E6 y luego migran hacia la cresta gonadal en desarrollo alrededor del día E11.0, mediante una combinación de migración celular pasiva y activa (McLaren, 1998). Una vez que las PGC interactúan con las células de Sertoli embrionarias, así como con las células mioides y las células de Leydig en el día E12.5, se completa la determinación sexual y se forma el testículo embrionario (Cool *et al.*, 2009; 2012). En este punto, las PGC se encuentran con las células de Sertoli y juntas forman los cordones seminíferos, que posteriormente darán lugar a los túbulos seminíferos. Dentro de los cordones seminíferos, las PGC pasan por un período de proliferación mitótica y comienzan a llamarse gonocitos (Matzuk *et al.*, 2008) Inicialmente, los gonocitos se encuentran en el centro de los cordones seminíferos, pero posteriormente migran hacia la periferia, donde ocurren varias transiciones importantes que dan lugar a la aparición de las espermatogonias (células germinales morfológicamente distintas) en los primeros días después del nacimiento. Algunos de los gonocitos ubicados en el nicho de células madre comienzan a funcionar como SSCs (Oatley *et al.*, 2012)

En los ratones, la primera ronda de espermatogénesis se refiere al proceso mediante el cual una cohorte inicial de células germinales progresa hacia la formación de espermatozoides. Durante esta etapa, las espermatogonias derivan de un grupo específico de gonocitos que carecen de la expresión de neurogenina 3 (NGN3), y estas células hacen una transición directa hacia el estado de células A1 (espermatogonias en proceso de diferenciación). Por otro lado, las espermatogonias que expresan NGN3 permanecen indiferenciadas y constituyen el grupo de células progenitoras, incluyendo posiblemente las células madre (Griswold, 2016).

### Fases de la espermatogénesis

La espermatogénesis es un evento continuo a lo largo de la vida reproductiva del individuo. Los espermatozoides, como productos finales, son liberados, a través de la espermiación, hacia la luz de los túbulos seminíferos del testículo, y la siguiente generación de espermatozoides comienza a desarrollarse a partir de las células madre espermatogénicas. Por lo tanto, es crucial que la iniciación de la espermatogénesis y la espermiación estén coordinadas para mantener la producción continua de espermatozoides (Griswold, 2016). Durante este período, las células germinales masculinas pasan por una serie de etapas de desarrollo y maduración antes de convertirse en espermatozoides completamente funcionales.

Aunque el desarrollo desde las espermatogonias A1 hasta el punto de la espermiación en los ratones tarda aproximadamente 35 días, el proceso de inicio ocurre con una alta frecuencia, cada 6 a 8 días (Clermont, 1972). Esto significa que hay una renovación continua de las células germinales, y un flujo constante de nuevas espermatogonias que inician su desarrollo hacia la formación de espermatozoides. Esta rápida y sincronizada producción de gametos es esencial para asegurar una producción de espermatozoides eficiente y continua en el sistema reproductivo masculino.

Dado el proceso altamente complejo de la espermatogénesis y la necesidad de una regulación precisa del mismo, es de esperar que se produzcan cambios significativos a nivel de la expresión génica durante su transcurso, lo que permite la delimitación de este proceso en tres fases diferenciales (revisado por

Rodríguez-Casuriaga, 2011), determinadas por tres grandes ondas de transcripción génica (Geisinger, 2010):

La primera fase corresponde a la proliferación de las espermatogonias, que se inicia a través de divisiones mitóticas. Durante esta fase, se produce una amplificación de las células germinales y se forma una población de espermatogonias que actúan como células madre y células progenitoras.

La segunda fase implica la división meiótica de los espermatocitos. Durante esta etapa, los espermatocitos primarios experimentan dos divisiones meióticas, que dan lugar a la formación de espermatocitos secundarios haploides en la primera, y espermatidas redondas en la segunda. Dado que nuestro trabajo se centró en una proteína meiótica, nos dedicaremos en detalle a la división meiótica en la próxima sección.

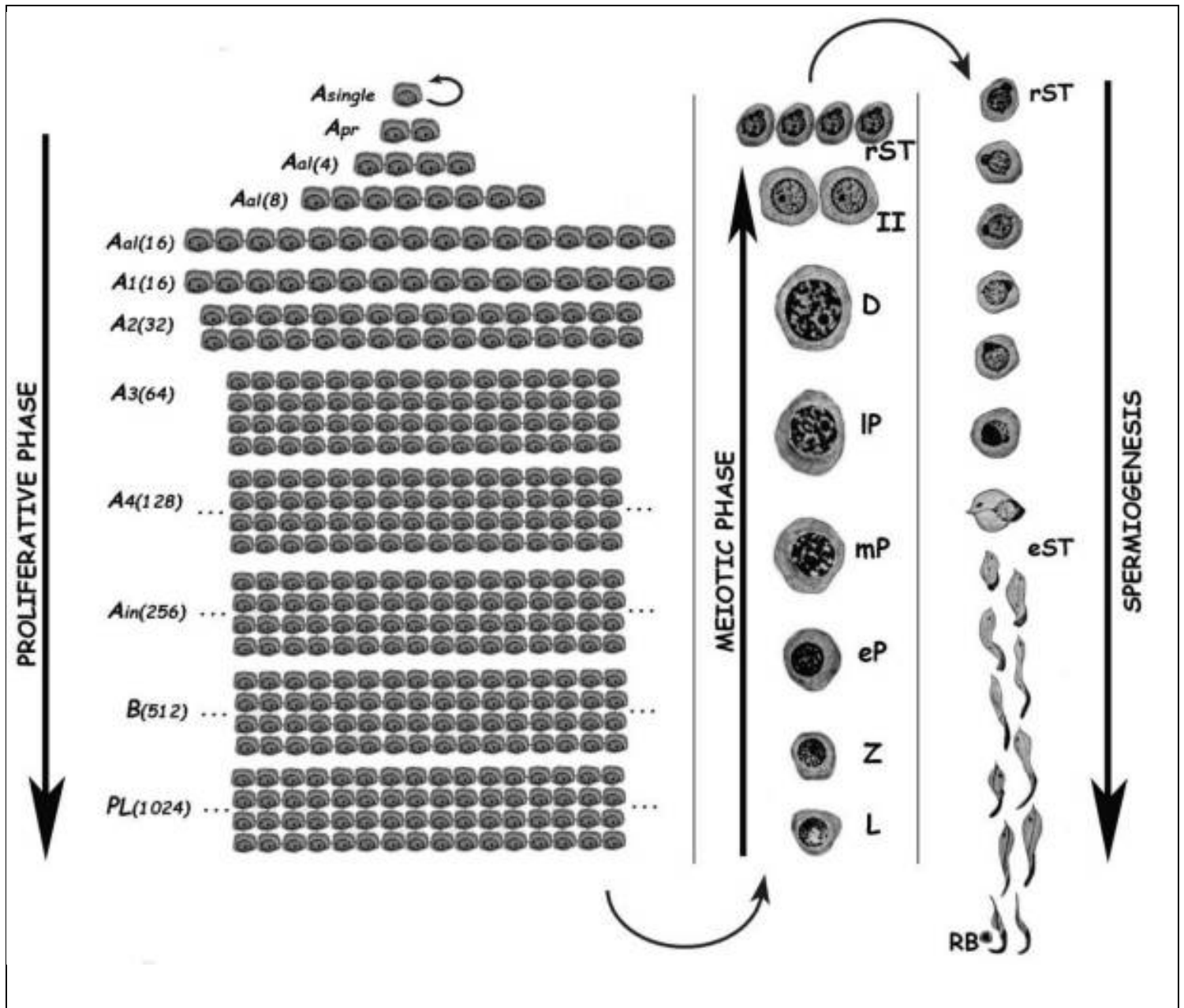
La tercera fase se refiere a la maduración de las células germinales posmeióticas, que conduce a la formación de espermatozoides. Durante esta etapa, las espermatidas redondas, haploides, se diferencian y experimentan una serie de cambios morfológicos y funcionales que dan lugar a la formación de espermatozoides maduros. Esta fase de diferenciación haploide es conocida como espermiogénesis. Durante la misma, las espermatidas experimentan una elongación nuclear, convirtiéndose en espermatidas elongadas. Al mismo tiempo, se desarrolla un flagelo y se forman estructuras especializadas del aparato de Golgi que darán origen al acrosoma, así como las mitocondrias se reúnen y rodean la porción anterior del flagelo (Russell *et al.*, 1990). La espermiogénesis culmina con la eliminación del citoplasma residual y la liberación de los espermatozoides hacia el lumen del túbulo seminífero (Alberts B, 2002).

Durante las divisiones de las espermatogonias, la citocinesis no es completa, lo que resulta en la formación de un sincitio. Las células están conectadas a través de puentes citoplásmicos de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las divisiones sucesivas generan grupos de células interconectadas y, dado que los puentes intercelulares permiten el paso de macromoléculas y otros componentes citoplásmicos, cada cohorte de células madura de manera sincrónica. Estos grupos celulares están rodeados por prolongaciones citoplásmicas de las células de Sertoli, formando un microambiente propicio para el desarrollo de las células

germinales (Revisado por Geisinger, 2003; ver Figura 1). A medida que la espermatogénesis avanza, desde las espermatogonias hasta las espermatidas, las células se desplazan hacia el interior del túbulo seminífero. Como resultado, cada tipo celular se encuentra en una capa específica del túbulo. Las espermatidas ubicadas en el borde de la luz del túbulo pierden las conexiones citoplásmicas, y finalmente se diferencian en espermatozoides maduros (Alberts B, 2002).

El proceso por medio del cual se desarrolla la espermatogénesis en el ratón puede ser apreciado en la Figura 2.

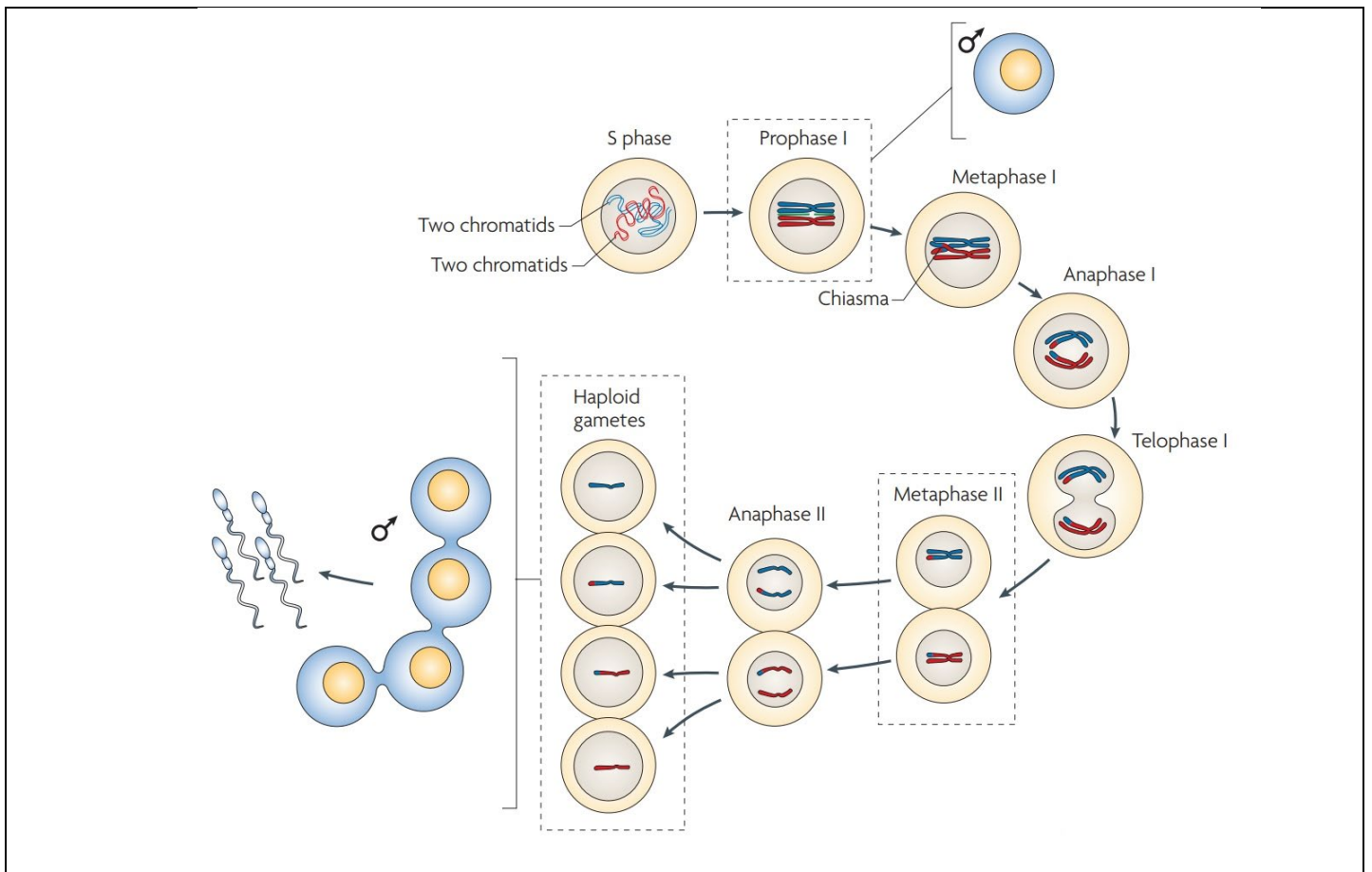




**Figura 2. Esquematización de espermatogénesis en ratones.**

Representación de las diferentes fases de las células germinales en la espermatogénesis de la rata. Se esquematizan las tres fases principales del proceso espermatogénico. *A<sub>single</sub>*, espermatogonio único; *A<sub>pr</sub>*, espermatogonia pareada; *A<sub>al</sub>*, espermatogonia alineada; *A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub>*, espermatogonia tipo A 1-4; *A<sub>in</sub>*, espermatogonia intermedia; *B*, espermatogonia tipo B; *PL*, espermatocitos preleptoténicos; *L*, espermatocito leptoténico; *Z*, espermatocitos zigoténico; *eP*, espermatocito de paquíteno temprano; *mP*, espermatocito de paquíteno medio; *IP*, espermatocito de paquíteno tardío; *D*, espermatocito de diploteno; *II*, espermatocito secundario; *rST*, espermátidas redondas; *eST*, espermátidas en elongación; *RB\**, cuerpo residual. Extraído de Rodríguez-Casuriaga y Geisinger, 2021.

## Meiosis



### Figura 3. Representación esquemática de la meiosis.

Comienza con la replicación del ADN en una fase S premeiótica, lo que resulta en células con un contenido de ADN 4C. Después de la fase S, la profase de la meiosis I es una fase prolongada donde los cromosomas homólogos se aparean y sufren recombinación. Durante la metafase de la meiosis I, los quiasmas mantienen los cromosomas homólogos en una orientación bipolar. Luego en anafase I y telofase I se separan los cromosomas homólogos, lo que conduce a la formación de dos células. Estas son los gametocitos secundarios, que presentan contenido cromosómico haploide, aunque cada cromosoma aún consiste en dos cromátidas. La segunda división meiótica es ecuacional: en las células germinales masculinas, las cromátidas se separan para formar células, cada una con el número haploide de cromosomas 1N y contenido de ADN 1C. Extraído y modificado de Handel y Schimenti, 2010.

Como he mencionado, el requisito previo para la reproducción sexual es la generación de gametos haploides. La haploidización del conjunto de cromosomas evita el duplicado del material genético en cada generación y, por lo tanto, mantiene la estabilidad genética en la descendencia al fusionarse los gametos durante la fertilización. El proceso que genera los gametos haploides a partir de las células diploides precursoras de los gametos, se conoce como meiosis.

Se ha llevado a cabo mucha investigación para comprender los intrincados procesos de la meiosis. Se han identificado y caracterizado una amplia variedad de proteínas que están involucradas en estos procesos. Sin embargo, aún no se comprenden completamente los mecanismos detrás del complejo funcionamiento de la meiosis. No hay duda de la importancia de la misma para los organismos que se reproducen sexualmente (Egel y Penny, 2007 ; Ramesh *et al.*, 2005; Speijer *et al.*, 2015). Interrupciones en este proceso a menudo conllevan graves defectos, que pueden causar aneuploidías, abortos espontáneos e infertilidad.

La meiosis, un proceso de división celular especializado, se encuentra presente en todos los organismos eucariotas que se reproducen sexualmente. Es un evento crucial en la gametogénesis ya que sustenta el éxito reproductivo. Además, se considera un evento determinante en el desarrollo de la línea germinal, y muestra un marcado dimorfismo sexual (Handel *et al.*, 1998; Morelli *et al.*, 2005), en concordancia con las características dimórficas de la gametogénesis en los dos sexos (Bolcun-Filas *et al.*, 2018).

En contraste con la mitosis, la meiosis ocurre exclusivamente en las células de la línea germinal y consta de dos divisiones celulares consecutivas precedidas por una única duplicación del material genético, tal como se puede apreciar en la Figura 3. Luego de una ronda de replicación del ADN, ocurre una primera división celular (meiosis I) de carácter reductor, durante la cual se separan las copias maternas y paternas de los cromosomas, conocidos como cromosomas homólogos, reduciendo su contenido de ADN de 4C a 2C, y su ploidía de 2N a N. Posteriormente, tiene lugar una segunda división celular durante la cual se separan las cromátidas hermanas de cada cromosoma reordenado, obteniéndose células haploides (N) con contenido de ADN C. Por lo tanto, la meiosis permite mantener el número cromosómico de la especie, el cual se restablece durante la fecundación, dando lugar a la formación del cigoto (Bolcun-Filas *et al.*, 2018).

### Meiosis I

La división celular meiótica referida como meiosis I es única, ya que conduce a la haploidización de los precursores de las células germinales a través de la segregación de los cromosomas homólogos. Debido a ello, se conoce como la

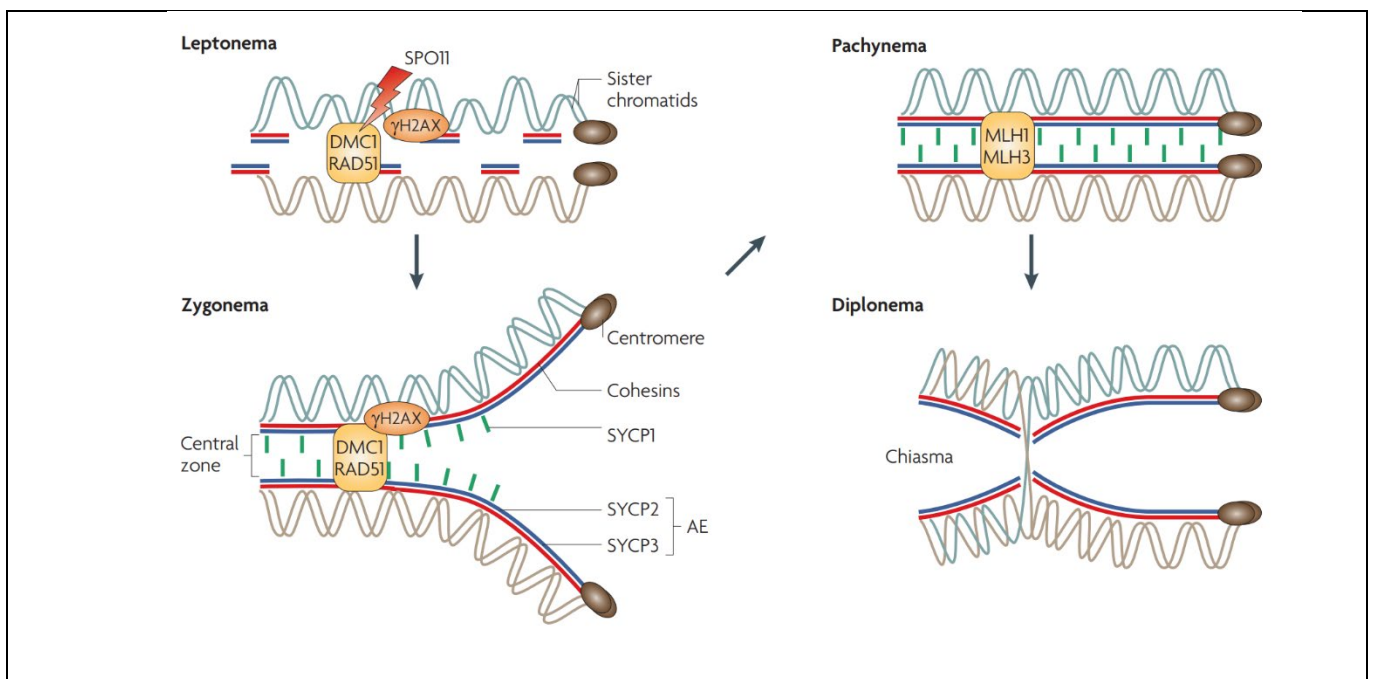
división celular reductora. Se caracteriza por una profase extensa y dos eventos meióticos clave: haploidización y recombinación. Esta extensa profase, se ha subdividido en cinco etapas para facilitar su descripción, a saber: leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis.

Durante el primer estadio, leptoteno (L), la cromatina se condensa y forma filamentos delgados donde las dos cromátidas de cada cromosoma no son distinguibles. Se produce la organización de un eje proteico a lo largo de cada cromosoma antes del alineamiento de los cromosomas homólogos. Estos ejes, establecidos entre las cromátidas hermanas, se conocen como ejes cromosómicos simples o elementos axiales (Handel y Schimenti, 2010) (Figura 4). En la fase S premeiótica, Rec8 desempeña un papel importante en el establecimiento de estos elementos axiales (Ejipe *et al.*, 2003). Además, en el L se inicia el alineamiento entre los cromosomas homólogos a través de cohesinas y proteínas específicas (Gerton *et al.*, 2005). Complejos de cohesina en forma de anillo que rodean las cromátidas hermanas a lo largo de toda la longitud de los cromosomas facilitan la organización de los cromosomas (Figura 4). Posteriormente, otras subunidades de cohesina, como SMC1 $\alpha/\beta$ , SMC3, RAD21 y más tarde la proteína RAD21L, se agregan al eje cromosómico meiótico y contribuyen a su estructura (Handel y Schimenti, 2010). Finalmente, es durante el estadio de L que los extremos teloméricos, ubicados en la periferia nuclear y unidos a la envoltura nuclear, comienzan a moverse en el plano de la misma y a agruparse de manera gradual (Moses, 1968).

En el estadio de cigoteno (Z, por su nombre en inglés, Zygotene), la condensación de la cromatina continúa. Los telómeros se encuentran agrupados en una región limitada de la envoltura nuclear, lo que da lugar a una configuración cromosómica peculiar que se asemeja a un arreglo floral y que se conoce como *bouquet* (Schertan, 2007). Se ha sugerido que esta disposición especial de los telómeros durante la profase facilita el reconocimiento y el apareamiento estable de los cromosomas homólogos (Zickler y Kleckner, 1998), ya que es durante el Z cuando comienza la sinapsis homóloga. Los homólogos siguen alineándose y se establece la unión de los elementos axiales mediante la aparición de un elemento central (EC).

La sinapsis cromosómica progresa hasta que los cromosomas homólogos quedan apareados a lo largo de su longitud completa gracias a la acción del EC, dando paso a la etapa siguiente. En esta configuración, los cromosomas se denominan bivalentes o tétradas (Schmekel *et al.*, 1996).

Además, durante los estadios de L y Z, se pueden observar los primeros signos citológicos del proceso de recombinación, que son complejos proteicos conocidos como nódulos de recombinación temprana. Estos nódulos marcan los sitios donde ocurren las reacciones relacionadas con el intercambio de hebras (Llano *et al.*, 202).



**Figura 4. Profase I de la meiosis.**

Leptoteno (o leptonema: los cromosomas homólogos comienzan a alinearse, pero permanecen sin aparearse. Se inicia la formación de un andamio cromosómico mediante el ensamblaje de elementos axiales (AE) a partir de proteínas cohesinas como REC8 y SMC1B, junto con proteínas del complejo sinaptonémico como SYCP3 y SYCP2. En las cromátidas ocurren roturas de doble hebra (inducidas por SPO11), sirviendo como sustrato para la recombinación. Estas roturas son reconocidas y reparadas por el mecanismo de reparación de recombinación homóloga, que implica la fosforilación de H2AX para formar  $\gamma$ H2AX. Este proceso desencadena la unión de proteínas relacionadas con REC-A, incluyendo DMC1 y RAD51, entre otras. A medida que se establece el cigoteno los cromosomas homólogos aparecen apareados extendiendo el inicio de la sinapsis, formando el complejo sinaptonémico, mientras que los AEs comienzan a unirse. En consecuencia, los AEs se transforman en los elementos laterales del complejo sinaptonémico. El paquiteno se caracteriza por la finalización de la sinapsis, momento en el cual se hace aparente la zona central del complejo sinaptonémico y ocurre la recombinación, con la participación, entre otros, de MLH1 y MLH3, implicados en el procesamiento de los intermediarios de recombinación. Una vez completada la recombinación, los cromosomas pasan por la desinapsis, permaneciendo únicamente unidos por los quiasmas. Extraído de Handel MA, Schimenti JC 2010.

En el estadio siguiente, de paquiteno (P), los cromosomas homólogos han completado la sinapsis y están completamente apareados, mostrando una máxima condensación, una apariencia más corta y gruesa, y comenzando a desaparecer la configuración en *bouquet*. Durante este estadio, tiene lugar la recombinación homóloga o entrecruzamiento, que también es mediada por los CSs. Este proceso conduce al intercambio recíproco de material genético entre las cromátidas homólogas apareadas. En el P pueden observarse los nódulos de recombinación tardíos, que son menos numerosos que los nódulos tempranos detectados en los estadios de L/Z (Handel y Schimenti, 2010). Algunos detalles del proceso de apareamiento y recombinación pueden apreciarse en la Figura 4.

La recombinación homóloga juega un papel fundamental, debido a las siguientes razones expuestas por Rice y Chippindale en 2001:

- a. Permite el intercambio de fragmentos génicos entre los progenitores paterno y materno;
- b. Durante este proceso pueden ocurrir errores o modificaciones, lo que contribuye a la introducción de variaciones genéticas;
- c. La presencia de al menos un evento de entrecruzamiento por par de cromosomas es crucial para una correcta segregación de los homólogos durante la metafase I, evitando la aparición de aneuploidías;
- d. A través de la descendencia que obtuvo modificaciones por este proceso, dichas variantes pueden propagarse en la población y afectar a toda la especie, por lo que tiene una enorme relevancia en la generación de variabilidad genética y, por lo tanto, en la biodiversidad.

Durante el estadio de diploteno, los CSs se desensamblan y los cromosomas homólogos comienzan a separarse a medida que las cohesinas que los unían desaparecen, quedando unidos únicamente en puntos denominados quiasmas, que son considerados la evidencia morfológica de la recombinación (Buonomo *et al.*, 2000).

En el estadio de diacinesis, al finalizar el diploteno, se observan claramente las cuatro cromátidas de los dos cromosomas unidos por sus centrómeros y los quiasmas. Estas cromátidas se liberan de las paredes nucleares y migran hacia

la placa ecuatorial, marcando así la entrada a la metafase de la primera división meiótica (Alberts, 2002).

Durante la metafase I los cromosomas bivalentes se alinean en la placa ecuatorial, y los centrómeros de cada par de homólogos se orientan hacia polos opuestos. A diferencia de la mitosis, donde las cromátidas hermanas se separan, en la primera división meiótica la separación de las cromátidas hermanas se suprime, lo que resulta en que las cromátidas hermanas permanezcan orientadas hacia el mismo polo. En el transcurso de dicha etapa no se encuentra presente la envoltura nuclear, y se genera el huso mitótico (Miller, 2013).

En anafase I los cromosomas homólogos son segregados, lo que determina la formación de dos células hijas llamadas meiocitos secundarios o meiocitos II. Estas células son haploides, con un solo cromosoma de cada par, constando cada cromosoma de dos cromátidas que presentan marcadas diferencias (Salcedo, 1995).

## Meiosis II

La formación de los núcleos de los gametos procede mediante una segunda división celular, conocida como Meiosis II, sin requerir una replicación adicional del ADN. Durante esta etapa, los cromosomas duplicados se alinean en un segundo huso y las cromátidas hermanas se separan, lo que resulta en la producción de células con un contenido de ADN C (Alberts, 2002).

Al concluir la división meiótica I, las membranas nucleares se forman nuevamente alrededor de los dos núcleos de las células hijas, dando inicio a la breve interfase de la división II. Durante este período, los cromosomas pueden descondensarse ligeramente, pero generalmente vuelven a condensarse rápidamente, dando inicio a la profase II. La profase II es breve: la envoltura nuclear se desintegra mientras se forma un nuevo huso, seguido rápidamente por la metafase II, anafase II y telofase II. Una vez que las envolturas nucleares se han formado alrededor de los cuatro núcleos haploides producidos en la telofase II, se produce la citocinesis y se completa la meiosis (Alberts, 2002) (ver Figura 3)

## El complejo sinaptonémico y su estructura molecular

El CS es el conjunto de proteínas más estudiado en el proceso de meiosis, está presente en los organismos con reproducción sexuada, y su estructura está



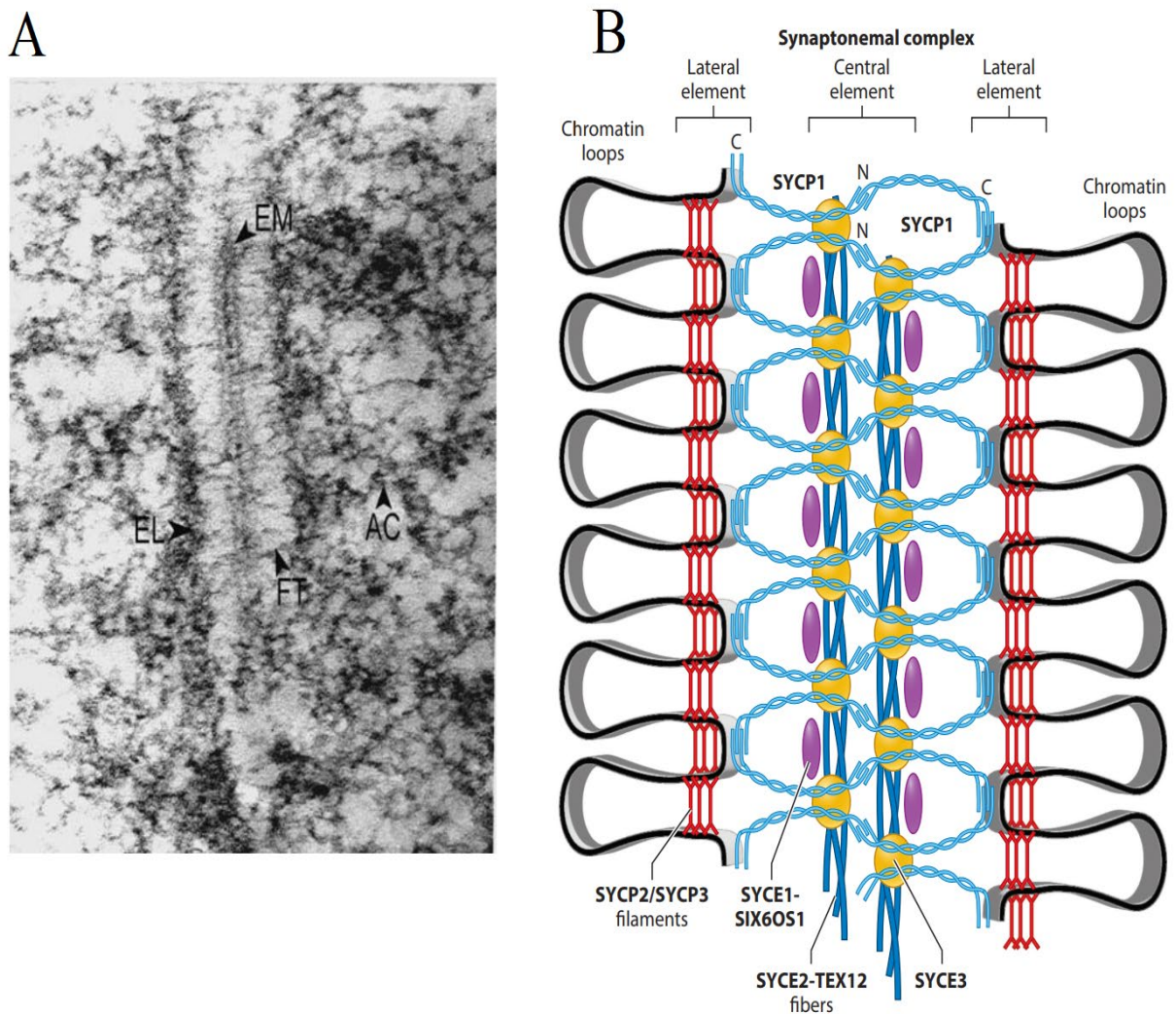
altamente conservada desde las levaduras hasta el hombre (Page y Hawley, 2004; Von Wettstein, 1984). Fue descrito en 1956 por Moses (Moses *et al.*, 1956) utilizando micrografías electrónicas, y consta de dos elementos laterales (ELs), un elemento central (EC) y filamentos transversales (FT) que los conectan. La combinación del EC y los FT forma la región central (RC) del CS. Su estructura tripartita es similar a una escalera, donde los ELs representan los elementos de sostén paralelos, y los FT, perpendiculares, actúan como los escalones. Es importante destacar que los escalones ocupan la mitad del espacio entre los ELs, extendiéndose al EC (Figura 5A).

El CS desempeña un papel esencial en la sinapsis y recombinación de los cromosomas homólogos. En el transcurso de la sinapsis, actúa como un andamiaje de soporte que une los cromosomas homólogos para facilitar el proceso de recombinación.

Como se mencionó previamente, antes de la sinapsis se forman elementos axiales, precursores de los ELs del CS, entre las cromátidas hermanas (Winkel *et al.*, 2009). Estos elementos axiales desempeñan varias funciones importantes, como promover la condensación cromosómica, posibilitar el apareamiento y la sinapsis entre cromosomas homólogos, participar en la reparación de roturas de doble cadena del ADN (DSBs, del inglés, "*Double Strand Breaks*"), regular la distribución de los sitios de recombinación, y contribuir al ensamblaje adecuado del EC (Liebe *et al.*, 2004). Como también hemos visto, durante el Z los elementos axiales se alinean según su homología comenzando de esta forma la sinapsis. Para que esto suceda, las proteínas del FT y, posteriormente, las



proteínas del EC se reclutan en los elementos axiales, los cuales a partir de este momento pasan a ser los ELs (Spindler *et al.*, 2020).



### Figura 5. Estructura y composición del CS.

A) Microfotografía electrónica mostrando un CS de la especie de grillo *Grillus argentinus*. EL: elemento lateral; EM: elemento medial (también llamado EC); FT: filamentos transversos; AC: asas de cromatina. La estructura es igual en mamíferos. Extraído de Wettstein y Sotelo, 1971. B) Modelo esquemático del CS en mamíferos, destacando la proteína de filamento transversal SYCP1 (N y C refieren a los extremos N-terminal y C-terminal de esta proteína), los elementos laterales formados por los filamentos de SYCP2 y SYCP3, y el elemento central que consiste en complejos SYCE3 que se unen a SYCP1, complejos SYCE1-SIX6OS1, y fibras SYCE2-TEX12. Extraída de Adams *et al.*, 2023.

Durante la progresión del P, el CS se encuentra completamente ensamblado. El estado dinámico del CS, que abarca desde el ensamblaje hasta el desensamblaje, es resultado de la interacción de múltiples mecanismos

reguladores (Gao *et al.*, 2018). Estos mecanismos incluyen regulaciones transcripcionales y traduccionales, modificaciones postraduccionales y regulación postraducciona de la vida útil de las proteínas (Ahuja *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2018; Honigberg *et al.*, 2003; Kershner *et al.*, 2013; Merritt *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2017).

En los mamíferos, se han identificado y estudiado ocho proteínas del CS. Las primeras tres proteínas que se descubrieron son SYCP1, SYCP2 y SYCP3 [por “*Synaptonemal Complex Protein*” 1, 2 y 3, respectivamente; (Heyting *et al.*, 1989; Meuwissen *et al.*, 1992; Offenber *et al.*, 1998)]. Aproximadamente diez años después, se identificaron otras proteínas. En 2004, Costa y colaboradores fueron los primeros en identificar a SYCE1 y SYCE2 (por “*Synaptonemal complex Central Element*” 1 y 2; Costa *et al.*, 2005). Dos años más tarde, Hamer y colaboradores revelaron la existencia de TEX12 (Hamer *et al.*, 2006). Desde entonces, se han descubierto dos proteínas adicionales: SYCE3 (Schramm *et al.*, 2011), y SIX6OS1 (Gómez-H *et al.*, 2016; Figura 5B).

Nuestro conocimiento sobre la estructura molecular del CS sigue siendo limitado. Sin embargo, mediante técnicas de laboratorio que emplean proteínas purificadas, se ha logrado caracterizar las interfaces de interacción, estructuras, y propiedades de ensamblaje de varios componentes del CS. Además, se han realizado estudios utilizando modelos de ratones genéticamente modificados para comprender mejor las funciones de este complejo en organismos vivos. Por otra parte, gracias a la introducción de la microscopía de superresolución y utilización de tomografía electrónica, ahora podemos examinar la topología de proteínas individuales en ratones, lo que nos ha brindado información sobre la distribución de los componentes proteicos dentro del CS (Spindler *et al.*, 2019; Zwettler *et al.*, 2020).

### Elementos Laterales

Los ELs del CS en los mamíferos están compuestos por las proteínas SYCP2 y SYCP3, siendo SYCP3 el componente principal. Tanto SYCP2 como SYCP3 tienen dominios de tipo *coiled-coil*, que median interacciones proteína-proteína (Yuan *et al.*, 1998; Tarsounas *et al.*, 1997).

En los seres humanos, la proteína SYCP3 consta de 236 aminoácidos (aa) y comparte una similitud del 66% con la proteína SYCP3 del ratón (Alzheimer *et*

*al.*, 2010). Los datos cristalográficos de SYCP3 han revelado un ensamblaje tetramérico antiparalelo de la proteína, donde los extremos N-terminales están expuestos en ambos lados (Bollschweiler, 2019). Su dominio coiled-coil es corto, se ubica en su extremo C-terminal (Offenberg *et al.*, 1998), e interactúa con SYCP2 (Yang *et al.*, 2006) y SYCP1 (Winkel *et al.*, 2009), facilitando el ensamblaje del EC y la sinapsis entre los cromosomas homólogos alineados (de Vries *et al.*, 2005). Los extremos N-terminales de SYCP3 están caracterizados por la presencia de residuos básicos, los cuales poseen sitios de unión al ADN, proponiéndose que los mismos actúan como espaciadores moleculares en la organización de la cromatina en el CS (Liinamaria *et al.*, 2014).

SYCP2 es la proteína de mayor tamaño en el CS, y su dominio *coiled-coil*, situado en el extremo C-terminal, desempeña un papel fundamental en la interacción entre SYCP2 y SYCP3 (Yang *et al.*, 2006).

### Filamentos Transversos

La única proteína constituyente de los FT es SYCP1, que conecta el EL de cada lado, con el EC (Meuwissen *et al.*, 1992). Esta proteína posee un largo dominio central de tipo *coiled-coil*, necesario para su dimerización. Por medio de diversos análisis de microscopía inmunoelectrónica se ha sugerido que los extremos N-terminales y C-terminales no estructurados de SYCP1 se anclan dentro del EC y el EL, respectivamente (Liu *et al.*, 2006; Schmekel *et al.*, 1996). SYCP1 formaría homotetrámeros que se ramificarían en dos *coiled-coil* diméricas en el extremo C-terminal (Dunce *et al.*, 2018). Los extremos C-terminales de SYCP1 contienen parches con carga básica que están separados por aproximadamente 30 Å, con posibles sitios de unión al ADN (Dunce *et al.*, 2018), en tanto los dominios N-terminales de dímeros opuestos interactúan de forma antiparalela en el centro del CS (Schmekel *et al.*, 1996; ver Figura 5B). Por otra parte, el dominio central del *coiled-coil* de SYCP1 desempeñaría un papel en la determinación del ancho del CS (Spindler *et al.*, 2020).

La interacción de SYCP1 con el EL se da a través de SYCP2, ya que SYCP1 y SYCP3 no interactúan directamente entre sí (Costa *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Tarsounas. *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1998).

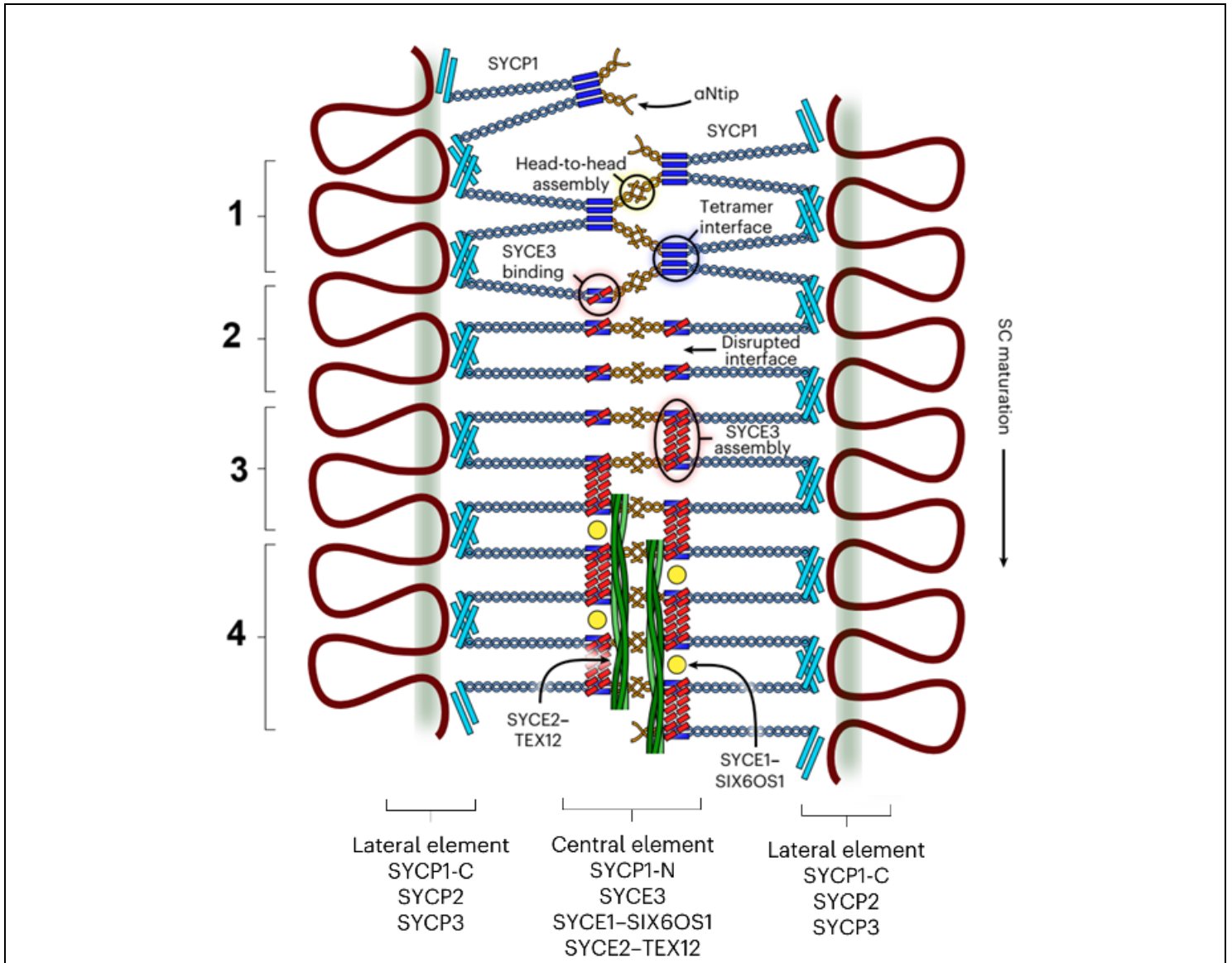
## Elemento Central

Existen en el EC 5 proteínas identificadas: SYCE1, SYCE2 (Costa *et al.*, 2005), SYCE3 (Schramm *et al.*, 2011), TEX12 (Hamer *et al.*, 2006) y SIX6OS1 (Gómez *et al.*, 2016). Se ha predicho que todas estas proteínas contienen regiones de *coiled-coil*. SYCP1, SYCE1 y SYCE3 actúan en conjunto, y cumplen un rol fundamental para el inicio de la sinapsis entre cromosomas homólogos. Por su parte, SYCE2 y TEX12 forman un complejo que interviene en la propagación de la sinapsis, pero no cumpliría un rol esencial para su inicio (Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Hamer *et al.*, 2008).

El orden del ensamblaje de las diferentes proteínas del EC fue descrito mediante la utilización de ratones *knock-out* que carecen de diferentes proteínas, permitiendo generar de esta manera un modelo del orden de ensamblaje (Figura 6). Inicialmente, SYCE3 y SYCE1 se asocian con la proteína del filamento transversal SYCP1, antes de reclutar a SYCE2 y TEX12 (Fraune *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2005). SIX6OS1, a su vez, se asocia con SYCE1 (Gómez-H *et al.*, 2016). Recientemente, se publicó un trabajo indicando que SYCE3 interrumpe la red tetramérica de SYCP1 y la reorganiza en una red SYCP1-SYCE3. (Crichton *et al.*, 2022). SYCE3 reclutaría los complejos del EC, SYCE1-SIX6OS1 y SYCE2-TEX12, que fortalecen la red SYCP1-SYCE3 y permiten su extensión a lo largo de todo el eje cromosómico para lograr una sinapsis completa. (Crichton *et al.*, 2022)

En los humanos, la proteína SYCE1 está compuesta por 351 aa y forma homodímeros en una disposición antiparalela. Su mitad N-terminal contiene un núcleo central que abarca los aa 25-179, el cual proporciona estabilidad estructural y facilita la dimerización de proteínas (Dunne y Davis, 2019). SYCE1 es integrada al CS por medio de la interacción entre su hélice C-terminal y la hélice N-terminal de SYCE3 (Lu *et al.*, 2014). Sumado a esto, SYCE1 posee una interacción con la región N-terminal de SYCP1, lo que estaría relacionado con su estabilidad (Costa *et al.*, 2005). Luego de que SYCE1 es cargada al CS, SYCE2 y TEX12 son reclutadas, en forma de un complejo hetero-octamérico (Davies *et al.*, 2012). Estos complejos se entrelazan para dar lugar a fibras largas que definen la estructura de la región central (Dunce *et al.*, 2021). El complejo SYCE2-TEX12 interactúa con la región central a través de SYCE2, que se une

tanto a SYCE1 como a la región N-terminal de SYCP1 (Costa *et al.*, 2005; Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Schramm *et al.*, 2011; ver Figura 5).



**Figura 6. Orden de ensamblaje del CS.**

Modelo de la maduración estructural del CS actualizado en base a la remodelación de SYCP1 por medio de SYCE3, que posteriormente recluta a los restantes componentes del EC:

1. El inicio de la sinapsis y la extensión local de la red ocurren mediante el reclutamiento y ensamblaje de redes tetraméricas de SYCP1 entre los ejes cromosómicos.
2. El reclutamiento de SYCE3 interrumpe la red tetramérica al unirse a los dímeros de SYCP1 e inhibir competitivamente la interfaz tetramérica.
3. SYCE3 remodela la red inicial de SYCP1 tetramérica en una red integrada de SYCP1-SYCE3.
4. SYCE3 recluta e inicia el ensamblaje de los complejos SYCE1-SIX6OS1 y SYCE2-TEX12, que proporcionan soporte estabilizando la extensión de la sinapsis cromosómica a lo largo del cromosoma.

Extraído y modificado de Crichton *et al.*, 2023



SIX6OS1 tiene un tamaño de 70 kDa, y contiene una región helicoidal conservada en su extremo N-terminal que incluye un tramo corto de estructura de *coiled-coil* hacia el extremo C-terminal, donde interactúa con el EC del CS. Dicha proteína juega un papel en la progresión de la recombinación (Gómez *et al.*, 2016). Se ha observado su presencia desde el Z hasta el P, y se localiza parcialmente con SYCP1 a lo largo de los ejes sinapsados del CS (Gómez *et al.*, 2016). Un estudio reciente reveló que SIX6OS1 presenta interacciones multivalentes con SYCE1 (Sánchez-Sáez *et al.*, 2020).

Un aspecto interesante, surgido de los estudios de microscopía de superresolución y tomografía electrónica, es que las proteínas de la RC, como SYCE1-3 y SYCP1, muestran una distribución bimodal en las vistas laterales del CS, lo que sugiere una organización bicapa del mismo (Schücker *et al.*, 2015).

En el transcurso de la profase meiótica tardía, se vuelve necesario desmontar el CS para poder continuar con la correcta segregación cromosómica. El desmontaje y desensamblado está regulado por la acción de la proteína quinasa Aurora B y la quinasa tipo Polo 1 (PLK1). Esta última es la encargada de fosforilar a SYCP1, TEX12 y SYCE1 en una instancia previa al desensamblaje de los EC y EL, manteniendo los quiasmas intactos (W Jordan *et al.*, 2012). Este proceso marca el final de la vida del CS (Spindler *et al.*, 2020).

### Influencia de las mutaciones en componentes del complejo sinaptonémico: ratones *knock-out* e infertilidad humana.

En la década de los 80, se llevaron a cabo varios estudios que establecieron una conexión entre los defectos sinápticos y posibles causas de infertilidad (Vidal *et al.*, 1982). Dentro de las anomalías observadas, se encontraron discontinuidades o "*gaps*" a lo largo del CS, falta de unión o sinapsis entre elementos no homólogos, y una estructura irregular del CS. Estudios posteriores realizados, tanto en seres humanos como en ratones, confirmaron que los errores en la sinapsis estaban asociados con la apoptosis de los espermatozoides en la fase de P, lo que a su vez afectaba la fertilidad (Burgoyne *et al.*, 2009).

La aparición de defectos cuantitativos en el número de espermatozoides u óvulos en adultos puede atribuirse, entre otras causas (Krausz *et al.*, 2018; Yatsenko *et al.*, 2019), a variaciones genéticas que dificultan la capacidad del

CS para posibilitar la sinapsis, lo cual normalmente desencadena arresto meiótico en puntos de control (*check-points*) en P que conllevan la muerte celular meiótica (Burgoyne *et al.*, 2009). En ese sentido, es esperable que ciertas variantes genéticas que resultan en aneuploidía de gametos y pérdida recurrente de embarazos (Yuan *et al.*, 2021), afecten la capacidad del CS para promover la recombinación y garantizar una segregación precisa de los cromosomas meióticos.

### Mutaciones asociadas a los componentes del elemento lateral del complejo sinaptonémico.

En el año 2002, Yuan y colaboradores llevaron a cabo la generación de un ratón *knock-out* para el gen *Sycp3*. Los ratones macho y hembra *knock-out* para *Sycp3* mostraron un desarrollo normal. Sin embargo, los machos mutantes en homocigosis eran estériles y presentaban testículos con un tamaño disminuido. El análisis histológico reveló una detención meiótica en la etapa del Z, con una completa ausencia de espermátidas redondas, espermátidas elongadas y espermatozoides (Yuan *et al.*, 2002). SYCP2 no lograba unirse a los cromosomas meióticos, ya que los meiocitos que carecen de SYCP3 no logran formar elementos axiales (Liebe *et al.*, 2004).

Posteriormente, en el año 2020 se realizó el ratón *knock-out* del gen *Sycp2* (Takemoto *et al.*, 2020). Se vio que, en los ratones macho, la ausencia de SYCP2 también conllevaba defectos en la formación de sinapsis y apoptosis de los espermatocitos.

En cambio, cuando se producen hembras *knock-out* en los genes *Sycp3* o *Sycp2*, se observan efectos leves en la formación de sinapsis, y los ovocitos atraviesan parcialmente la meiosis. No obstante, se ha observado una disminución en el tamaño de las camadas debido a un aumento en la frecuencia de ovocitos aneuploides (Yang *et al.*, 2006). Esto indica un dimorfismo sexual en relación al efecto producido por la ausencia de componentes del EL.

En los últimos años, se han registrado diversos casos de infertilidad humana en los que se han identificado mutaciones en el gen SYCP3. Aunque la conexión entre estas mutaciones y la infertilidad es implícita, la misma aún no ha sido demostrada (Geisinger y Benavente, 2016).

La identificación inicial de una mutación en este gen se llevó a cabo mediante la secuenciación de *SYCP3* como un posible candidato para la infertilidad en 19 hombres infértiles azoospermicos con arresto meiótico (*Schmekel et al., 1996*). En este estudio, se identificó una delección de un solo nucleótido (c.643delA) en heterocigosis, en dos hombres infértiles no relacionados. Esta delección resultó en la producción de una proteína SYCP3 truncada. La presencia de esta proteína truncada interfería con la proteína normal generada a partir del otro alelo, por medio de un mecanismo de dominancia negativa. Es posible que los componentes del CS que contienen una región central con un núcleo de hélice alfa, como SYCP3, también sean propensos a mutaciones dominantes negativas, ya que podrían incorporar dichas estructuras truncadas en estructuras de mayor orden (*Adams y Davies, 2023*).

Posteriormente, en un paciente con oligozoospermia severa, se identificó una mutación heterocigota en *SYCP3* que implicaba una delección con desplazamiento del marco de lectura de 4 nucleótidos (c.524\_527delTTAA) (122). La predicción indica que, al igual que la mutación anterior, resultaría en un codón de terminación prematura (PTC, por su nombre en inglés: “*Premature Termination Codon*”) en el ARNm de *SYCP3*, y contribuiría a la enfermedad a través de un mecanismo dominante negativo en individuos heterocigotos (*Miyamoto et al., 2003; Oud et al., 2017*).

Asimismo, se detectaron dos mutaciones distintas en *SYCP3* en dos mujeres diferentes, específicamente c.553-16\_19del y c.657T>C (*Karczewski et al., 2020*). Estas mutaciones tendrían el potencial de afectar el empalme del transcripto de *SYCP3* (*Bolor et al., 2009*), y posiblemente dar como resultado proteínas SYCP3 truncadas.

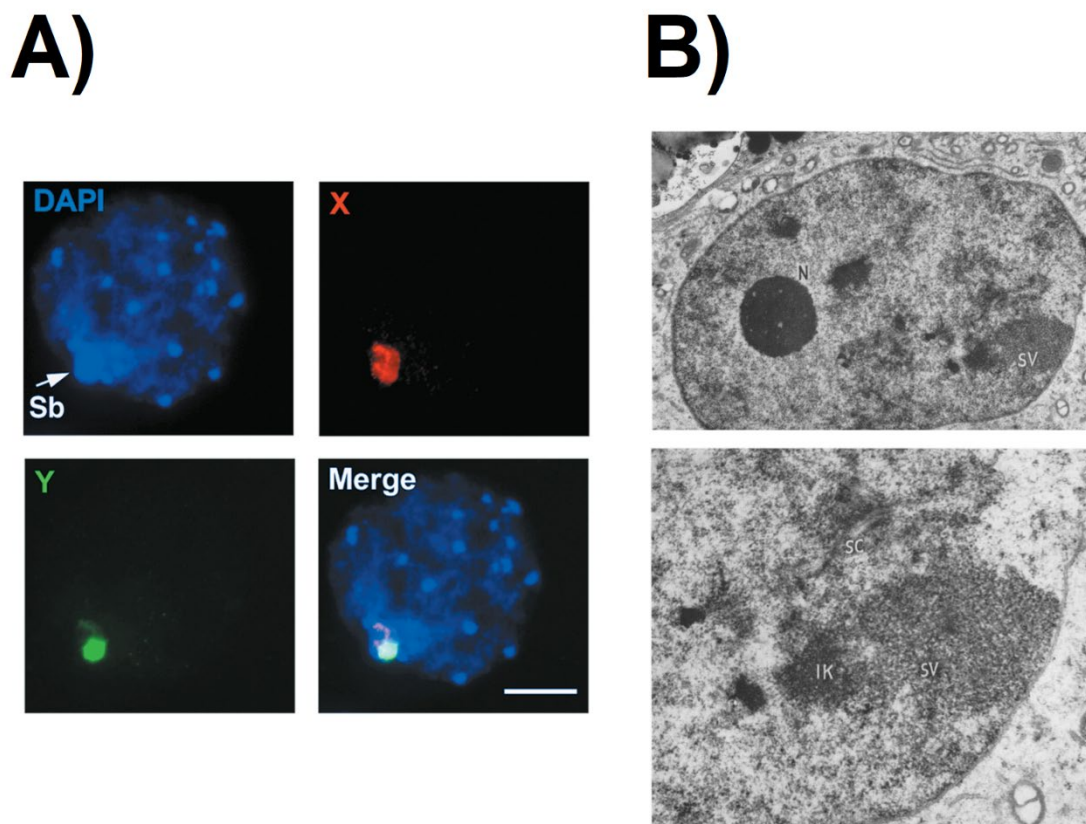
Por otro lado, se han identificado tres mutaciones distintas en *SYCP2* que se consideran posibles causantes de infertilidad masculina (*Schilit et al., 2020*). Estas mutaciones consisten en delecciones de 4 ó 5 pares de bases, lo que provoca cambios en el marco de lectura y se predice que generarían PTCs resultando en proteínas que carecerían del dominio de hélice  $\alpha$ -helicoidal central que se involucra en la unión con SYCP3 (*Revisado por Adams y Davies, 2023*). Estas mutaciones se han detectado en pacientes que presentan criptozoospermia y azoospermia con arresto meiótico (*Schilit et al 2020*).



### Mutaciones asociadas a filamentos transversos

Estudios anteriores han demostrado que el componente del FT, SYCP1, es crucial para la coordinación y formación de entrecruzamientos.

En ratones *knock-out* para *Sycp1*, se ha observado que los elementos axiales se forman y alinean correctamente en las etapas de L/Z, pero los homólogos no logran alcanzar la sinapsis. La identificación de proteínas asociadas al EC resalta la importancia de SYCP1, ya que en su ausencia las proteínas del EC no se incorporan al CS (Schramm *et al.*, 2011), respaldando la idea de que SYCP1 actúa como andamio para el ensamblaje de la sinapsis cromosómica (Ollinger *et*



### Figura 7. Estructura del cuerpo XY.

A) FISH con sondas específicas para los cromosomas X (rojo) e Y (verde), contrastado con DAPI (azul). En espermatocitos de paquíteno de tipo salvaje, los cromosomas X e Y condensados se encuentran en el cuerpo sexual heterocromático. Extraído y modificado de Fernández-Capetillo *et al.*, 2003. **B)** Micrografías electrónicas de un espermatocito humano en paquíteno, donde se aprecia la vesícula sexual (SV), como una masa densa contra la envoltura nuclear. En la imagen inferior se observa una ampliación. Un complejo sinaptonémico autosómico (SC) se observa por encima de la vesícula sexual. Extraído y modificado de Solari y Tres, 1967.

*al.*, 2005; Hamer, *et al.*, 2008). A diferencia de lo observado en mutantes de componentes del EL, en los ratones *knock-out Sycp1* la fertilidad se ve igualmente afectada en ambos sexos, resultando ambos estériles.

Una particularidad es que los espermatoцитos *Sycp1*<sup>(-/-)</sup> no forman vesícula sexual o cuerpo XY (de Vries *et al.*, 2005). La vesícula sexual es una formación característica de la profase meiótica de los mamíferos machos, donde ambos cromosomas sexuales, no homólogos, quedan unidos por su corta región de homología, llamada región pseudoautosómica, como se aprecia en la Figura 7.

Mutaciones en el gen *SYCP1* también se han relacionado con la infertilidad masculina humana. En una familia consanguínea, se identificó una única mutación en *SYCP1*, que se encontró en tres hermanos varones con oligozoospermia. Esta mutación implicaba la delección de un solo nucleótido en *SYCP1* (c.2892delA), y se ha predicho que determinaría un desplazamiento del marco de lectura y un PTC. Como resultado, se alterarían o truncarían los últimos 10 aa del extremo C-terminal de la proteína. La oligozoospermia sólo se observó en individuos varones de la familia que eran homocigotos para la mutación *SYCP1* c.2892delA, lo que indica un modo de herencia recesivo (Nabi *et al.*, 2022).

#### Mutaciones asociadas al elemento central

Se ha demostrado que la eliminación de *Syce1* en ratones causa detención de la meiosis (Bolcun-Filas *et al.*, 2007). Estudios realizados en ratones con la ausencia de *Syce1* mostraron que los individuos de ambos sexos eran infértiles (Bolcun-Filas *et al.*, 2009), en coincidencia con lo observado para mutaciones en *Sycp1*. Esto coincide también con los estudios realizados en ratones *knock-out* para los demás componentes de la RC del CS, que muestran que la eliminación de cualquiera de sus componentes afecta por igual a ambos sexos, y que ambos sexos resultan infértiles (Bolcun-Filas *et al.*, 2009). La infertilidad se debe a disfunciones en la sinapsis y a la muerte celular masiva de los meiocitos (Schramm *et al.*, 2011). Estas diferencias entre los fenotipos observados en los ratones *knock-out* para componentes del EL y de la RC, sugieren que esta última podría desempeñar un papel estructural más crucial que el EL.

Las mutaciones en *SYCE1* fueron las primeras identificadas en un gen codificante para componentes del EC, en pacientes humanos infértiles. En

mujeres, se identificaron mutaciones en *SYCE1*, específicamente p.E159K y p.F230Sfs\*21, cada una en un único individuo, a través de la secuenciación completa del exoma en pacientes idiopáticas con falla ovárica prematura (POF, por su denominación en inglés, “*Premature Ovarian Failure*”).

Sin embargo, la mutación en *SYCE1* más estudiada y asociada con POF, fue denominada originalmente c.613C>T y re-nombrada por nuestro grupo como c.721C>T en concordancia con su posición en la nueva anotación del genoma humano (Hernández-López *et al.*, 2020). Dicha mutación introduce un PTC, y se ha propuesto que resultaría en la producción de una proteína *SYCE1* truncada que interrumpiría uno de los dos sitios de unión de *SYCE1* con *SIX6OS1*, interfiriendo también con la capacidad de *SYCE1* para interactuar con *SYCE3* (Sánchez-Sáez *et al.*, 2020). No obstante, nuestro grupo, a partir de la replicación de la mutación *SYCE1* c.721C>T en ratones, ha demostrado que la misma afecta notablemente la abundancia del ARNm, el que sería degradado por la vía del decaimiento de ARNs mensajeros con PTCs (“*Nonsense Mediated Decay*”, o NMD), generando niveles casi nulos de proteína *SYCE1*, tanto en ovocitos como en espermatozoides (Hernández-López *et al.*, 2020). En consecuencia, el fenotipo de POF sería consecuencia de la ausencia casi total de proteína *SYCE1*. Los ratones hembra homocigotas para esta mutación presentaron deficiencias en el ensamblaje del CS y la sinapsis durante la ovogénesis, pérdida de ovocitos e infertilidad (Hernández-López *et al.*, 2020).

La primera mutación en *SYCE1* detectada en hombres, fue identificada por Maor-Sagie y sus colegas en 2015. Dicha mutación, c.197-2A>G, interrumpe el sitio de aceptor de *splicing* del intrón 3-4 del gen (el cual consta de 13 exones), lo que conduce a la generación de un PTC. Como resultado, se produciría una proteína truncada predicha de 82 residuos (p.A82\*). Este estudio se enfocó en una familia judeo-iraní en la que dos hermanos varones, hijos de padres consanguíneos, presentaban NOA. El análisis reveló que ambos hermanos tenían la misma mutación, y la evaluación histológica de sus testículos mostró un arresto en la maduración de las células germinales, que no avanzaban más allá de la profase meiótica. La herencia recesiva y las observaciones histológicas concuerdan con los hallazgos en los ratones *knock-out* del gen *Syce1*, lo que sugiere una conexión entre la mutación humana en *SYCE1* y el fenotipo de NOA

(Maor-Sagie *et al.*, 2015), si bien la relación causal no había sido probada. Esta es la mutación sobre la cual se basa esta tesis, como se verá más adelante.

Últimamente, se han identificado algunas mutaciones adicionales en *SYCE1*, todas las cuales, a excepción de una, fueron identificadas durante el transcurso de esta tesis: c.271+2T>C, c.375-2A>G y c.689\_690del, todas vinculadas con la infertilidad masculina (Feng *et al.*, 2022; Hou *et al.*, 2022; Pashaei *et al.*, 2020). Estas mutaciones presentan un modo de herencia recesivo, y los hombres que son homocigotos para estas mutaciones han presentado azoospermia no obstructiva y arresto meiótico (Feng *et al.*, 2022; Hou *et al.*, 2022). Las mutaciones c.271+2T>C y c.375-2A>G también se encuentran en sitios de empalme, y se predice que resultarían en el salto de exones, generando proteínas *SYCE1* con deleciones internas dentro del marco de lectura (Hou *et al.*, 2022; Pashaei *et al.*, 2020). Cada una de estas deleciones interrumpiría uno de los dos sitios de unión a *SIX6OS1* en *SYCE1* (Sánchez-Sáez *et al.*, 2020), y es probable que conduzcan a la infertilidad al evitar la formación de complejos funcionales *SYCE1-SIX6OS1*, lo que causaría defectos en la estabilización de la región central del CS durante su formación, afectando la sinapsis.

Finalmente, la otra mutación en *SYCE1* asociada a la infertilidad masculina (y reportada en 2022), c.689\_690del, es una deleción de dos pares de bases que se predice que podría resultar en un PTC y la producción de una proteína truncada (p.F230Sfs\*21) (Feng *et al.*, 2022). Esta mutación también podría interferir con uno de los dos sitios de unión a *SIX6OS1* en *SYCE1* (Hou *et al.*, 2022), o interrumpir la interacción entre *SYCE1* y *SYCE3* (Sánchez-Sáez *et al.*, 2020).

Otro gen del EC para el cual recientemente se han identificado mutaciones en pacientes infértiles, es *SIX6OS1*. Se han identificado pacientes con infertilidad masculina, específicamente azoospermia y arresto meiótico, que presentan múltiples mutaciones en este gen (Fan *et al.*, 2021; Hou *et al.*, 2022, Kherraf *et al.*, 2022). Estas mutaciones se caracterizan por deleciones de dos pares de bases que generan cambios en el marco de lectura, o por mutaciones puntuales que introducen PTCs dentro del marco de lectura abierto de *SIX6OS1*. En consecuencia, se predice que estas mutaciones resultarían en proteínas *SIX6OS1* truncadas (Fan *et al.*, 2021; Hou *et al.*, 2022, Kherraf *et al.*, 2022). Por

otra parte, en dos estudios independientes recientes se trabajó con pacientes de infertilidad femenina diagnosticadas con insuficiencia ovárica prematura (POF), en el primero a partir de 1030 pacientes mujeres con POF esporádica, y en el segundo con cincuenta familias paquistaníes consanguíneas con al menos dos hermanos infértiles. Ambos casos de estudio detectaron mutaciones homocigotas en *SIX6OS1* (F Fan *et al.*, 2021; Hou *et al.*, 2022), y se espera que ambas mutaciones resulten en PTCs que den lugar a proteínas truncadas (Adams y Davies, 2023).

Por último, en enero del año 2024 se publicó un estudio que descubrió una asociación entre una variante de cambio de sentido en *SYCE2* (*SYCE2:p.His89Tyr*) y casos de infertilidad femenina (Steinthorsdottir *et al.*, 2024).

Hasta la fecha, no se han reportado mutaciones en el gen para *SYCE3* en pacientes de infertilidad masculina o femenina. Sin embargo, los efectos fenotípicos observados en ratones con mutaciones nulas en estos genes sugieren que *SYCE3* también podría ser candidato potencial para la infertilidad humana (Adams y Davies, 2023).

**Tabla 1.** Recopilación de mutaciones en genes del CS encontradas en pacientes infértiles.

GEN	UBICACIÓN	CAMBIO EN EL ADN	CAMBIO DE AA	HETEROCIGOSIDAD	ENFERMEDAD/FENOTIPO	REFERENCIA
<i>SYCP2</i>	20q13.33	c.2022_2025del	p.Lys674AsnfsTer8	Heterozygous	Cryptozoospermia	Schilit SLP, et al.
<i>SYCP2</i>	20q13.33	c.2793_2797del	p.Lys932SerfsTer3	Heterozygous	Cryptozoospermia	Schilit SLP, et al.
<i>SYCP2</i>	20q13.33	c.3067_3071del	p.Lys1023LeufsTer2	Heterozygous	Azoospermia	Schilit SLP, et al.
<i>SYCP2</i>	20q13.33	c.2689_2690insT			NOA and Oligozoospermia.	Junwei Xu et al
<i>SYCP3</i>	12q23.2	c.548T>C	p.Ile183Thr	Heterozygous	Recurrent miscarriage	Stouffs K, et al.
<i>SYCP3</i>	12q23.2	c.553-16_19del	-	Heterozygous	RPL	Bolor H, et al.
<i>SYCP3</i>	12q23.2	c.643delA	-	Heterozygous	Azoospermia	Miyamoto T, et al.
<i>SYCP3</i>	12q23.2	c.657T>C	-	Heterozygous	RPL	Bolor H, et al. Mizutani E, et al. Szegari A, et al.
<i>SYCE1</i>	10q26.3	c.197-2A>G	Splicing site	Homozygous	NOA	Maor-Sagie E, et al. Sánchez-Sáez FA-O, et al.
<i>SYCE1</i>	10q26.3	c.271+2T>C	Splicing site	Homozygous	NOA	Hou D, et al.
<i>SYCE1</i>	10q26.3	c.375-2A > G	Splicing site	Homozygous	NOA	Sánchez-Sáez FA-O, et al. Pashaei M, et al.
<i>SYCE1</i>	10q26.3	c.475G>A	p.Glu159Lys	Compound heterozygous	POI	Hou D, et al.
<i>SYCE1</i>	10q26.3	c.613C>T	p.Gln205*	Homozygous	POF	Sánchez-Sáez FA-O, et al. de Vries L, et al. Hernández-López D, et al.
<i>SYCE1</i>	10q26.3	c.658_662delGAGGG	p.Glu220ProfsTer5	Heterozygous	POI	Gorsi B, et al.
<i>SYCE1</i>	10q26.3	c.689_690del	p.Phe230Serfs*21	Compound heterozygous	POI	Hou D, et al.
<i>SYCE1</i>	10q26.3	Gross deletion (>4000bp)	-	Homozygous	POI	Zhe J, et al.
<i>SYCE1</i>	10q26.3	Whole gene deletion	-	Homozygous	NOA	An M, et al.
<i>SIX6OS1</i>	14q23.1	c.135_136del	p.Lys45Asnfs*5	Homozygous	NOA	Hou D, et al.
<i>SIX6OS1</i>	14q23.1	c.204_205del	p.His68Glnfs*2	Homozygous	NOA/POI	Fan S, et al.
<i>SIX6OS1</i>	14q23.1	c.207_210delTGAG	p.Ser69ArgfsTer53	Heterozygous	POI	An M, et al.
<i>SIX6OS1</i>	14q23.1	c.508C>T	p.Arg170*	Homozygous	POI	Hou D, et al.
<i>SIX6OS1</i>	14q23.1	c.958G>T	p.Glu320*	Homozygous	Meiotic arrest	Fan S, et al.
<i>SIX6OS1</i>	14q23.1	c.1180-3C>G	Splicing site	Homozygous	Meiotic arrest	Fan S, et al.
<i>SIX6OS1</i>	14q23.1	C.7G>A	p.D3N	Homozygous	NOA	Ali, H, et al.
<i>TEX12</i>		c.196-200del	p.L66fs	Homozygous	NOA	Bui, M.D., et al.
<i>SYCP1</i>	1p13.2	c.2892delA	p.K967Nfs*1	Homozygous	Oligozoospermia	Soheila N, et al.
<i>SYCE2</i>		c.265C>T	p.His89Tyr		Recurrent miscarriage	Steinthorsdottir et al.

Extraída y modificada de Feng., *et al* 2022.

En la Tabla 1 se recopilan todas las mutaciones descritas hasta la fecha de presentación de esta tesis en genes codificantes para proteínas del CS, identificadas en casos de infertilidad en humanos.

### Modelos murinos generados mediante la tecnología CRISPR (“*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*”)

Un aspecto importante a tener en cuenta a la hora de abordar el estudio de las bases moleculares de la infertilidad humana, es la ausencia de sistemas de cultivo que reproduzcan la gametogénesis *in vitro*, y esto aplica también a la meiosis específicamente (Geisinger *et al.*, 2021). Por lo tanto, y en vista de las complejidades de la infertilidad humana, una opción esencial para abordar este desafío es utilizar modelos animales, especialmente los modelos murinos. Estos modelos ofrecen una gran similitud con los humanos en términos de fisiología reproductiva, y cuentan con una amplia disponibilidad de herramientas para la manipulación genética (Jamsai y O’Byran, 2011). El uso de modelos animales no sólo proporciona una plataforma para estudiar y comprender los mecanismos subyacentes de la infertilidad masculina, sino también para evaluar nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento.

CRISPR con los genes asociados (Cas) constituyen un sistema de respuesta inmune adaptativa presente en ciertos organismos procariontes. Su rol consiste en eliminar material exógeno invasor (Bolotin *et al.*, 2002; Jansen *et al.*, 2002). En la actualidad, CRISPR se ha convertido en la herramienta principal para la edición genética, permitiendo crear diversos modelos animales (Menchaca *et al.*, 2017). Este sistema (Jinek *et al.*, 2012) se compone de tres elementos principales: la endonucleasa Cas9, encargada de generar DSBs, un CRISPR RNA (crRNA) complementario al sitio objetivo, y un *trans-activating* RNA (tracrRNA), que se requiere para que el crRNA pueda unirse a la nucleasa. Para simplificar el sistema, ambos ARNs suelen unirse para formar un ARN guía (sgRNA).

Cas9 es dirigida a un lugar específico del genoma con una secuencia complementaria al ARN guía. En ese momento la nucleasa Cas9 provoca una DSB en el ADN, nucleótidos antes de la secuencia denominada PAM (Motivo Adyacente *Protospacer*). Este PAM es específico para cada Cas debido a su

organismo de origen; tal es el caso de la Cas9, derivada de *Streptococcus pyogenes*, siendo la secuencia PAM NGG, donde N representa cualquier desoxirribonucleótido (Mojica *et al.*, 2009). Luego de llevadas a cabo las rupturas en el ADN, el mecanismo de reparación celular del individuo a modificar se encarga de incorporar las alteraciones genéticas mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ, por “*Non-homologous End Joining*”), o mediante la reparación dirigida por homología (HDR, por “*Homologous Directed Repair*”).

NHEJ es una vía rápida y predominante en las células, pero poco fiel y propensa al error, que termina por introducir pequeñas inserciones y deleciones (“*indels*”) en la región de corte. Estas “*indels*” desorganizan la secuencia diana y generan mutaciones con cambios en el marco de lectura que provocan la pérdida de función del gen (*knock-out*) (Ghezraoui *et al.*, 2014).

Por otro lado, la HDR es una ruta más certera pero menos eficiente. Requiere un molde de ADN que, mediante recombinación homóloga, se incorporará al genoma. Este molde puede diseñarse para introducir una secuencia específica en cualquier región del genoma (Shao *et al.*, 2017). En este contexto, una estrategia posible para que prevalezca la vía de reparación HDR y generar modelos animales *knock-in* (por ejemplo, con la introducción de mutaciones específicas), es proporcionar al sistema un molde o ssODN (oligonucleótidos de cadena sencilla), además de los ARN guía y la nucleasa Cas9 (Qin *et al.*, 2015; Sternberg y Doudna, 2015).

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación, se generaron ratones de la cepa C57BL/6 con modificaciones genéticas homólogas a las reportadas para humanos por Maor-Sagie *et al.*, 2015, de la mutación *SYCE1* c.197-2A>G en el fenotipo observado de infertilidad masculina, mediante la tecnología de CRISPR/Cas9, y haciendo uso de la vía HDR.

## JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES DIRECTOS

El CS es esencial para el apareamiento y recombinación de los cromosomas homólogos durante la meiosis, lo que asegura la correcta segregación de los cromosomas en las células sexuales. Cualquier alteración en la dinámica o función de este complejo puede tener consecuencias significativas en la fertilidad masculina. Al profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares y las interacciones del CS, se pueden identificar nuevos blancos terapéuticos y estrategias para el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad idiopática. Además, estos hallazgos contribuyen al conocimiento más amplio sobre los procesos meióticos y la regulación de la fertilidad en los seres humanos, lo que tiene implicaciones importantes en el campo de la medicina reproductiva y la salud sexual.

Si bien existen antecedentes de la generación de ratones mutantes empleando sistemas de edición genómica para el estudio de mutaciones humanas causantes de patologías (e.g. Arimura *et al.*, 2005), los primeros estudios de este tipo para analizar mutaciones en genes para proteínas del CS en humanos pertenecen a nuestro grupo. En efecto, en un trabajo previo del grupo, se logró generar una línea de modelo de ratón humanizado que contiene otra mutación puntual en el gen *SYCE1* hallada en mujeres con POF (concretamente, la mutación c.721C>T) utilizando el sistema de edición genética CRISPR/Cas9 (Hernández López *et al.*, 2020). Dicho trabajo aportó una prueba de principio que validó la estrategia experimental aplicada para posibles estudios de otras mutaciones en genes de proteínas del CS vinculadas a infertilidad humana.

La presente tesis formó parte de un proyecto de investigación del grupo, en el cual se empleó el sistema de edición genómica CRISPR/Cas (Jinek *et al.*, 2012), para generar un modelo murino conteniendo una mutación (Min *et al.*, 2015) equivalente a la mutación c.197-2A>G reportada en humanos para el gen *SYCE1*.

El estudio de la mutación del gen *SYCE1* c.197-2A>G en hombres con infertilidad idiopática proporciona un valioso aporte al conocimiento molecular de las causas de esta condición, y el eventual diseño de terapias futuras.



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

**1:** La variante genética *SYCE1* c.197-2A>G, detectada en hombres que sufren infertilidad, cuando se presenta homocigosis es la responsable de la condición infértil para dichos individuos.

**2:** Mutaciones equivalentes en el ratón conducirán a un fenotipo infértil permitiendo evaluar las causas de la enfermedad relacionadas con la ausencia de un correcto producto del gen *SYCE1*, mediante la degradación de su ARN mensajero y/o la síntesis de una proteína truncada con una funcionalidad reducida.

**3:** Ratones con una mutación equivalente a la *SYCE1* c.197-2A>G presentarán alteraciones en el ensamblaje y funcionamiento normal del CS, permitiendo obtener conclusiones acerca de las causas y los mecanismos de este tipo de infertilidad.

### Objetivos

#### Objetivo general

Contribuir al avance del conocimiento molecular sobre las causas de un tipo de infertilidad idiopática masculina humana, así como a la comprensión de los mecanismos intrínsecos que rigen la dinámica del CS en condiciones de salud y enfermedad.

#### Objetivos específicos

- Estudiar un modelo murino "humanizado", en el cual se llevó a cabo una modificación por medio de la tecnología CRISPR/Cas para introducir una mutación para el gen *Syce1* homóloga a la reportada en pacientes hombres infértiles.
- Demostrar las causas subyacentes a este tipo de infertilidad hasta el momento clasificada como idiopática, empleando la línea de ratones mutantes generados.
- Determinar si las bases de la patología se vinculan a desajustes en el ensamblado del CS, su sinapsis y/o recombinación.
- Determinar si los mecanismos de la enfermedad involucran la producción de proteína aberrante, y/o la degradación de su transcripto.

- Utilizar el CS para la puesta a punto de metodologías de superresolución de *DNA-Paint*, e iniciar estudios mediante estas metodologías tendiendo a la profundización en el conocimiento de esta estructura, y su alteración en los casos de infertilidad en estudio (este objetivo no formaba parte del proyecto de tesis inicial, pero se incorporó durante el transcurso del mismo).

## METODOLOGÍA

### Animales y aprobación ética

Para el desarrollo de la investigación se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57BL/6. Estos ratones se obtuvieron en colaboración con la Unidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio (UBAL) del Institut Pasteur de Montevideo (IPMont). Los animales fueron producidos y mantenidos en dicha Unidad. El bioterio perteneciente a la UBAL posee la categorización de bioterio libre de patógenos específicos (SPF, “*Specific Pathogen Free*”). Para la realización de los experimentos descritos a continuación, los ratones fueron trasladados al Laboratorio de Biología Molecular de la Reproducción, Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, Montevideo, Uruguay).

Las características de alojamiento de los animales fueron las siguientes: jaulas ventiladas individualmente (Tecniplast, Milán, Italia), ambiente controlado con temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , humedad relativa del 40-60%, en un ciclo de luz/oscuridad de 14/10 h. Los alimentos fueron esterilizados en autoclave (Labdiet 5K67, PMI Nutrition, IN, EE. UU.), y el agua fue administrada a demanda.

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Ética Animal del IPMont - Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA), número de protocolo 007-18, de conformidad con la Ley Nacional de Experimentación Animal 18.611 (Uruguay) y las directrices internacionales para el cuidado de animales (Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, NRC, 1996). Los procedimientos experimentales con animales realizados en el IIBCE fueron aprobados por la CEUA-IIBCE (protocolo experimental aprobado 009/11/2016), en conformidad con la Ley Nacional 18.611, manteniendo las recomendaciones de la Comisión Nacional de Experimentación Animal de Uruguay (CNEA).

### Diseño de moléculas para mutagénesis

Se empleó la mutagénesis CRISPR/Cas con el objetivo de obtener una línea celular de ratón humanizada con una mutación puntual equivalente a la c.197-2A>G del gen *SYCE1* humano (Maor-Sagie *et al.*, 2015), que en el ratón corresponde a *Syce1* c.203-2A>G. Esta mutación afecta al sitio aceptor de

empalme del intrón 3-4. El diseño y la selección de las moléculas a utilizar en la mutagénesis dirigida se llevaron a cabo mediante la herramienta de diseño *GPP sgRNA Designer* del Broad Institute (MIT/Harvard, Cambridge, MA, EE. UU., <http://www.broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgrna-design>) teniendo en cuenta el *ranking* en el objetivo, fuera del objetivo y la distancia del ARN guía individual (sgARN) al sitio objetivo de mutagénesis. La síntesis del sgARN seleccionado se encargó a la empresa Synthego (Menlo Park, California EE. UU.), como parte del kit de sgARN sintético CRISPRRevolution. El ssODN empleado como plantilla para la reparación HDR se diseñó utilizando una estrategia para favorecer la HDR descrita por Prykhodzhiy y colaboradores en 2018. En resumen: se generó un oligonucleótido asimétrico antisentido copiando 36 nucleótidos hacia el extremo 5' desde el sitio de corte de Cas9 del filamento de ADN no complementario con el sgARN, y 90 nucleótidos en la misma dirección de ese filamento. Luego, se realizó la complementación inversa de esta secuencia. Se realizaron análisis mediante herramientas en línea para la identificación de mutaciones silenciosas (<http://watcut.uwaterloo.ca/template.php>) y la creación de sitios de enzimas de restricción ([nc2.neb.com/NEBcutter2/](http://nc2.neb.com/NEBcutter2/)). En base a estos análisis, se incorporó un cambio puntual que cumplía una doble función: por un lado, se creaba un sitio de restricción *EatI* no presente en el genoma WT, permitiendo la futura genotipificación de especímenes en base a los patrones de restricción obtenidos sobre fragmentos genómicos amplificados por PCR; por otro lado, se lograba la disrupción del PAM para que, una vez introducido el cambio deseado en el genoma murino, la enzima Cas9 no pudiera volver a cortar en ese sitio. El ssODN diseñado se encargó a Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, Iowa, EE. UU.) en forma de oligonucleótidos Ultramer de 4 nanomoles. El diseño del sgARN y ssODN se hallaban en proceso durante mi incorporación al grupo para dar inicio a esta tesis.

### Manipulación de ratones para la edición del genoma

La electroporación se realizó en cigotos C57BL/6J utilizando una mezcla de 20 ng/μL de sgARN, 30 ng/μL de ARN mensajero de Cas9 y 20 ng/μL de ssODN. El mismo día, los cigotos sobrevivientes se transfirieron a oviductos de hembras pseudopreñadas B6D2F1 de 0,5 días poscoito (dpc; promedio de 25 embriones

por hembra), siguiendo los procedimientos quirúrgicos establecidos en la UBAL (Crispo *et al.*, 2013). Previamente, las hembras receptoras fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (100 mg/kg, Pharmaservice, Ripoll Vet, Montevideo, Uruguay) y xilazina (10 mg/kg, Seton 2%; Calier, Montevideo, Uruguay). Se administró ácido tolfenámico por vía subcutánea (1 mg/kg, Tolfedine, Vetoquinol, Madrid, España) para proporcionar efectos analgésicos y antiinflamatorios (Schlapp *et al.*, 2015). El diagnóstico de preñez se efectuó mediante inspección visual realizada por un cuidador de animales experimentado dos semanas después de la transferencia de embriones, y el tamaño de la camada se registró a los 21 días posparto (dpp).

#### **Genotipado de ratones: amplificación por PCR estándar, purificación de bandas, secuenciación y análisis mediante enzimas de restricción.**

Con el objetivo de llevar a cabo el genotipado de los ratones, se utilizó la punta de cola de cada ratón. Puntas de cola de un tamaño aproximado de 0,5 cm de ratones de 20 dpp fueron seccionadas en la UBAL, y trasladadas al IIBCE para su procesamiento.

La extracción del ADN genómico fue llevada a cabo por medio del kit de purificación *GeneJET Genomic DNA Purification Kit K0721* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se cortó el tejido con un bisturí, y el tejido seccionado fue resuspendido en 180 µL de solución de digestión conteniendo 20 µL de proteinasa K (20 mg/mL) se agitó la mezcla con vortex, y se incubó a 56°C toda la noche. Seguido de esto, se agregaron 20 µL de solución de RNasa, y se prosiguió con el protocolo siguiendo las indicaciones establecidas en la guía del kit. Finalmente, se utilizaron 200 µL del buffer de elución contenido en el kit para obtener el ADN genómico purificado.

El ADN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.).

Para poder realizar la amplificación de la región específica en estudio se llevó a cabo PCR a tiempo final. La reacción se realizó en un termociclador Bioer Technology TC-24/H(b) (Bioer, Hangzhou, China), ya sea realizando una mezcla para PCR donde cada uno de los reactivos fue adicionado por separado (Tabla

2A), o utilizando el *PCR AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix*, de Thermo Fisher Scientific (Tabla 2B). El programa de PCR se puede apreciar en la Tabla 3.

Los cebadores específicos utilizados fueron:

- *Syce1-197-FOR*: 5' AGCTTCCTTTTTGCTTTGCAG 3'.
- *Syce1-197-REV*: 5' GGTTGGAGGAGAAGTCATGG 3'.

**Tabla 2.** Mezclas de PCR para amplificación de la región específica del gen *Syce1*.

A. Reactivos utilizados para PCR a tiempo final con la adición de cada solución por separado.

B. Reactivos utilizados para PCR a tiempo final con el Master Mix *AmpliTaQ Gold™ 360* de Thermo Fisher Scientific

A.		B.	
Reactivos	Volumen para reacción (1X)	Reactivos	Volumen para reacción (1X)
H <sub>2</sub> O	6 µl	H <sub>2</sub> O	10,7 µl
Ampli Taq	10 µl	Buffer PCR (10X)	2 µl
10 mM Primer F	1 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl
10 mM Primer R	1 µl	10 mM dNTPs	1 µl
ADN genómico	2 µl		
Volumen final de reacción	20 µl		

**Tabla 3.** Programa de PCR a tiempo final para genotipado

CICLO	TEMPERATURA °C	TIEMPO
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos
CICLOS X (33)	TEMPERATURA °C	TIEMPO
Desnaturalización	95°C	30 segundos
<i>Annealing</i>	57°C	30 segundos
Elongación	72°C	30 segundos
CICLO	TEMPERATURA °C	TIEMPO
Elongación final	72°C	5 minutos
Producto predicho de 593 bp		

Con el objetivo de identificar los individuos que incorporaron la mutación deseada, se procedió por medio de 2 metodologías diferentes. La primera de ellas se describe a continuación:

Para corroborar que la amplificación de los productos de PCR fuera correcta, los mismos fueron analizados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % en buffer TAE 1X con bromuro de etidio. Utilizando un transiluminador de luz UV se observaron las bandas, que fueron posteriormente recuperadas de la agarosa mediante el kit *GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro kit #K0831* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU). Se trabajó con hasta 200 mg de gel y se utilizó un bisturí o cuchilla limpia para cortar el fragmento de interés. Luego, el trozo de gel se colocó en un tubo de 1,5 mL, y se procedió a eluir el ADN siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante. El ADN se recuperó en 12 µL de buffer de elución, y se almacenó a -20 °C. La secuenciación bidireccional de las muestras amplificadas se realizó en la empresa MacroGen (Seúl, Corea del Sur) empleando los mismos cebadores que para las reacciones de PCR. Los cromatogramas resultantes se analizaron manualmente por medio de la utilización del software BioEdit, con el objetivo de determinar los cambios genómicos introducidos durante la edición en cada caso, e identificar el o los especímenes con la mutación deseada (ratón *Knock-in* fundador).

**Syce1 203-2A>G, SECUENCIA EDITADA ENTRE PRIMERS:**

AGCTTCCTTTTGGCTTTGCAGTGGGAAGCCTAGAGCCCCGGATTGAGGTCCTGATTAACCGTATTAATGAGGTTTCAGCAAGGTGAGCTCAGTGATTGGCTGCCATCCAGGACCAGCTACAAGTTTTAACTGGCCAGGCCAATAAAAAGTGGAATACAGGGGTCCTTGTTAAAGTCTCTGTAGTTATTTTCATGAGAGCATAAGTGCAGGGCCCTTCTGCCTGTAACCGCCATAGTCATTTGCCTGTGAACACAGCCCTGCTGCCACCCGAGCCTAGCAAGAAGGGCCAGGATTTAGAAAGCCTTGTTTCCTGCTTTGTAAATCTGGGCCCTCTAAGTTTTCTTTGGGGGGAGAGTGTGAAATCTCCTCATTTGTCTTGAGGCTGTACTTACCAAATGTCTGTCCCTCTCTTTGGTAAAGCAAAAAGAAAGCCAGTGAGGAGCTTGGAGAGGCCCAGACTGTCTGGGACAACCTGCAGAAGGAACTGGACTTACGTAAGTTAACTGAGAGTCACTAGAGGTTTCTATGATGCTTAGACTTCTAATGCAGTCCTGCAAACACCCGGGCCATGACTTCTCCTCCAACC

**Figura 8. Sitio de reconocimiento de la enzima Earl.**

El sitio de reconocimiento de la enzima se muestra subrayado y en cursiva. En rojo se observa el sitio específico de la mutación *Syce1* c.197-2A>G. En verde se aprecia la modificación introducida en la secuencia PAM, que a su vez origina el sitio de reconocimiento de *Earl* (en cursiva subrayado) y, finalmente, en verde oscuro se muestra la región correspondiente a los *primers*.

La segunda estrategia utilizada para la identificación de los individuos que incorporaron la mutación, se basó en ensayos de restricción empleando la enzima *EarI*, seguidos por la corrida electroforética de los productos de digestión en geles de agarosa al 1,5 % en *buffer* TAE 1X con bromuro de etidio. La enzima en cuestión reconoce su sitio de restricción creado durante la edición genómica (Figura 8), permitiendo la identificación de aquellos individuos con la edición deseada.

Para poder llevar a cabo este procedimiento, en primer lugar, fue necesaria la limpieza del producto de PCR obtenido, y para ello se utilizó el protocolo de limpieza de productos de PCR del kit *GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro kit #K0831* nombrado anteriormente. En un primer paso, se ajustó el volumen de la mezcla de reacción de PCR a 200  $\mu$ L utilizando agua libre de nucleasas o *buffer* TE, para luego proceder al protocolo de limpieza según las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se eluyó en 10  $\mu$ L de *buffer* de elución del kit.

**Tabla 4.** Reactivos para la reacción de digestión.

Con <i>EarI</i>	Sin <i>EarI</i>
5 $\mu$ l de ADN	5 $\mu$ l de ADN
1 $\mu$ l de 1X CutSmart Buffer	1 $\mu$ l de 1X CutSmart Buffer
3,7 $\mu$ l de Nuclease-free Water	4 $\mu$ l de Nuclease-free Water
0,3 $\mu$ l de <i>EarI</i>	
Volumen Final: 10 $\mu$ l	Volumen Final: 10 $\mu$ l

El proceso de digestión con la enzima *EarI* (New England Biolabs Ipswich, Massachusetts, EEUU) se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante; en la Tabla 4 se muestra el protocolo de digestión. Dicha enzima posee un sitio de reconocimiento CTCTTCN<sup>+</sup>NNN<sub>3</sub> presente en el genoma editado (ver Figura 8); al reconocer dicha secuencia, la enzima realiza un corte en el producto de PCR, generando fragmentos de 415 y 177 nucleótidos. Por el contrario, el sitio de restricción de esta enzima no se encuentra en el genoma WT, dado que se introdujo durante la edición empleando como molde el ssODN, como mencionamos más arriba. En consecuencia, el fragmento debería ser clivado únicamente en los mutantes. De este modo, se pudo determinar la presencia de



la mutación al correr el producto de esta reacción en un gel de agarosa, sin necesidad de secuenciar ADN de la totalidad de los individuos.

Debido a que los ratones mutantes homocigotas resultaron ser infértiles, el único mecanismo para obtener individuos homocigotos fue a través del cruzamiento de ratones heterocigotos de ambos sexos durante toda la duración de la tesis. Es por esta razón que el procedimiento de genotipado se llevó a cabo continuamente a lo largo del proyecto, hasta la obtención del material necesario para la realización de todos los experimentos.

### Ensayos de fertilidad

Con el objetivo de corroborar la hipótesis inicial, se procedió a la realización de ensayos de fertilidad de los ratones mutantes para *Syce1*. Para ello, se cruzaron ratones de 2 meses de edad, mutantes homocigotos y heterocigotos, con ratones WT.

Como grupos de control se utilizaron ratones WT de la misma camada. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada género, en parejas o harenes reproductores (dos hembras y un macho). Las parejas o harenes armados se mantuvieron en una misma jaula por un período de 2 meses, luego del cual los individuos que no tuvieron descendencia se consideraron infértiles.

### Análisis Histológico

#### Inclusión en resina epóxica

Los testículos enteros de individuos homocigotas se fijaron con una solución de glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato 0,1M a pH 6,8 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,05M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,05M), durante 12 horas a 4 °C. Considerando el tamaño comparativamente mayor de los testículos de individuos WT y heterocigotas, en estos casos fue necesario cortar en trozos de aproximadamente 10 mm<sup>3</sup> cada testículo a analizar.

Posteriormente, trabajando sobre hielo, cada muestra fue cortada en fragmentos de unos 3 mm<sup>3</sup>, los que se sumergieron en buffer fosfato, y se realizaron 5 lavados de 10 minutos cada uno en dicho buffer. Luego, la muestra fue posfijada durante 1 hora en tetróxido de osmio al 1% en buffer fosfato 0,1 M (pH 6,8), y lavada nuevamente 3 veces durante 10 minutos con buffer fosfato. Las muestras fueron deshidratadas en forma progresiva a temperatura ambiente utilizando concentraciones crecientes de etanol al 25% por 15 minutos, y al 50%,

75% y 100% durante 30 minutos cada una. Posteriormente a la deshidratación, se realizó inclusión en resina (Durcupan, ACM, Fluka, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EE.UU.). Dicha inclusión consistió en dos inmersiones de la muestra en acetona absoluta por 30 minutos cada una, y 4 infiltraciones de concentración progresiva (Durcupan/ acetona) en proporciones 1/3, 1/1, 3/1 por 30 minutos, y resina pura por 1 hora (Glauert y Lewis, 1998). A continuación, se rellenaron con resina pura los moldes conteniendo las muestras, y se formaron los bloques que se dejaron secar en la estufa a 65 °C por 2 días.

### Cortes Semifinos

A partir de los bloques resultantes, y utilizando un ultramicrotomo Power Tome XL (Boeckeler Instruments, Tucson, Arizona, EE. UU.), se realizaron cortes de 250 nm de espesor. Los cortes se fijaron sobre portaobjetos, se tiñeron con solución de azul de toluidina al 1% y se examinaron en microscopio óptico de campo claro. Se hizo un registro fotográfico de las muestras utilizando un microscopio NIKON ES2000 con una cámara Micrometrics 319CU 3.2M CMOS (Ottawa, Ontario, Canada), y las imágenes fueron procesadas con el software Micrometrics SE Premium 4. Las escalas utilizadas para obtener medidas de referencia fueron obtenidas de la misma manera, y las mediciones correspondientes fueron realizadas con el software Fiji/ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012).

### Análisis por citometría de flujo (CMF)

#### Suspensión de células testiculares

Se emplearon ratones adultos de 27 semanas de edad. Las suspensiones de células testiculares se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2013. Los testículos se disecaron y se colocaron en una placa de Petri de vidrio de 96 mm sobre hielo, conteniendo 10 mL de DMEM (Sigma-Aldrich D0822) suplementado con suero fetal bovino al 10%. Se retiró la túnica albugínea y se cortaron los testículos en trozos de 0,02 a 0,03g. A continuación, el tejido fue procesado indistintamente por uno u otro de dos métodos diferentes: el primero, disgregación mecánica, y el segundo, disgregación enzimática.

La disgregación mecánica se llevó a cabo en un equipo Medimachine (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EE. UU.), en unidades disgregadoras descartables (Medicons, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.). Se

colocaron entre 3 y 4 trozos de tejido en 1 mL de DMEM, y con el disgregador encendido se procesaron durante 60 segundos.

El protocolo de preparación de suspensiones celulares por disgregación enzimática del tejido fue llevado a cabo mediante una modificación del protocolo descrito por Gaysinskaya *et al.*, 2015. Luego de la eutanasia de los ratones y su disección testicular, los testículos se trasladaron a una placa de Petri conteniendo PBS 1X. Se removió la túnica albugínea, e inmediatamente fueron transferidos a un tubo conteniendo 6 mL de solución DMEM/colagenasa/DNAsa (medio DMEM, colagenasa 200 U/ml, DNAsa I 5 µg/mL, CaCl<sub>2</sub> 1,5mM). Los testículos fueron incubados por 10 minutos a 35 °C con agitación a 60 rpm, y en la mitad se pipeteó gentilmente 5 veces con pipeta Pasteur estéril. Luego se sedimentaron los túbulos colocando el tubo verticalmente por 2 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante enriquecido en células intersticiales, fue retirado entonces con pipeta Pasteur y descartado. A continuación, se adicionaron 6 mL de solución DMEM/colagenasa/DNAsa precalentada a 35°C, pipeteando gentilmente 10 veces con pipeta Pasteur, y se incubó por 12 minutos a 35 °C con agitación a 60 rpm. Posteriormente, se agregaron 60 µL de tripsina 2,5% al tubo, se pipeteó nuevamente 10 veces con pipeta Pasteur, y se incubó por 12 minutos a 35 °C con agitación a 60 rpm. Luego de pipetear la suspensión final otras 10 veces con pipeta Pasteur, se agregaron 600 µL de suero fetal bovino para inactivar la tripsina, mezclando por pipeteo.

Independientemente de que la suspensión celular se hubiera generado por el método mecánico o enzimático, la suspensión resultante se colectó con una jeringa de 3-5 mL y se filtró a través de una malla de 50 µm humedecida previamente con 0,5 mL de DMEM.

A continuación, se realizó un segundo filtrado con malla de 50 µm, y se mantuvo en hielo. Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer, y se ajustó la concentración celular a  $1-2 \times 10^6$  células/mL con DMEM. Finalmente, se tiñó con *Vybrant Dye Cycle Green* (VDG, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.) 10 µM, y se mantuvo en agitación suave a 60 rpm a 35 °C por una hora, y luego a temperatura ambiente, protegido de la luz hasta su medición.

### Análisis citométricos

Los análisis se realizaron en el Servicio de Citometría de flujo y Clasificación Celular (SECIF) del IIBCE, en un citómetro de flujo y clasificador celular MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter, Brea, California, EE. UU.), usando un láser de 488 nm, boquilla de 100  $\mu\text{m}$  (25 psi) y el software Summit (Beckman Coulter). La calibración y el control de calidad del equipo se realizaron utilizando partículas fluorescentes *Ultra Rainbow* de 3,0  $\mu\text{m}$  (Spherotech, Lake Forest, Illinois, EE. UU.). La fluorescencia emitida por el VDG se detectó con un filtro de banda 513/26. Se registraron los siguientes parámetros: dispersión frontal (*FSC-Height* con máscara P1), dispersión lateral (*SSC-Height*), 513/26 área de pulso (intensidad de fluorescencia VDG), y 513/26 ancho de pulso. Los dobletes se excluyeron usando gráficos de puntos de 513/26 área de pulso vs 513/26 ancho de pulso. Los datos de CMF se analizaron con el software Kaluza (Beckman Coulter, Brea, California, EE. UU.).

### Ensayos de inmunofluorescencia

#### Anticuerpos

Se encargó el desarrollo de un anticuerpo comercial anti-SYCE1 dirigido a la región N-terminal a la empresa GenScript con sede en Piscataway, Nueva Jersey, EE. UU. Para la detección de la variante de histona anti- $\gamma\text{H2AX}$ , se adquirió un anticuerpo disponible comercialmente. Además, se utilizaron anticuerpos primarios donados por el Dr. Ricardo Benavente de la Universidad de Würzburg, Alemania, contra los componentes del CS SYCP1, SYCE3 y TEX12. Sumado a esto se utilizaron anticuerpos de producción comercial para Caspasa3, SYCP1, SYCP3 y SIX6OS1. Asimismo, se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a los fluorocromos AlexaFluor (AlexaFluor488, AlexaFluor633 y AlexaFluor546).

Los distintos anticuerpos empleados, su procedencia, dilución de uso, y demás características, se listan en la Tabla 5.

**Tabla 5. Anticuerpos utilizados en este trabajo.**

A. Anticuerpos Primarios					
Anticuerpo	Origen y número de catálogo	Especie	Inmunógeno	Dilución de uso	Aplicaciones
Anti-SYCE1	GenScript (Piscataway, Nueva Jersey, EE. UU.)	Conejo	Péptidos ATRPQPLGMEPEGSC y CPEGARGQYGSTQKI de la parte N-terminal de la proteína, conjugado con KLH	1:200 (microscopía de fluorescencia) / 0,3 µg/mL (Western blot)	Microscopía de fluorescencia y Western blot
Anti-SYCP3	Cedido por el Dr. Ricardo Benavente ( <i>Alzheimer M., et al 1996</i> )	Cobayo	Péptido aa 27-38 de SYCP3 de rata	1:200	Microscopía de fluorescencia
Anti-SYCP3	Abcam (Abcam Antibodies, Cambridge, Reino Unido) ab97672	Ratón	Proteína recombinante de tamaño completo.	1:100	Microscopía de superresolución
Anti-SYCP1	Cedido por el Dr. Ricardo Benavente ( <i>Ollinger R., et al 2005</i> )	Conejo	Péptido aa 1-124 de SYCP1 de ratón	1:200	Microscopía de fluorescencia y de superresolución,
Anti-SYCE3	Cedido por el Dr. Ricardo Benavente (Schramm S., <i>et al.</i> , 2011)	Conejo	Proteína SYCE3 entera (88aa) de ratón	1:200	Microscopía de fluorescencia
Anti-TEX12	Cedido por el Dr. Ricardo Benavente (Hamer G., <i>et al.</i> , 2006)	Cobayo	Proteína entera de ratón	1:200	Microscopía de fluorescencia
C14orf39	Proteintech Group (Rosemont, Illinois, EE. UU.) 22664-1-AP	Conejo	Proteína de fusión C14orf39 expresada en E. coli.	1:200	Microscopía de fluorescencia
Anti-γH2AX	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, EE. UU.) BLR053F	Conejo	Péptido que rodea la serina fosforilada 140 de la histona H2AX humana.	1:500	Microscopía de fluorescencia
Anti-β-tubulina	Abcam (Abcam Antibodies, Cambridge, Reino Unido) ab6046	Conejo	No especificado	1:8.000	Western blot
Caspasa 3	Abcam (Abcam Antibodies, Cambridge, Reino Unido) Ab52293	Conejo	Peptido sintético derivado de la Caspasa 3 Humana.	1:200	Microscopía de fluorescencia

B. Anticuerpos Secundarios				
Anticuerpo	Origen y número de catálogo	Especie	Dilución	Aplicación
AlexaFluor488	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, EE. UU.) A11073	Cabra	1: 800	Microscopía de fluorescencia
AlexaFluor633	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, EE. UU.) A2107	Cabra	1: 800	Microscopía de fluorescencia
AlexaFluor488	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, EE. UU.) A11034	Conejo	1: 800	Microscopía de fluorescencia
AlexaFluor633	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, EE. UU.) A2107	Conejo	1: 800	Microscopía de fluorescencia
Anticuerpo acoplado a peroxidasa de rábano	Pierce, Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, EE. UU.) 34085	Conejo	1:30000	Western blot

### Preparación de criosecciones

A partir de testículos de ratones de entre 11 y 12 semanas, se generaron bloques de tejido para criosecciones. Posteriormente a la eutanasia y dislocación cervical, se realizó la disección de los testículos. Sin quitar la túnica albugínea, se cortaron al medio para el caso de individuos mutantes heterocigotas y WT, mientras que para individuos mutantes homocigotas se utilizó testículo entero, dado el menor tamaño de los mismos. Posteriormente se colocaron en PFA 4% en solución PHEM 1X pH 7,4 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizó un lavado en PHEM 1X por 10 minutos a temperatura ambiente. Con el fin de crioproteger, el tejido se infiltró primeramente en una solución de sacarosa 15% en PHEM 1X a temperatura ambiente, hasta que el tejido se hundió en el fondo del tubo. Se traspasó luego a una solución de sacarosa 30% en PHEM 1X, y se dejó toda la noche a 4 °C, de modo que el tejido nuevamente se hundiera al fondo del tubo. Al día siguiente, se incubaron durante 30 minutos a 4 °C en una mezcla 50% sacarosa al 30%: 50% medio de congelación (Jung, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Alemania). Finalmente, se colocaron los fragmentos de tejido en soportes conteniendo medio de congelación y se cubrieron por completo con el medio. Se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se almacenaron a -80 °C. Las criosecciones de testículo se realizaron en un crióstato SLEE modelo MEV (SLEE medical GmbH, Alemania),

con un espesor de 10  $\mu\text{m}$ , y se depositaron sobre portaobjetos tratados previamente con poli-L-lisina 0,01% (Sigma-Aldrich) según los métodos convencionales. Los portaobjetos conteniendo los cortes se guardaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### Preparación de esparcidos (“*spreading*”)

Suspensiones celulares de testículo se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y se resuspendieron en aproximadamente 50-100  $\mu\text{L}$  de PBS para obtener una concentración cercana a  $3 \times 10^7$  células/mL. Los esparcidos celulares fueron preparados según fuera descrito por De Boer *et al.*, 2009, de manera que la suspensión celular fue tratada con buffer hipotónico (30 mM TrisHCl pH 8,2, 17 mM citrato de sodio, 5 mM EDTA, 50 mM sacarosa, 5 mM DTT) por 30 minutos a temperatura ambiente en proporción 1:1. El tratamiento hipotónico fue detenido agregando 1 volumen de sacarosa 100 mM. Posteriormente, los portaobjetos fueron sumergidos en una solución fresca de paraformaldehído (PFA) (1% PFA, 0,15% Tritón-X100, pH 9,2) y se inclinaron para que se formara una gota sobre una de las esquinas. Sobre esa misma esquina se depositó una alícuota de las células en suspensión (40  $\mu\text{L}$ ), mediante movimientos suaves de inclinación se dejó dispersar el material, y luego se llevó a cámara húmeda cerrada por 2 horas. Posteriormente, se realizó secado lento a temperatura ambiente por 30 minutos con cámara entreabierta. Finalmente, se dejaron secar a temperatura ambiente, protegidos del polvo. Una vez secos, los portaobjetos resultantes fueron, o bien usados inmediatamente para procedimientos de inmunofluorescencia, o envueltos en papel aluminio y almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

#### Incubación con anticuerpos sobre *spreading*

Los esparcidos de células de testículo realizados previamente se dejaron llegar a temperatura ambiente, y se realizaron 3 lavados sucesivos de 5 minutos cada uno con PBS. Se cubrieron los portaobjetos con 500  $\mu\text{L}$  de solución de bloqueo [5% leche descremada en polvo, 5% suero fetal bovino, 0,01%  $\text{NaN}_3$ , 1mM PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoruro; este último componente se agregó antes de usar, a partir de una solución stock de PMSF 1mM en DMSO, pH 7,4] que fue previamente centrifugada durante 30 minutos a 16.000 g a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes de su uso, y se incubó 30 minutos en cámara húmeda cerrada a temperatura ambiente. En

todos los pasos en que fue utilizada esta solución de bloqueo, ésta se centrifugó inmediatamente previo a su uso.

Todas las incubaciones con anticuerpos primarios se realizaron a las diluciones indicadas en la Tabla 5 durante 12-16 horas a 4 °C, en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma P2714; Sigma-Aldrich). Por cada portaobjetos, se cargaron 100 µL de la dilución adecuada de cada anticuerpo primario en solución de bloqueo. Seguidamente, se transfirieron a una cámara húmeda y se dejaron en incubación. Transcurrido este tiempo se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS, y se volvió a bloquear con 500 µL de solución de bloqueo cada portaobjetos, por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Las incubaciones con los anticuerpos secundarios se realizaron a temperatura ambiente durante 1 hora protegidas de la luz, en las diluciones correspondientes (ver Tabla 5). A continuación, se realizaron lavados (3 x 5 minutos) con PBS, seguidos por un enjuague en H<sub>2</sub>O destilada. Luego se realizó una tinción con DAPI 10µg/mL durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se montó con *ProLong Diamond Antifade* (Thermo Fisher Scientific), se cubrió con un cubreobjetos y se selló con esmalte.

#### Incubación con anticuerpos sobre criosecciones.

En primer lugar, se extrajeron cortes del congelador y se dejaron hidratando en buffer PHEM (PIPES 60mM, HEPES 25mM, EGTA 20mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron permeabilizadas en PHEM con 0,1% de Tween 20 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la permeabilización, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno en PHEM. Luego, las muestras se sometieron a un bloqueo en una solución de PHEM que contenía 5% de suero fetal bovino, 0,1% de albúmina sérica bovina y 50 mM de glicina durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se procedió nuevamente con tres lavados de 5 minutos cada uno en PHEM. A continuación, se bloquearon los grupos aldehídos y cetona libres utilizando PHEM con 1% de borohidruro de sodio durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubó el anticuerpo primario a 4 °C en solución de bloqueo durante 12 horas. Después de la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno en PHEM con 0,1% de Tween 20 y 50 mM de glicina. Se incubó el anticuerpo secundario durante 1 hora a



temperatura ambiente en una solución de bloqueo, y se llevaron a cabo nuevamente tres lavados de 10 minutos en la misma solución de lavado. Las muestras se tiñeron con DAPI 10 µg/mL durante 10 minutos a temperatura ambiente, se montaron con *ProLong Diamond Antifade* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU), se cubrieron con un cubreobjetos y se sellaron con esmalte.

### Microscopía confocal de fluorescencia: cuantificación y análisis de imágenes

Las adquisiciones de microscopía de inmunofluorescencia se realizaron por medio de un microscopio confocal Zeiss LSM 800 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemania) equipado con un módulo de procesamiento *Airyscan*, un objetivo de inmersión de aceite Apochromat Plan 63X / 1.4 NA, cámara digital en color AxioCam 506 y software ZEN Blue 2.3 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemania). El procesamiento de imágenes de *Airyscan* se realizó a través del paso de deconvolución automática del software. Todos los análisis de imágenes se realizaron mediante el software Fiji ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012) y ZEN Blue 2.3 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemania).

La cuantificación de las imágenes mediante el programa Fiji se llevó a cabo de la siguiente manera: Se inició el proceso abriendo la imagen de interés en el software Fiji. Luego, dentro de la pestaña Image se seleccionó "Color" y "Split Channels" en el menú de la imagen. Posteriormente, se duplicó el canal de DAPI o de la proteína SYCP3 utilizando la función "Duplicate" o la combinación de teclas Ctrl+Shift+D. Se utiliza el canal de SYCP3 para la cuantificación en elementos del CS ya que la proteína corresponde a los EL, razón por la cual, al realizar la máscara sobre ella estaríamos incluyendo todos los elementos posibles que se encuentren en la imagen correspondientes al CS. En el caso de que no existiese marca de referencia del elemento lateral se utilizó la señal a cuantificar para realizar la máscara.

Una vez duplicado el canal de DAPI o de SYCP3, se procedió a crear una máscara en una de las copias del canal. Esto se realizó ajustando el umbral de la imagen mediante la opción "Threshold" bajo el menú "Adjust". Para la correcta realización de la máscara se ajustó el contraste y el brillo en la imagen utilizando las funciones correspondientes en el menú "Adjust" para obtener una máscara

más precisa. Con el objetivo de mejorar la máscara también se realizaron procesos de procesamiento binario sobre la misma, tales como "Watershed" y "Fillholes" cuando fuese necesario.

Para poder realizar las mediciones correspondientes en la etapa de análisis se utilizó la función "Analyze Particles", para detectar y analizar las partículas presentes en la imagen. Se marcó el tamaño deseado dependiendo de la imagen que se analizara, y se añadieron las partículas al gestor de análisis.

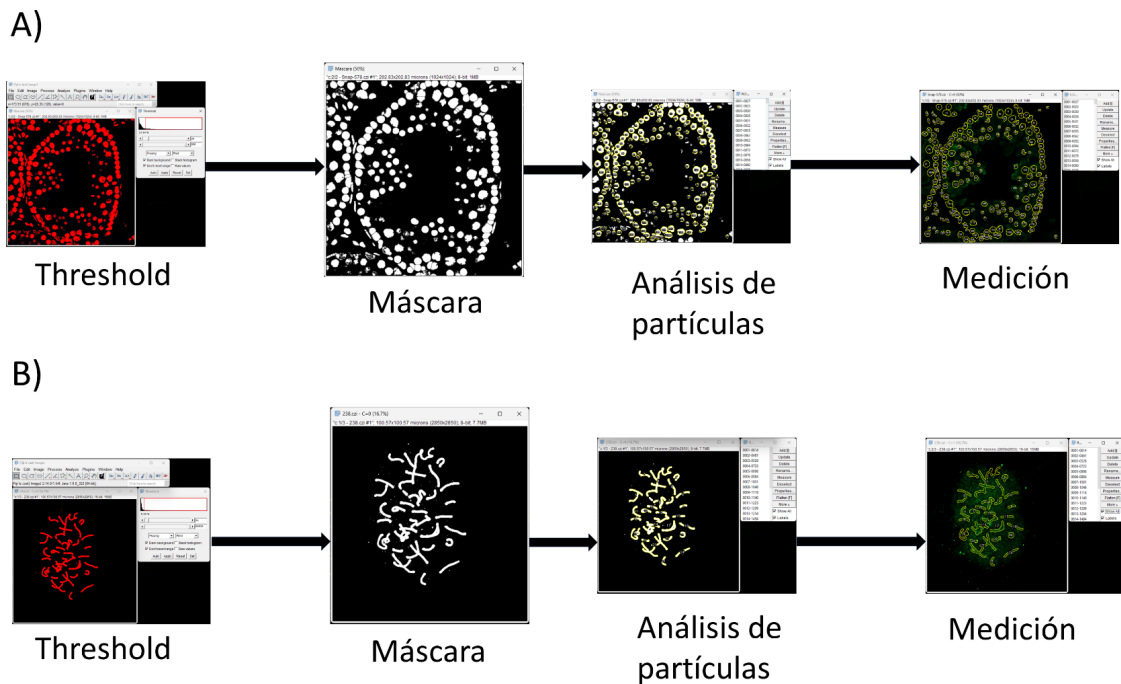
Una vez minimizado el gestor de análisis de partículas, se abrió la imagen que se buscaba cuantificar y en el ROI manager se marcó la opción "Show All". Se procedió entonces a medir la intensidad de fluorescencia, agregando los conjuntos media de intensidad /área, y el valor mínimo y máximo de intensidad por área.

Posteriormente, se seleccionó y copió la información relevante y se continuó con el procesamiento estadístico.

El macro utilizado para el procesamiento puede verse a continuación:

```
run("Duplicate...", "title=Mascara");  
setAutoThreshold("Huang dark no-reset");  
//run("Threshold...");  
setAutoThreshold("Huang dark no-reset");  
setOption("BlackBackground", true);  
run("Convert to Mask");  
run("Fill Holes");  
run("Watershed");  
run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity display exclude add");
```

El flujo de trabajo de la cuantificación se puede apreciar en la Figura 9.



**Figura 9. Flujo de trabajo para la cuantificación de fluorescencia**

A) Cuantificación de Fluorescencia para túbulos seminíferos

De izquierda a derecha, proceso utilizado para la cuantificación de fluorescencia cuando se trabajó con imágenes correspondientes a túbulos seminíferos.

B) Cuantificación de Fluorescencia para elementos del CS

De izquierda a derecha, proceso utilizado cuando se trabajó con imágenes correspondientes *spreading*, donde se buscó cuantificar la fluorescencia del CS.

## Ensayo de TUNEL (“Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling”)

Para la realización de los ensayos de TUNEL se utilizaron criosecciones de testículo de individuos WT, heterocigotas y homocigotas para la mutación *SYCE1* c.197-2A>G con aproximadamente 12 semanas edad. Los cortes fueron hidratados durante 20 minutos en PBS a temperatura ambiente, y permeabilizados durante 2 minutos a 4 °C en Tritón X-100 0,1% y citrato de sodio 0,1% en PBS. Posteriormente, los cortes fueron lavados 2 veces durante 5 minutos en PBS e incubados con la reacción de TUNEL (*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*, Roche, Basilea, Suiza.11684795910) durante 1 hora a 37 °C protegidos de la luz. En última instancia se realizó una tinción con DAPI 10µg/mL durante 10 minutos a temperatura ambiente y se montó con *ProLong Diamond Antifade* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU), se cubrió con un cubreobjetos y se selló con esmalte.

### Electroforesis de proteínas y Western-blot

Para la realización del experimento, los testículos se disecaron, se les extrajo la túnica albugínea, y se disgregaron mecánicamente en buffer de muestra (Tris base 250 mM, SDS 10%, glycerol 50%, DTT 500 Mm, Bromophenol blue 0,5%), por pipeteado. En el caso de los individuos homocigotas se procesó el testículo entero, y en el caso de individuos WT y heterocigotas se procesaron fragmentos igualados al peso de los testículos de individuos homocigotas (~0.02g – 0.03g).

Los lisados de proteínas correspondientes a  $7,5 \times 10^5$  células en tampón de muestra fueron cargados en geles de SDS-PAGE al 16%, y se corrieron en Tris-glicina (Tris pH 8,5 250 mM, Glicina 1,12 M) a 110 V hasta el borde del gel apilador, y luego a 100 V hasta que la línea azul quedara a aproximadamente 2 cm del borde inferior del gel. La elección de geles de alta concentración de poli-acrilamida, así como el control estricto de la longitud de la corrida, fueron para que la proteína trunca esperada que, como se recordará, poseería sólo 66 aa, quedara retenida dentro del gel.

Los geles de proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Amersham Protran (Sigma-Aldrich) mediante transferencia líquida, por el método convencional (Matsudaira, 1987) a una tensión de 100V durante 40 minutos empleando Buffer Towbin (0,025 M Tris, 0,192 M glicina, 20% metanol) como

buffer de transferencia. Se utilizó para la transferencia el sistema de transferencia *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, California, Estados Unidos). Aquí también se optimizó el tiempo de transferencia, para asegurarnos de que, en caso de hallarse presente una banda correspondiente a la proteína trunca, la misma quedara retenida en la membrana. Luego de la transferencia, las membranas se tiñeron durante 5 minutos en solución de Rojo Ponceau S (Sigma-Aldrich) al 0,1% en ácido acético para verificar la calidad de la misma.

Las membranas bloquearon a 4 °C en TBST (100Mm Tris pH 7,4, 1,5 M NaCl, 1% Tween 20) + leche 10% durante 12 horas. Al día siguiente, las membranas en TBST/leche se incubaron a temperatura ambiente durante una hora con agitación. Después de realizar dos lavados breves con TBST, se procedió a incubar las membranas con el anticuerpo primario (anti-SYCE1, o anti-  $\beta$ -tubulina como control de carga) en las concentraciones adecuadas (ver Tabla 5) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Se realizaron dos lavados de 15 minutos con TBST, y se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (ver Tabla 5) en TBST/leche. Después de realizar dos lavados de 15 minutos con TBST, se reveló mediante el kit *SuperSignal West Pico* (Pierce, Thermo Fisher Scientific), dejando actuar la solución reveladora durante 5 minutos. Finalmente, las imágenes se visualizaron en el equipo Ibright 1500FL (Thermo Fisher Scientific), mediante la opción para quimioluminiscencia.

### Ensayos de RT-qPCR

La extracción de ARN total a partir de testículo entero, se llevó a cabo utilizando el kit *PureLink RNA Mini Kit* (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), en condiciones estériles y libres de ARNAsas. En primer lugar, el tejido, desprovisto de la túnica albugínea, se homogeneizó mediante homogeneizador manual de émbolo dentro de un tubo eppendorf. El lisado fue transferido a un tubo nuevo y se procedió siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ARN se eluyó en un volumen final de 25  $\mu$ L de agua estéril libre de ARNAsas, y la cuantificación se realizó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

Se empleó el kit *Power SYBR Green Cells-to-Ct* de Ambion para llevar a cabo la retrotranscripción y qPCR, utilizando 50 ng de ARN como material inicial, y realizando la reacción de retrotranscripción en un volumen de 20 µL. El procedimiento recomendado por el kit se ejecutó en un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.). Durante la fase de qPCR, se introdujeron 2 µL de ADN complementario (reacción de RT) en un volumen total de 20 µL, y el protocolo se siguió de acuerdo con las instrucciones del kit.

Se realizaron tres réplicas biológicas y se seleccionó el gen *Surf4* como gen normalizador, dado que, en un trabajo previo del grupo (Trovero *et al.*, 2020), ya se había visto que sus niveles de expresión no varían entre poblaciones testiculares, ni entre distintas condiciones del testículo. Se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001), y se utilizó el ARN de los ratones WT como condición calibradora.

Los juegos de iniciadores utilizados se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Cebadores usados en qPCR

Cebadores	Transcripto	Secuencia 5' - 3'
Syce1-FOR	<i>Syce1</i>	GTTGGGTATGGAGCCCGAG
Syce1-REV	<i>Syce1</i>	GGCTCTAGGCTTCCCACTTTC
Surf4-FOR	<i>Surf4</i>	TGCTTTGGGCTGTTTGGGAATC
Surf4-REV	<i>Surf4</i>	GGTTGGGACACCAGCAAACA

### Análisis estadísticos

En cuanto a los datos cuantitativos obtenidos a partir de peso testicular, morfometría e intensidad de fluorescencia de los diferentes individuos, se utilizó una prueba de Mann-Whitney para comparaciones pareadas en el programa graphPad. En el mismo se realizaron comparaciones de individuos WT con individuos heterocigotas u homocigotas. Finalmente se compararon también los individuos heterocigotas con individuos homocigotas.

Con respecto a los datos de intensidad de fluorescencia de RT-qPCR, se calculó la significancia estadística y el valor  $p$  en graphPad por medio de un test de Student paramétrico para comparar 2 variables, en este caso contraponiendo los valores obtenidos de individuos WT o heterocigotas contra individuos mutantes homocigotas.



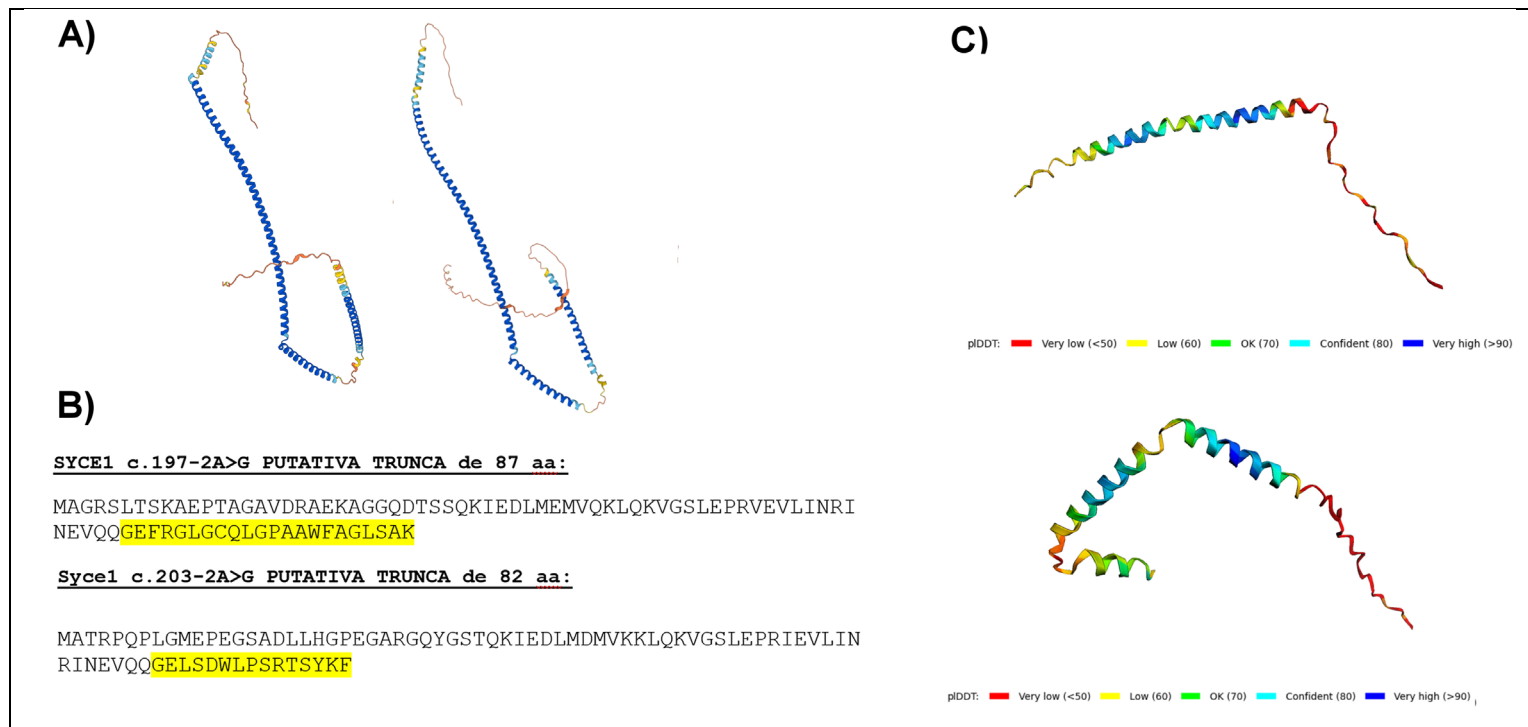


humanizados deseada se encontraba en proceso en el grupo de investigación, actividad a la cual me incorporé.

En humanos la mutación *SYCE1* c.197-2A>G corresponde a una alteración de un sitio aceptor de *splicing* en el intrón 3-4, tal como fue descrito por Maor Sagie en 2015. Con el objetivo de corroborar la viabilidad del estudio de esta mutación humana en modelos murinos, se procedió a la comparación de la secuencia génica entre humanos y ratones (Figura 10, A y B). Se constató un elevado porcentaje de identidad a nivel de la secuencia codificante del gen y en particular, la ubicación del sitio aceptor de *splicing* del intrón 3-4 también se encuentra conservada (Figura 10C).

Este hecho nos permitió generar modelos murinos humanizados con una mutación equivalente a *SYCE1* c.197-2A>G reportada en humanos (mutación *Syce1* c.203-2A>G), para su estudio.

En humanos la proteína canónica *SYCE1* posee 351 aa, mientras que dicha proteína presenta 329 aa para el caso del ratón. En humanos la mutación afecta a la proteína a partir del residuo 65, en el ratón la mutación equivalente lo hace a partir del residuo 67; debido a este cambio en el sitio aceptor de *splicing*, el intrón 3-4 no se podría procesar, y la traducción continuaría dentro del intrón hasta la aparición de un codón de terminación. En consecuencia, la nueva proteína putativa contendría unos 15 aa que no se encuentran presentes en la proteína canónica. La mutación conduciría entonces a una proteína putativa trunca de 82 aa, en comparación con la versión WT de 329 aa (Figura 11).



**Figura 11. Comparación de proteína SYCE1 canónica en el ratón y la proteína predicha resultante de la mutación *Syce1* c.203-2A>G.**

- A) Predicción de la estructura tridimensional de la SYCE1 canónica para humano (derecha) y ratón (izquierda).
- B) Se muestran las secuencias aminoacídicas de las proteínas SYCE1 trunca para la mutación *Syce1* c.197-2A>G en humano y, *Syce1* c.203-2A>G en ratón. En amarillo se muestra la secuencia de aminoácidos presentes en la proteína trunca que no se encuentran en la proteína canónica.
- C) Se muestra la estructura predicha para la proteína trunca llevada a cabo por AlphaFold2. Ratón (Superior), humano (Inferior).

Por medio de la utilización del sistema de edición génica CRISPR/Cas9 se generó una línea de ratones mutantes que imitan la mutación *SYCE1* c.197-2A>G encontrada en humanos. Con ese objetivo, se diseñaron el sgRNA y ssODN con las modificaciones indicadas en Materiales y Métodos, y se procedió según lo descrito en dicha Sección.

**Individuos homocigotas, heterocigotas y WT fueron genotipados e identificados por secuenciación y ensayos con enzimas de restricción.**

Como se describe en la metodología, los cigotos microinyectados con la Cas9, sgRNA y ssODN se transfirieron a hembras receptoras, para obtener la primera generación (F0). El genotipado de los individuos resultantes de esta primera generación lo realizamos mediante secuenciación Sanger de productos de PCR amplificados a partir de su ADN genómico obtenido de biopsias de cola. El análisis manual de los cromatogramas nos permitió determinar los cambios introducidos durante la edición genómica en cada caso. Una vez identificado el

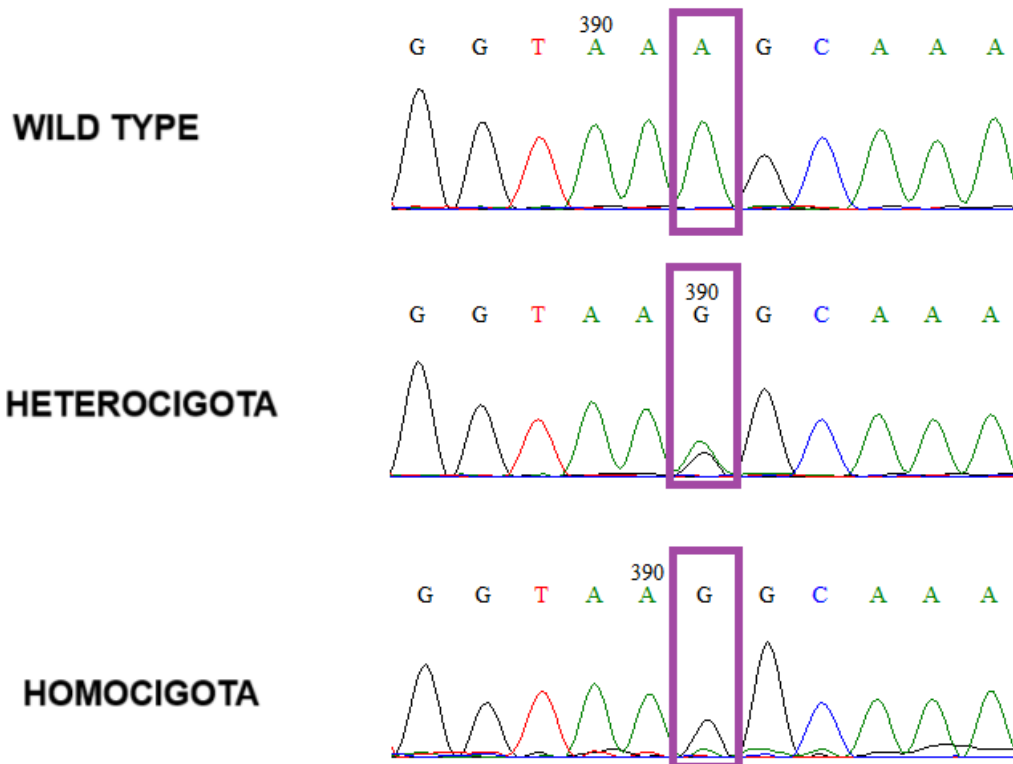
ratón con la mutación deseada, se cruzó con hembras WT, para obtener la generación F1. Posteriormente, los ratones de la generación F1 que resultaron heterocigotas para la mutación, se cruzaron entre sí para generar descendencia (F2).

Los genotipados de estas primeras generaciones se realizaron mayormente mediante secuenciación a partir de ADN genómico extraído de biopsias de cola de juveniles de 23 *dpp*. Una vez confirmada la presencia y correcta transmisión de la mutación deseada, las generaciones siguientes fueron genotipadas a partir del patrón de digestión obtenido con la enzima de restricción *EatI*. A continuación, se describen los resultados obtenidos con cada uno de estos métodos.

#### Resultados de la Secuenciación de ADN:

Para los individuos fundadores, obtenidos directamente de la microinyección (F0), las crías obtenidas de los cruzamientos de la F0 (F1), así como para los primeros descendientes de estos cruzamientos (F2), las muestras de ADN fueron amplificadas mediante PCR con los cebadores específicos (*Syce1-197-FOR* y *Syce1-197-REV*, ver Materiales y Métodos). Las bandas de PCR fueron eluidas del gel y secuenciadas mediante el método de Sanger. A partir de la generación F2, tras el análisis de los cromatogramas resultantes, se obtuvieron los siguientes resultados, como se puede apreciar en la Figura 12:

- Individuos que no presentaban la mutación esperada en el sitio de interés. Las secuencias coincidían con la secuencia de referencia sin mutación (WT para la mutación).
- Individuos en los que, en una de las dos copias del gen, la secuencia correspondía a la mutación, mientras que en la otra copia, la secuencia era la misma que la de los individuos WT (mutantes heterocigotas).
- Individuos en los que ambas copias del gen mostraban la mutación deseada (mutantes homocigotas).

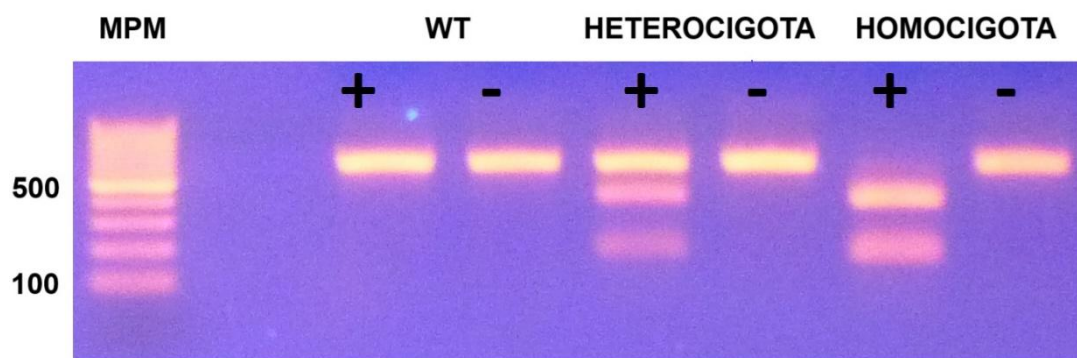


**Figura 12. Análisis de cromatogramas representativos, obtenidos a partir de la secuenciación de los productos de PCR amplificados de individuos estudiados.**

En la figura se muestran los 3 fenotipos obtenidos. El recuadro señala el sitio de la mutación (WT: pico en A; heterocigota: pico bimodal A/G; mutante homocigota: pico G).

### Resultados de la Digestión con *EarI*:

Como hemos mencionado, dado que los mutantes homocigotas resultaron infértiles (ver más adelante), fue necesario realizar el genotipado de cada individuo en las generaciones subsiguientes, a lo largo de todo el proyecto. Por lo tanto, a los efectos de simplificar el genotipado, una vez confirmado que los heterocigotas seleccionados para cruzamiento presentaban incorporado el sitio de restricción, se procedió a genotipar mediante la digestión con *EarI*.



**Figura 13. Análisis de restricción de las muestras de ADN amplificado.**

En individuos WT se observaron fragmentos sin cambios en el gel de agarosa después de la electroforesis. En individuos heterocigotas se observaron fragmentos de 415 y 177 pb y la presencia de un fragmento sin digerir en el gel. En individuos homocigotas únicamente se observaron fragmentos de 415 y 177 pb. Símbolos de (+) corresponden al experimento con adición de enzima *Earl*, y símbolos de (-) corresponden a controles negativos sin la adición de la enzima. El marcador de peso molecular utilizado (MPM) fue *Gene Ruler 100bp Ladder* (Thermo Fisher Scientific)

En primer lugar, la zona genómica de interés se amplificó por PCR, del mismo modo que lo indicado más arriba. La enzima *Earl* fue utilizada para realizar una digestión de las muestras de ADN amplificado. Los resultados obtenidos de esta digestión fueron los siguientes:

- Individuos a partir de los cuales se observaron fragmentos de 593 pb sin cambios en presencia o ausencia de *Earl*, como puede visualizarse en el gel de agarosa después de la electroforesis, mostrado en la Figura 13. Concluimos que la enzima *Earl* no pudo digerir el ADN por ausencia de su sitio de reconocimiento, que coincide con la ausencia de la mutación (individuos WT).
- Individuos en los que la enzima *Earl* digirió el ADN, generando fragmentos de 415 y 177pb, tal como se esperaba en presencia de su sitio de restricción. Se observó también la banda correspondiente al producto de PCR intacto de 593 pb, sin digerir. La conclusión es que se trataba de individuos heterocigotas, en los que *Earl* digirió uno de los alelos, mientras el otro alelo permaneció intacto.

- Individuos en los que se observaron fragmentos de 415 y 177 pb, pero no el producto sin digerir. Esto confirmó que los individuos eran homocigotas para la mutación (ver Figura 13).

### Los mutantes homocigotas presentan fenotipo infértil

Los ratones heterocigotos para la mutación (F1), tanto machos como hembras, resultaron fértiles. Se llevó a cabo una evaluación de la fertilidad en ratones machos, obtenidos mediante el cruce de ratones de la generación F1. Con este fin, se realizaron apareamientos entre ratones mutantes homocigotas y ratones WT del sexo opuesto, utilizando, en paralelo, ratones WT de la misma camada como grupos de control. A su vez, se comparó la fertilidad de los ratones mutantes heterocigotos con la de los ratones WT.

Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado (réplicas biológicas). Se utilizaron parejas reproductivas o harenes compuestos, en cada caso, por un macho y dos hembras B6. Cada grupo de ratones permaneció en estos harenes durante un período de 3 meses. Si después de ese tiempo no se logró la gestación de ninguna hembra, se consideró al ratón como infértil.

**Tabla 7. Ensayos de fertilidad realizados**

Evaluación de la fertilidad en ratones mediante el cruce de ratones de la generación F1. Se utilizaron ratones WT como grupos de control. Todos los individuos machos fueron cruzados con hembras B6

Genotipo	Sexo	Total de crías nacidas vivas	Crías nacidas muertas	Camadas	Porcentaje relativo machos y hembras	Mortalidad
WT	Macho	14	0	2	Machos:7 (50%) Hembras:7 (50%)	0%
WT	Macho	14	0	2	Machos:6 (42,8%) Hembras:8 (57,1%)	0%
HETERO	Macho	17	0	2	Machos:10 (59%) Hembras:7 (41%)	0%
HETERO	Macho	15	0	2	Machos:6 (40%) Hembras:9 (60%)	0%
HOMO	Macho	0	0	X	X	X
HOMO	Macho	0	0	X	X	X
HOMO	Hembra	0	0	X	X	X
HOMO	Hembra	0	0	X	X	X
<b>Casos particulares estudiados</b>						
HETERO	Macho	0	0	X	X	X

Como era esperable, todos los individuos WT fueron fértiles. Sumado a esto, se puede apreciar que en los mismos no se observó mortalidad en las crías, al igual que en los individuos heterocigotas (Tabla 7). Por otra parte, los machos heterocigotas presentaron una fertilidad normal. Cabe destacar que a lo largo de la realización de la tesis uno de los machos heterocigotas propuesto para el estudio no logró preñar a ninguna hembra tras el periodo establecido (ver Tabla 7); este caso será discutido más adelante..

En el caso de los individuos homocigotas para la mutación *Syce1* c.197 -2 A>G, se observó que después de un período de 3 meses los ratones fueron incapaces de reproducirse, por lo cual, se consideraron infértiles. Este hecho también fue constatado al realizar un análisis de fertilidad en hembras homocigotas (Tabla 7).

Con el fin de mantener la línea y obtener los individuos requeridos para continuar con los objetivos del estudio, se realizaron cruces entre individuos heterocigotas. Como hemos mencionado más arriba, este proceso implicó la tarea de genotipar cada nueva camada estudiada a lo largo del desarrollo de la investigación, con el propósito de caracterizar adecuadamente a los individuos homocigotos.

### **Los machos mutantes homocigotas para la mutación *Syce1* c.203-2 A>G presentan un desarrollo testicular anómalo.**

Los testículos de los mutantes homocigotas son de menor tamaño

Los individuos mutantes, tanto heterocigotas como homocigotas, presentaron tamaño y comportamiento similar al de los individuos WT, de modo que fue imposible diferenciarlos a simple vista.

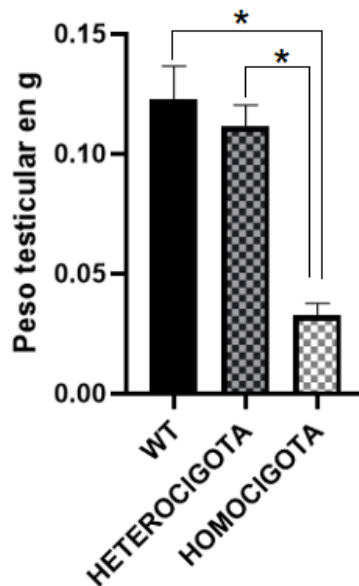
A la hora de evaluar las gónadas de ratones adultos de entre 18 y 27 semanas posparto, de las condiciones WT y heterocigotas se observó una variación leve pero significativa en el peso de la gónada ( $p < 0.05$ ) Mann-Whitney, si bien dicha variación puede deberse simplemente a variaciones individuales. Para el caso de los ratones macho adultos mutantes homocigotas en contraposición con individuos WT, éstos mostraron cambios altamente significativos tanto en el peso de las gónadas ( $p < 0.001$ ). (Tabla 8 y Figura 14A), como en el tamaño y la apariencia de las mismas, en comparación con sus compañeros de camada

(Figura 14B). La misma situación pudo apreciarse al comparar individuos heterocigotas con individuos homocigotas, tanto en relación al peso (Tabla 8 y Figura 14A), como al tamaño y la apariencia (ver Figura 14B).

**Tabla 8.** Peso Testicular de individuos de edades entre 18 y 27 semanas.

WT	HETEROCIGOTA	HOMOCIGOTA
0,12g	0,10g	0,03g
0,13g	0,13g	0,03g
0,14g	0,11g	0,03g
0,11g	0,11g	0,03g
0,11g	0,11g	0,04g
0,11g	0,11g	0,04g
0,12g	0,11g	0,02g
0,14g	0,11g	0,03g

A)



B)

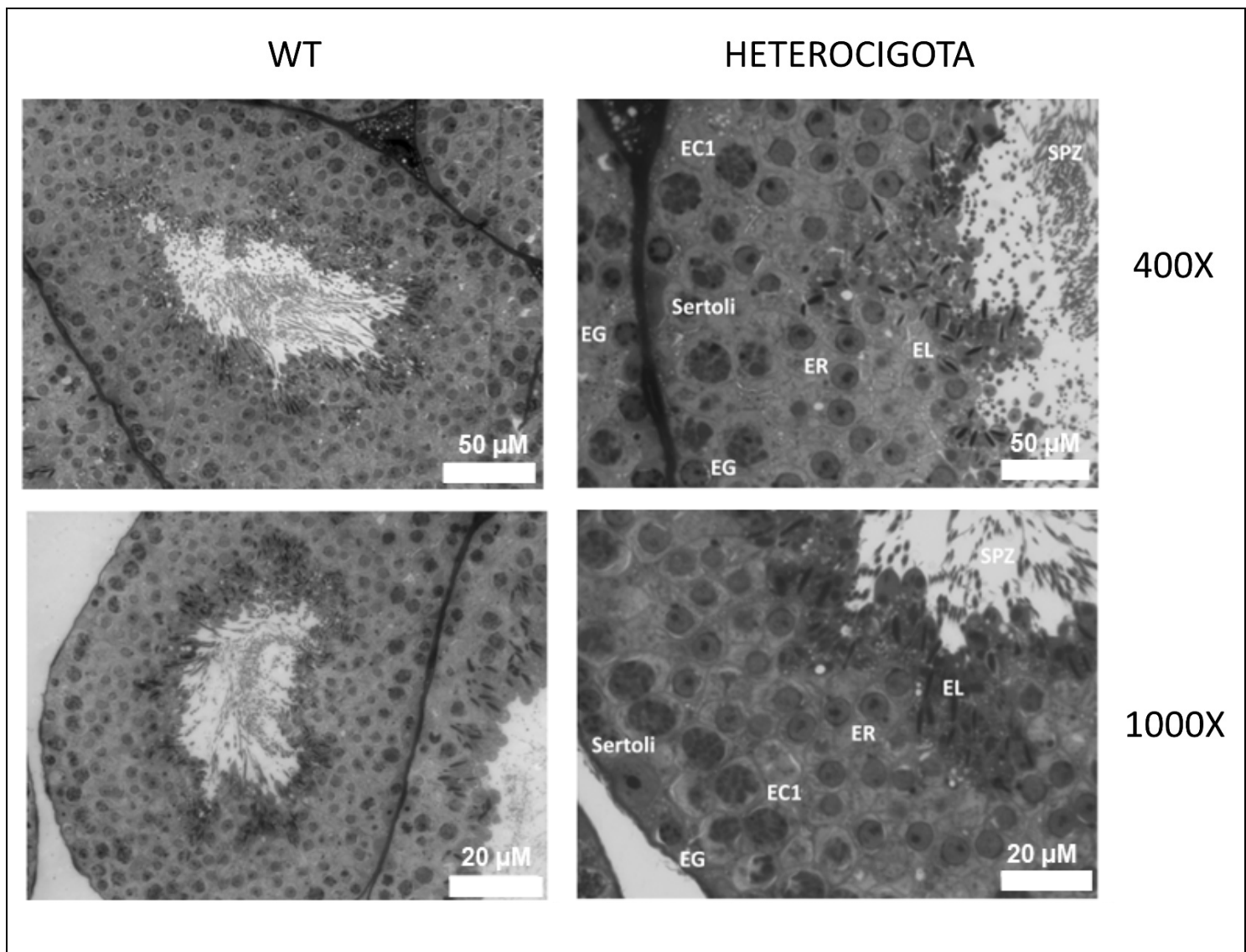


**Figura 14. Peso y tamaño gonadal de los individuos WT, mutantes heterocigotas y mutantes homocigotas.**

A) Gráfico de barras comparando los diferentes pesos testiculares de cada condición (\*p < 0.001). B) Gónadas representativas de ratones mutantes homocigotas machos. presentaron diferencias de tamaño. Referencia de tamaño: regla dividida en milímetros en la parte inferior de cada gónada.

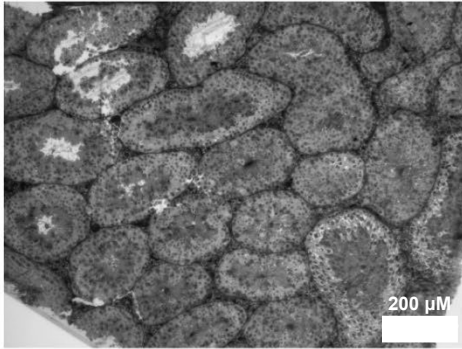
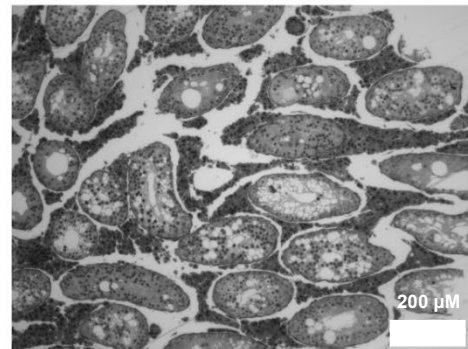
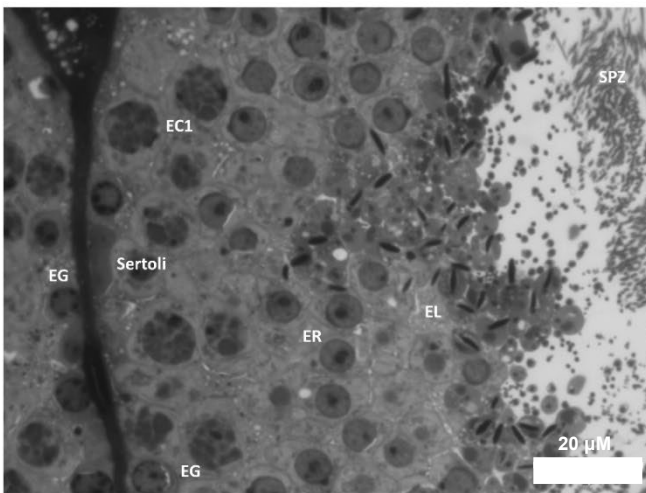
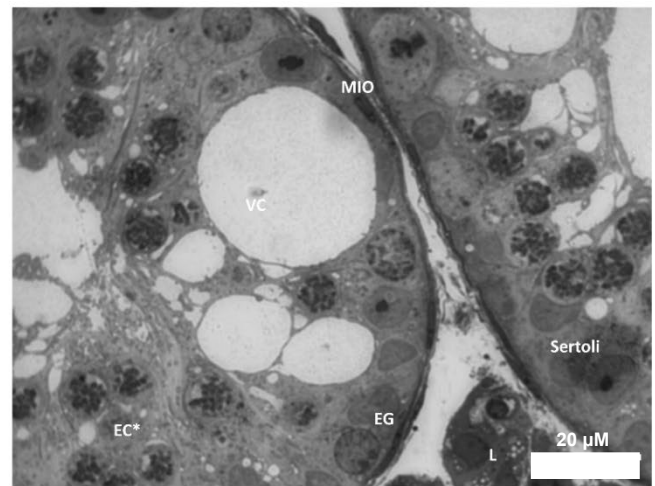


La mutación *Syce1* c.203-2 A>G en homocigosis genera un fenotipo testicular anómalo a nivel histológico.



**Figura 15. Cortes semifinos de testículo de ratones WT y mutantes heterocigotas para la mutación.**

En aumento 1000x se aprecia el epitelio germinal donde se pueden diferenciar: células de Sertoli (Sertoli), Espermatogonias (EG), Espermatocitos primarios (EC1), Espermatídas redondas (ER), Espermatídas elongadas (EL) y Espermatozoides (SPZ). 400x se utilizan barras de referencia 50 μm, 1000x barras de referencia de 20 μm.

**A)****WT****HOMOCIGOTA****B)****WT****1000X****HOMOCIGOTA****1000X**

**Figura 16. Cortes semifinos de testículo de individuos WT y homocigotas para la mutación.**

A) Vista panorámica 4X donde se puede apreciar la clara diferencia morfológica de los túbulos seminíferos de individuos WT e individuos homocigotas.

B) Detalle del epitelio germinal donde se pueden diferenciar varios tipos de células gracias a la distinta morfología nuclear. Células de Sertoli (Sertoli), Espermatogonias (EG), Espermatocitos primarios (EC1), Espermatidas redondas (ER), Espermatidas elongadas (EL), Espermatozoides (SPZ), Células mioides peritubulares (MIO), células de Leydig (L) Vacuolas (VC), Espermatocitos con aspecto inmaduro (EC\*).

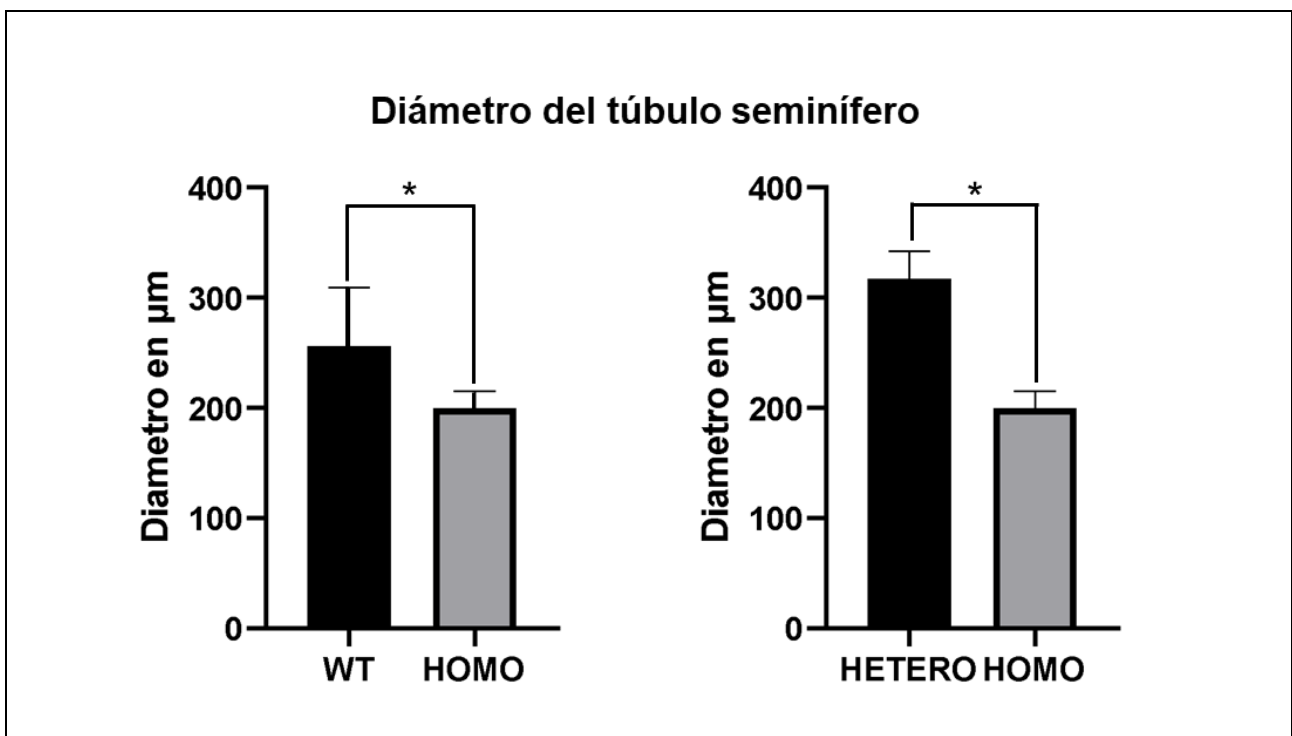
Barras de referencia en la vista panorámica de 200 μm, en 1000x 20 μm.

La histología gonadal de los ratones fue analizada sobre cortes semifinos de material incluido en resina epóxica proveniente de especímenes WT, heterocigotas y homocigotas, pertenecientes a la misma camada. Los testículos de los adultos WT y heterocigotos presentaron espermatogénesis completa, pudiéndose apreciar diversos estadios de maduración de células

espermatogénicas (diferentes tipos de espermatogonias, espermatocitos en diferentes etapas de la primera profase meiótica, espermatocitos secundarios, espermátidas redondas, espermátidas en diferentes fases de elongación, espermátidas elongadas), en túbulos seminíferos de morfología normal, no se observándose diferencias en la histología de ambos tipos de individuos (Figura 15).

Al comparar individuos WT con individuos homocigotas, sí se encontraron diferencias notorias. En primer lugar, los túbulos seminíferos de los ratones mutantes homocigotas presentaron un diámetro menor en comparación con los de sus compañeros de camada WT ( $p < 0,0001$ ) y heterocigotos ( $p < 0,0001$ ) (Figura 16).

En relación al aspecto, los individuos WT presentaban túbulos seminíferos de aspecto normal, con espermatogénesis completa, apreciándose los diferentes tipos celulares característicos (Figura 17).



**Figura 17. Diámetro de los túbulos seminíferos de ratones WT y mutantes.**

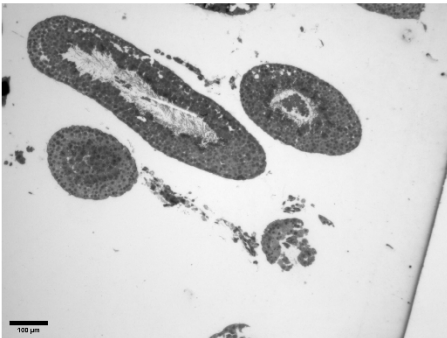
Se midieron un mínimo de 15 túbulos seminíferos de cada tipo, por cada corte. (\* $p < 0.0001$ ).

Los túbulos seminíferos de los ratones mutantes homocigotas mostraron un aspecto inmaduro y muy vacuolado (ver Figura 17). El contenido gonadal de los túbulos de los ratones mutantes homocigotas adultos, mostró un proceso de

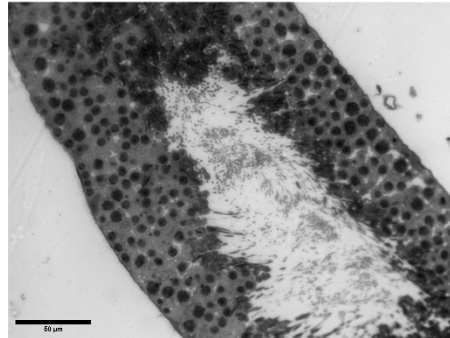
espermatogénesis con apariencia de detención en las etapas tempranas de profase I, y ausencia total de células posmeióticas (ver Figura 17). En dichos túbulos, también se pudo evidenciar la presencia de células de Sertoli, células mioideas peritubulares y espermatogonias (ver Figura 17). Los ratones hembra portadores de la mutación en homocigosis también presentaron ovarios de tamaño reducido e histología anómala, con ausencia de folículos. (Figura suplementaria 1).

El macho heterocigota que no logró generar descendencia, presentó una línea germinal completa, sin diferencias morfológicas similar a un individuo fértil, logrando producir espermatozoides en los túbulos seminíferos (Figura 18). Por lo tanto, si bien no podemos conocer las causas por las cuales no tuvo descendencia, sí podemos descartar que se trate de NOA, ya que hay espermatogénesis completa. Podría, eventualmente, tratarse de un caso aislado de azoospermia obstructiva (OA), no vinculado con la mutación en estudio.

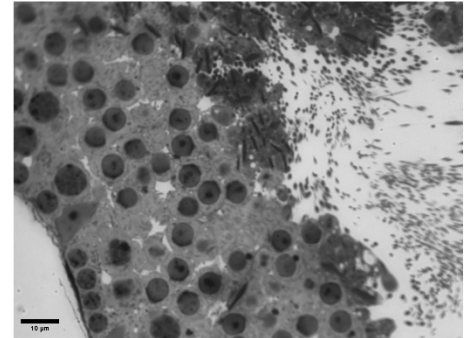
**100x**



**400x**



**1000x**



**Figura 18. Cortes semifinos de testículo proveniente de un individuo heterocigota infértil.**

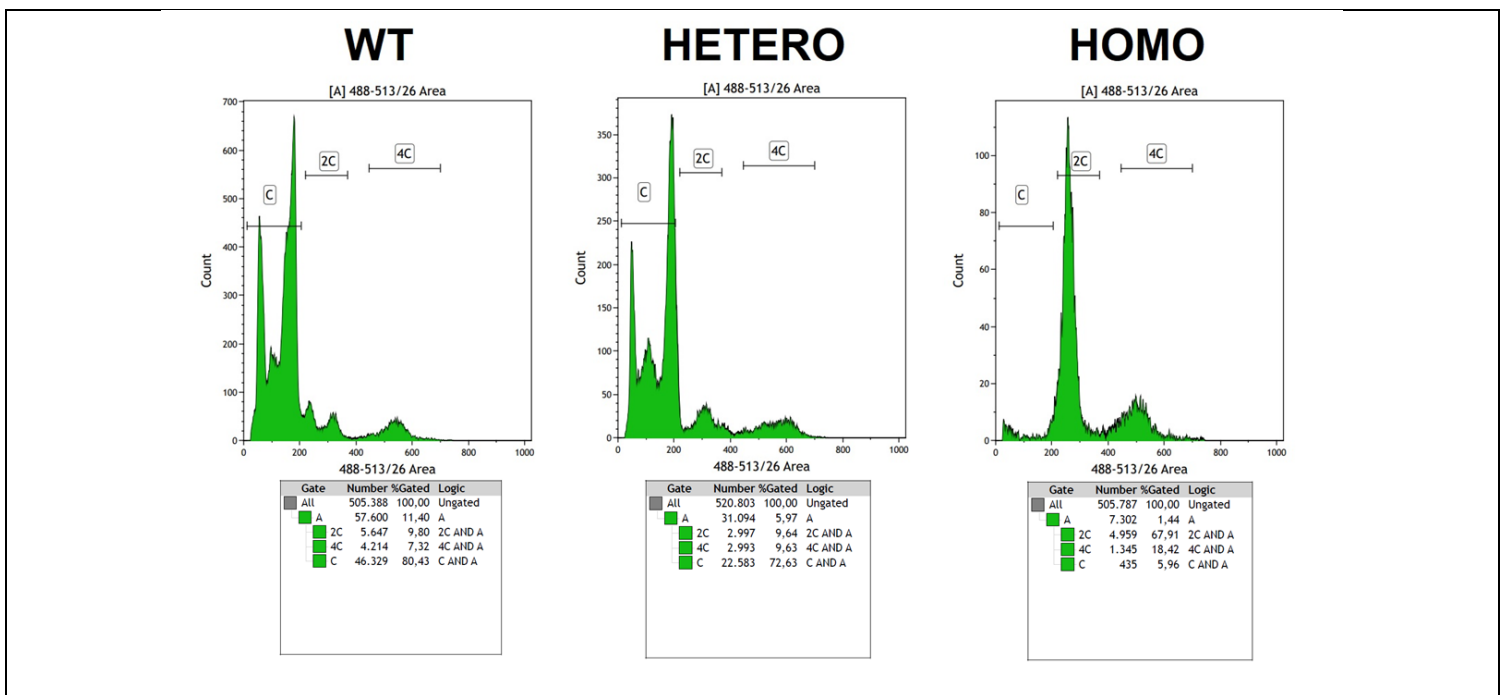
Cortes transversales de túbulos seminíferos. Se pueden apreciar diversos estadios de maduración de células gametogénicas en túbulos seminíferos de morfología normal, incluyendo una importante cantidad de espermatozoides en la luz de los túbulos. En 100x se utilizan barras de referencia de 100 µm, en 400x se utilizan barras de 50 µm, y en 1000x se utilizan barras de 10 µm.

**Los mutantes homocigotas carecen de células posmeióticas en sus testículos.**

Los túbulos seminíferos de los mutantes homocigotas presentaron apariencia de detención en las etapas tempranas de profase meiótica I. El análisis de las células postmeioticas mostro que carecían de células posmeióticas.

En el ámbito de la espermatogénesis, diversas células presentan variaciones en su contenido de ADN, lo que permite realizar una primera simplificación general para entender la heterogeneidad testicular cuando se analizan mediante citometría de flujo (CMF). Considerando el parámetro contenido de ADN (empleando un fluorocromo de unión estequiométrica al ADN), podemos identificar en la suspensión de células testiculares tres grupos principales de eventos.

En el proceso de caracterización de los ratones mutantes, se utilizaron suspensiones celulares del testículo de ratones adultos para llevar a cabo una comparación cuantitativa de las poblaciones C, 2C y 4C mediante CMF.



**Figura 19: Perfiles de células testiculares en suspensión mediante citometría de flujo.**

Se presentan ejemplos representativos de los resultados obtenidos a partir de los análisis realizados en los testículos de ratones adultos de tipo salvaje (WT) y en ratones mutantes, incluyendo tanto aquellos heterocigotas como homocigotas. En los gráficos, se identifican los picos correspondientes a las poblaciones celulares con contenido de ADN C, 2C y 4C, y en los rectángulos inferiores se especifica el porcentaje de las diferentes poblaciones. Todos los experimentos se realizaron por triplicado (tres réplicas biológicas).



El análisis realizado no reveló diferencias significativas entre los perfiles obtenidos de los ratones WT y los heterocigotos (Figura 19).

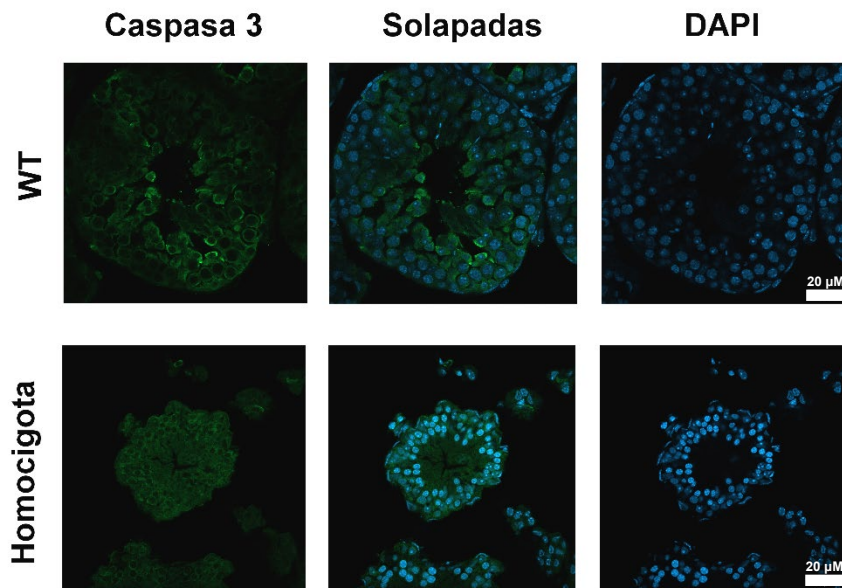
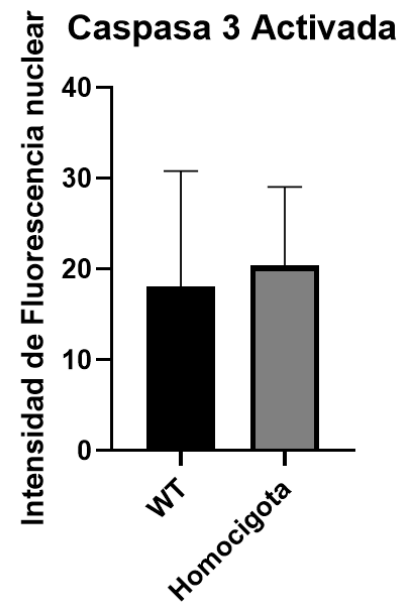
El perfil de los mutantes homocigotos adultos, mostró ausencia de la población celular con contenido de ADN C, indicando la ausencia de estadios posmeióticos en los testículos de estos individuos, y mayor representación proporcional de espermatoцитos y, sobre todo, de células 2C. Ello sugiere un estancamiento del proceso espermatogénico en las etapas iniciales de la primera meiosis.

### La mutación *Syce1* c.203-2A>G desencadenaría muerte celular programada.

La caspasa 3 activada se encuentra translocada al núcleo en mayor proporción en los espermatoцитos de individuos mutantes homocigotos.

En el presente estudio se examinó el papel de la caspasa-3 activada en relación con la muerte celular programada de células germinales de ratón, es decir como marcador de apoptosis. Entre las caspasas efectoras, la caspasa-3 activada parece inducir la activación de la desoxirribonucleasa activada por caspasa (CAD), que participa de forma integral en la degradación del ADN (Enari *et al.*, 1998; Halenbeck *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998).

Se analizaron por medio de microscopía confocal criosecciones de testículos de individuos WT y de mutantes y homocigotos para la mutación *Syce1* c.197-2 A>G, marcados con anticuerpos contra la caspasa-3 activada. Si bien a nivel global no se encontraron diferencias importantes en la intensidad de marca en las diferentes condiciones (Figura 20), cuando se centró la medición de intensidad de fluorescencia en los núcleos, se encontraron diferencias significativas al comparar individuos WT con individuos homocigotos ( $p < 0,0001$ ). Hacemos notar que, si bien la diferencia de intensidad de fluorescencia nuclear dio un valor altamente significativo, el desvío estándar fue grande, por lo cual, se decidió confirmar estos resultados mediante la clásica técnica de TUNEL.

**A)****B)**

**Figura 20. Inmunolocalización de caspasa 3 activada en criosecciones.**

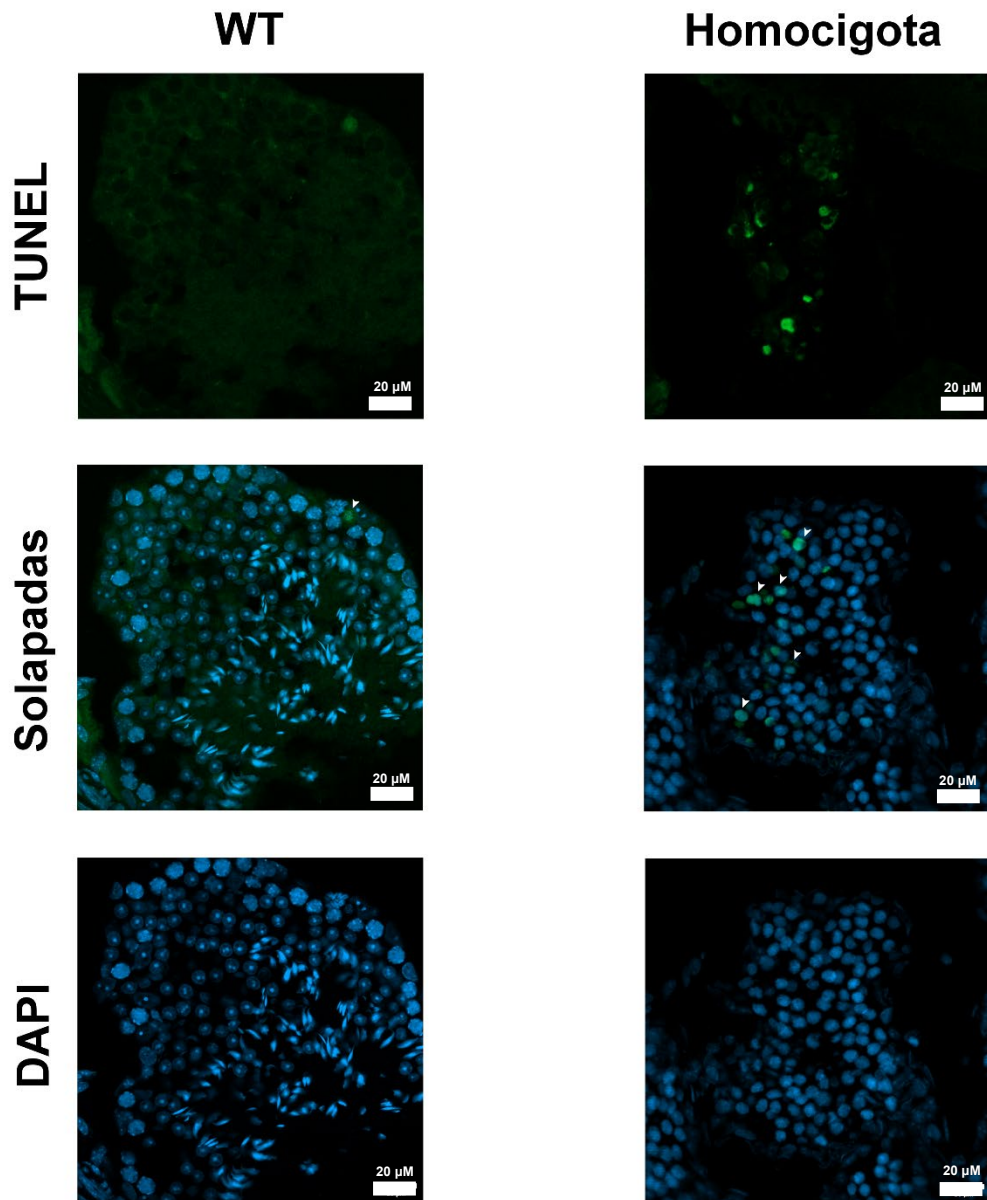
A) Detección de caspasa 3 activada (verde) en criosecciones de testículos de individuos WT, mutantes heterocigotas y mutantes homocigotas. Se muestra la referencia de marca nuclear con DAPI. Se utilizó objetivo 63X barras de 20 μm como referencia de tamaño.

B) Gráfico de barras de intensidad de fluorescencia nuclear para la caspasa 3 activada en las diferentes condiciones (n= 5).

Los testículos de individuos mutantes homocigotas presentan mayor proporción de células positivas a reacción de TUNEL.

Como paso adicional para analizar si la mutación *Syce1* c.203 -2A>G se podía correlacionar con eventos de muerte celular programada, se analizó el patrón del marcador TUNEL en las condiciones WT y homocigota. La técnica de TUNEL permite detectar la fragmentación del ADN que ocurre en células apoptóticas como resultado de la activación de diferentes nucleasas. El ADN nuclear se degrada originando múltiples sitios 3'-hidroxi terminales libres, que pueden ser detectados utilizando nucleótidos de deoxiuridina trifosfato marcados con moléculas fluorescentes y una enzima llamada deoxinucleotidil transferasa (TdT), encargada de la adición de deoxiribonucleosidos trifosfato en sitios 3'-hidroxi terminales libres. Gracias a este proceso, se incorpora el nucleótido marcado en los sitios en los que el ADN fue escindido, en los núcleos de células apoptóticas (Gavrieli *et al.*, 1992).

Al analizar la presencia de células TUNEL-positivas en los testículos adultos en las diferentes condiciones, se pudo apreciar al menos una célula TUNEL



**Figura 21. Detección de células TUNEL-positivas en túbulos seminíferos de individuos WT y homocigotas.**

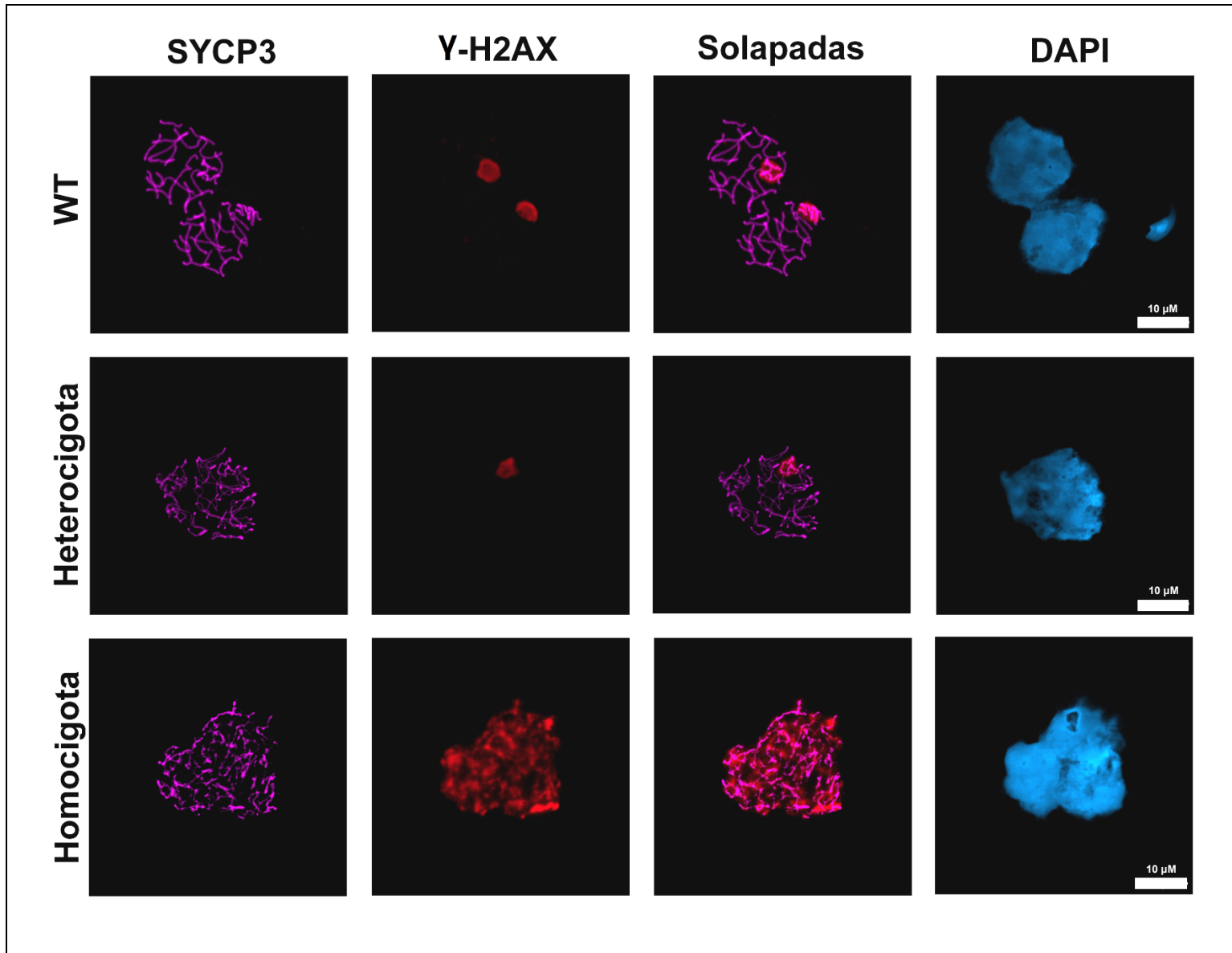
Se muestran secciones de túbulos seminíferos de individuos WT y homocigotas marcados con reacción de TUNEL (verde) y DAPI. Las puntas de flecha señalan células TUNEL-positivas en ambos casos. Se utilizó objetivo 63X, barras de 20 µm como referencia de tamaño.

positiva en algunos túbulos en los individuos WT (Figura 21). Como se observa en la Figura 27, se aprecia que existe un aumento de fragmentación del ADN en



los individuos homocigotas. Esto se encuentra en concordancia con los resultados esperados debido a la morfología alterada del testículo.

La persistencia de rupturas de doble hebra sobre la cromatina de los espermatocitos confirma la detención temprana en profase meiótica



**Figura 22. Inmunolocalización de SYCP3 y  $\gamma$ H2AX.**

La proteína SYCP3 se muestra en magenta, y se utilizó como marcador del CS (ver mayor detalle en las figuras siguientes).  $\gamma$ H2AX se muestra en rojo. La tinción de  $\gamma$ H2AX en los ratones WT y mutantes heterocigotas se restringió al cuerpo XY. Por el contrario, para individuos mutantes homocigotas únicamente se obtuvo la tinción difusa de  $\gamma$ H2AX típica de las etapas meióticas tempranas. Se muestra la superposición de SYCP3 y  $\gamma$ H2AX (“solapadas”). En la última columna se muestra la referencia de marca nuclear con DAPI. Se utilizó objetivo 63X, barras de referencia 10  $\mu$ m.

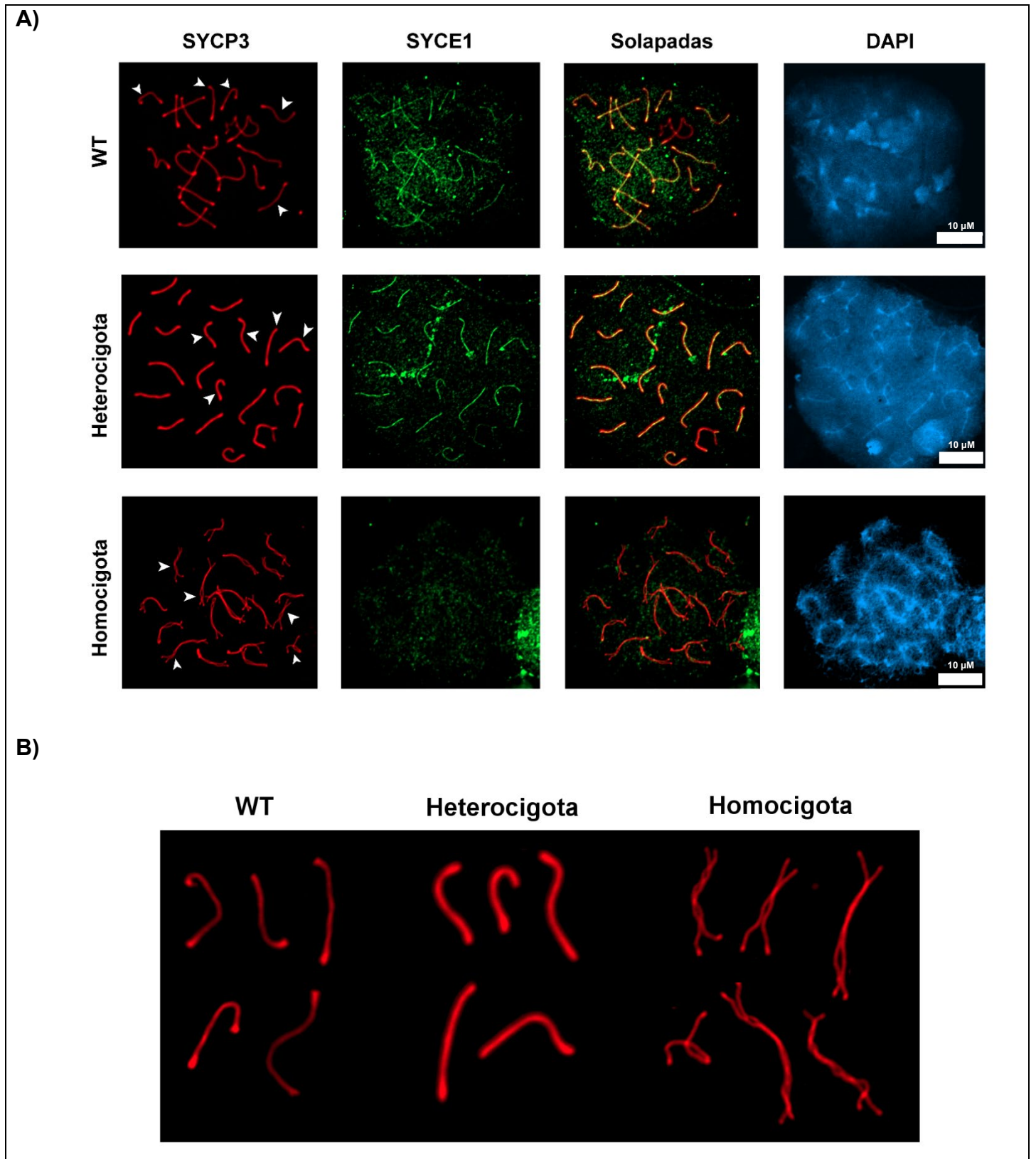
e llevó a cabo el inmunomarcado de la histona  $\gamma$ H2AX en muestras de esparcidos de células testiculares (*spreading*), con el objetivo de visualizar esta histona modificada, la cual suele emplearse como marcador de DSBs.

Durante las etapas tempranas de la meiosis en individuos WT, se introducen masivamente DSBs en la cromatina de los espermatocitos antes del alineamiento y la sinapsis cromosómica. Después de la sinapsis, en etapa de P, una vez culminados los eventos de recombinación homóloga, en los autosomas los cortes son reparados resultando o no en *crossing-over*, es decir intercambios de material genético entre cromosomas de origen materno y paterno (cruces y no cruces). En esta etapa, los DSBs persisten únicamente en los cromosomas sexuales (cuerpo XY), dada la ausencia de recombinación (por la inexistencia de homología) entre ambos. En este punto, la cromatina del cuerpo XY se encuentra transcripcionalmente inactiva (Fernández-Capetillo *et al.*, 2003). Sin embargo, en mutantes con fenotipo asinapsis, las DSBs nunca se reparan completamente en ninguno de los cromosomas, y no se producen cruces (Adams y Davies, 2023).

La  $\gamma$ H2AX es una forma fosforilada de la variante de histona H2AX, que señala los sitios de la cromatina donde se ha producido daño en el ADN en forma de DSBs (Rogakou *et al.*, 1999). Durante las etapas tempranas de la meiosis, esta variante de histona muestra una distribución dispersa característica sobre los cromosomas. Sin embargo, en la etapa de P, al repararse los DSBs de los autosomas, la marca de  $\gamma$ H2AX se encuentra restringida a una “neblina” que rodea al cuerpo XY (Figura 22).

Los individuos WT y heterocigotas no mostraron diferencias en su patrón de localización de la histona  $\gamma$ H2AX. En el caso de los mutantes homocigotas para la mutación, en cambio, los resultados obtenidos muestran un sorprendente contraste en el patrón de localización de la histona  $\gamma$ H2AX en los núcleos meióticos. Los mutantes homocigotas presentan dominios estrechos y positivos para la histona  $\gamma$ H2AX a lo largo de todos los cromosomas, mostrando un patrón de localización que recuerda a los espermatocitos en profase temprana (L/Z) de individuos WT (ver Figura suplementaria 2) No se puede apreciar en individuos homocigotas el patrón característico de P, lo que estaría indicando que no se detectan células en etapa de P en los mutantes homocigotas.

La mutación *Syce1* c.203-2A>G determina diferencias en la estructura del CS al ser analizada por medio de microscopía láser confocal.



### Figura 23. Inmunolocalización de las proteínas SYCP3 y SYCE1.

A) Se detecta SYCE1 en esparcidos cromosómicos realizados a partir de testículos de individuos WT y mutantes heterocigotas (verde). No se detecta sobre los CS en muestras de mutantes homocigotas. Se muestra SYCP3 en rojo. Se muestra la superposición de SYCE1 y SYCP3 (“solapadas”), y en la última columna se muestra la referencia de marca nuclear con DAPI. Se utilizó objetivo 63X, barras de referencia 10  $\mu$ m. Cabezas de flechas marcan CSs observados en la parte B

B) Detalle de SYCP3 para las 3 condiciones. En el caso de los mutantes homocigotas, son evidentes los ELs alineados con ausencia de sinapsis. Nótese que en las imágenes seleccionadas el aspecto de los núcleos mostrados para individuos heterocigota se encuentra en un estado más avanzado de P que el de WT.

SYCP3 se encuentra cargada en el CS de los ratones homocigotos mutantes, pero no se logra una sinapsis cromosómica

Al analizar los resultados obtenidos por medio de microscopía confocal, no se encontraron diferencias significativas entre los meiocitos de ratones de tipo WT y heterocigotas en cuanto a la localización de SYCP3 y la sinapsis entre homólogos: SYCP3 se localiza sobre los ejes axiales en L, los homólogos se alinean y comienzan a sinapsarse en Z, y en P ya han completado su sinapsis de un extremo cromosómico al otro. La figura 20 muestra, para esparcidos WT y heterocigotas, un ejemplo de inmunolocalización de SYCP3 sobre núcleos paquiténicos (Figura 23 A, fila superior y del medio). Sin embargo, en el caso de los ratones mutantes homocigotos se pudo observar que los cromosomas estaban alineados, muy cercanos entre sí, pero nunca establecían sinapsis entre ellos, lo que se asemejaba a la disposición espacial que se presenta en las primeras etapas de la profase meiótica (Figura 23 A, fila inferior) esta disposición se le ha denominado "asinapsis" o alineado no sinapsado (Figura 23 B). De hecho, en los mutantes homocigotas no se observó ningún núcleo meiótico que avanzara más allá de ese estado de “asinapsis”, denotando la existencia de un arresto o detención del proceso meiótico en una etapa anterior al P.

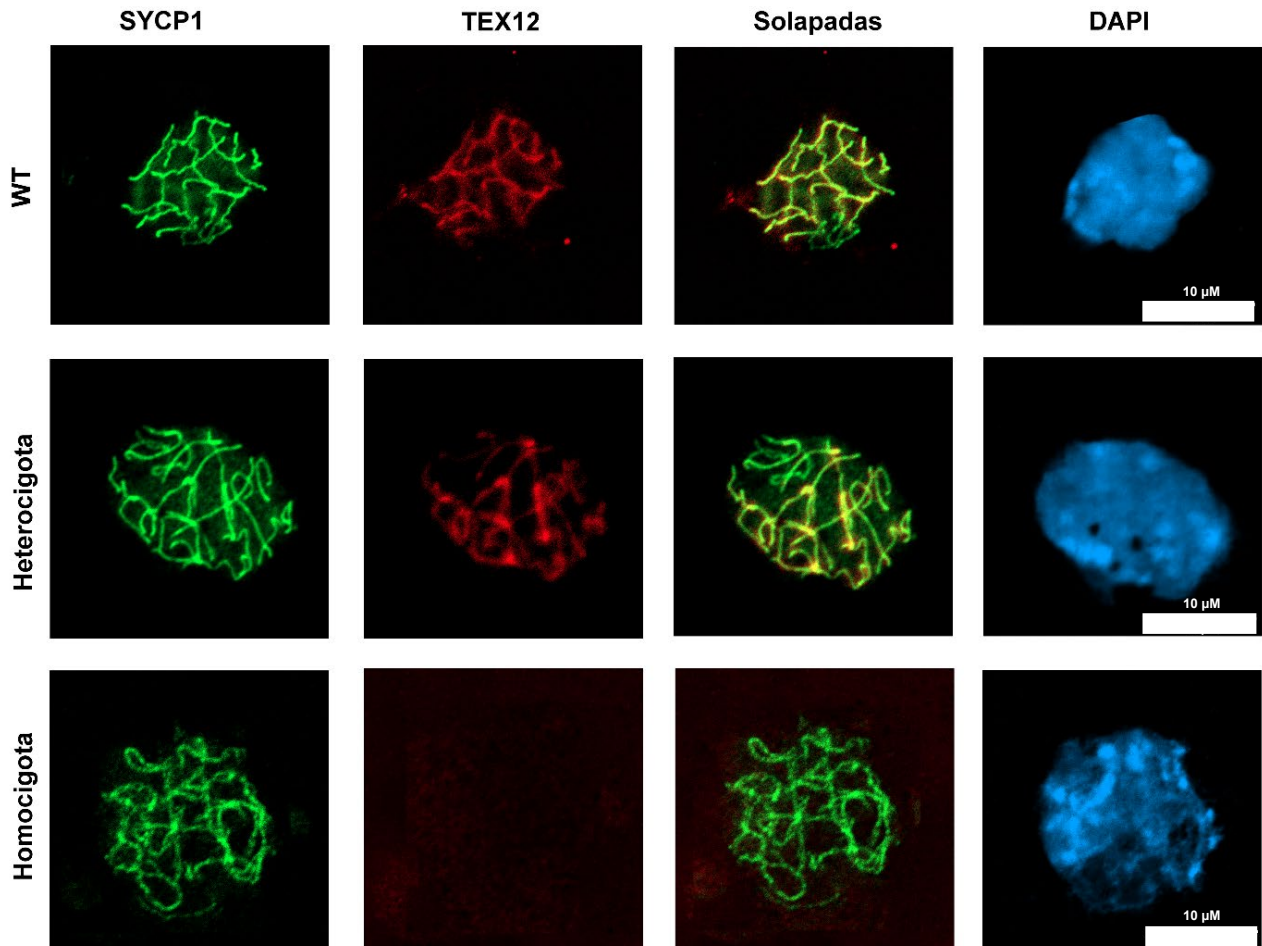
Dada la ausencia de sinapsis y formación de CS en los mutantes homocigotas, y el aspecto de CSs en formación “congelados en el tiempo”, a los efectos de simplificar el relato, de ahora en más nos referiremos a estas estructuras del mutante como “CSs en formación”.

*SYCE1* no se encuentra cargada en el CS en formación de los ratones homocigotos mutantes.

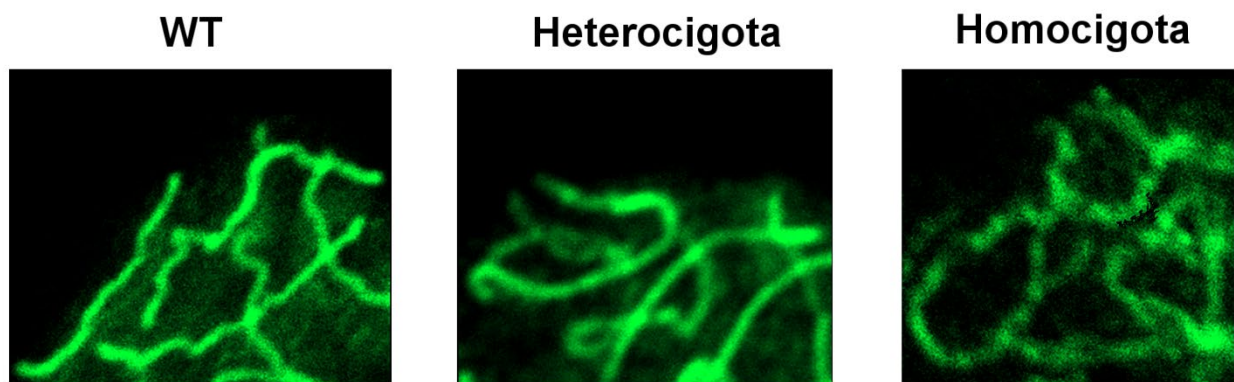
Con respecto a la proteína SYCE1, se pudo identificar claramente su presencia en los CSs tanto en ratones de tipo WT como en mutantes heterocigotas. Sin embargo, no se logró detectar la presencia de la proteína sobre los CSs en formación de los mutantes homocigotas (Figura 23). Este resultado fue consistente en todas las réplicas biológicas. Es importante mencionar que, al utilizar el anticuerpo para inmunolocalizar la proteína en los mutantes homocigotas, se obtuvo una marca fluorescente difusa sin vínculo apreciable con los CSs, esta misma marca también se observó en los preparados de ratones de tipo WT y heterocigotas (ver Figura 23). Una posible interpretación es que esta señal fluorescente difusa (obtenida a pesar de que el anticuerpo se había purificado por afinidad) es atribuible al fondo de fluorescencia propio del anticuerpo utilizado. La interpretación alternativa (que fue posteriormente descartada, como se verá más adelante) es que en todos los casos se tratara de proteína libre, pero que, en el caso de los mutantes homocigotas, la misma no se pudiera incorporar a los CSs. En suma, la proteína putativa trunca, en caso de estar presente, no se estaría cargando al CS en formación.

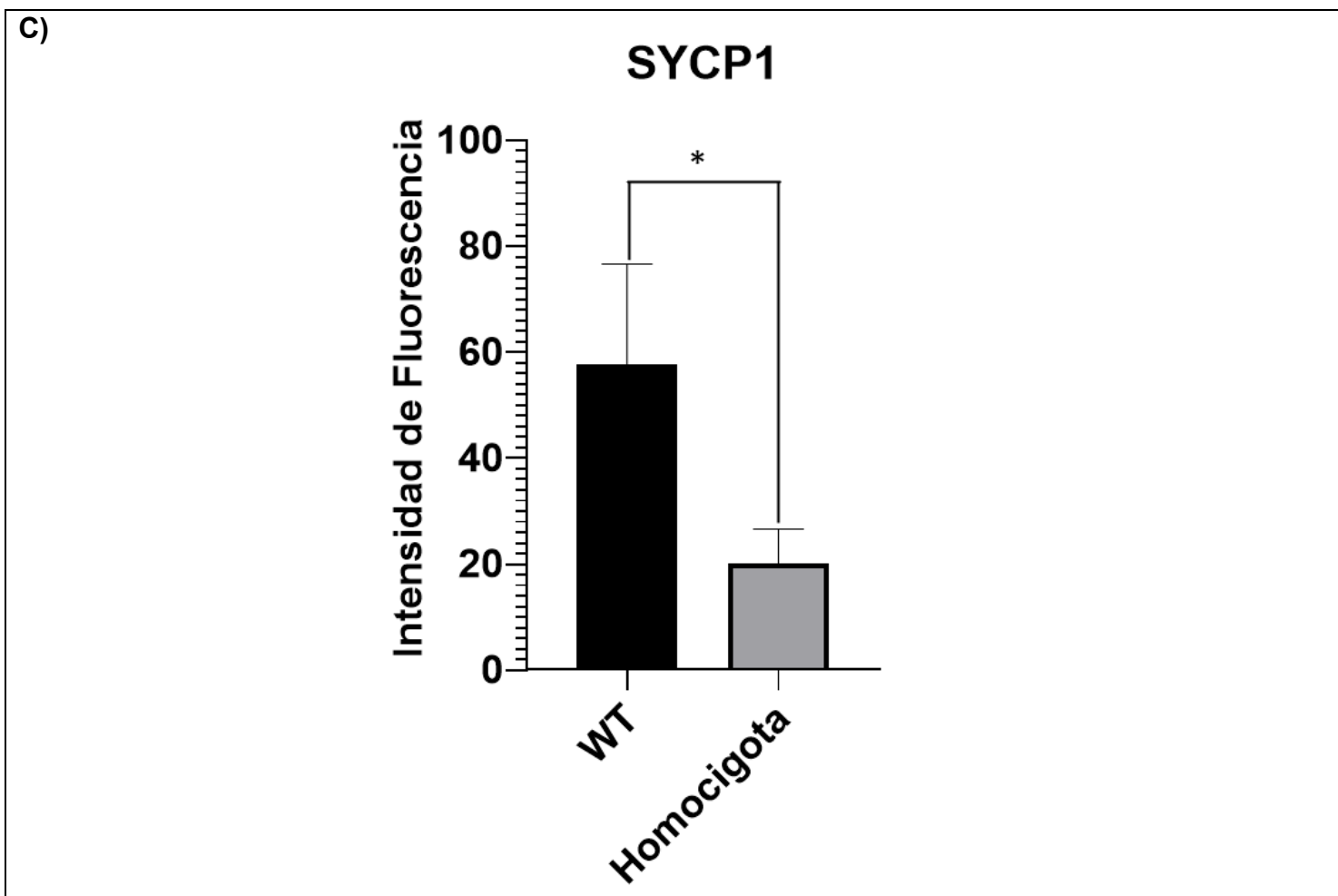
SYCP1 se encuentra cargada en el CS en formación de los ratones homocigotas mutantes, pero presenta una intensidad y un patrón de unión diferentes.

A)



B)





**Figura 24: Inmunolocalización de las proteínas SYCP1 y TEX12.**

A) El inmunomarcado del componente del EL del CS TEX12 se muestra en rojo, y SYCP1 en verde. Se detecta proteína SYCP1 en los esparcidos para las tres condiciones analizadas. En mutantes homocigotas se demuestra un patrón de marcado intermitente de la proteína SYCP1. Se muestra la superposición de SYCP1 y TEX12. Sin embargo, en los mutantes homocigotas no se visualiza marca para la proteína TEX12. En la última columna se muestra la referencia de marca nuclear con DAPI. Se utilizó objetivo 63X, barras de referencia de 10  $\mu\text{m}$ .

B) Detalle de SYCP1 para las 3 condiciones.

C) Gráfico de barras comparando las diferentes intensidades de fluorescencia nuclear (\* $p < 0.0001$ ).

SYCP1, se identificó claramente unida a los ejes de los CSs en todos los individuos estudiados (Figura 24 A). Se observaron diferencias tanto a nivel cuantitativo como de distribución para este componente de los FTs.



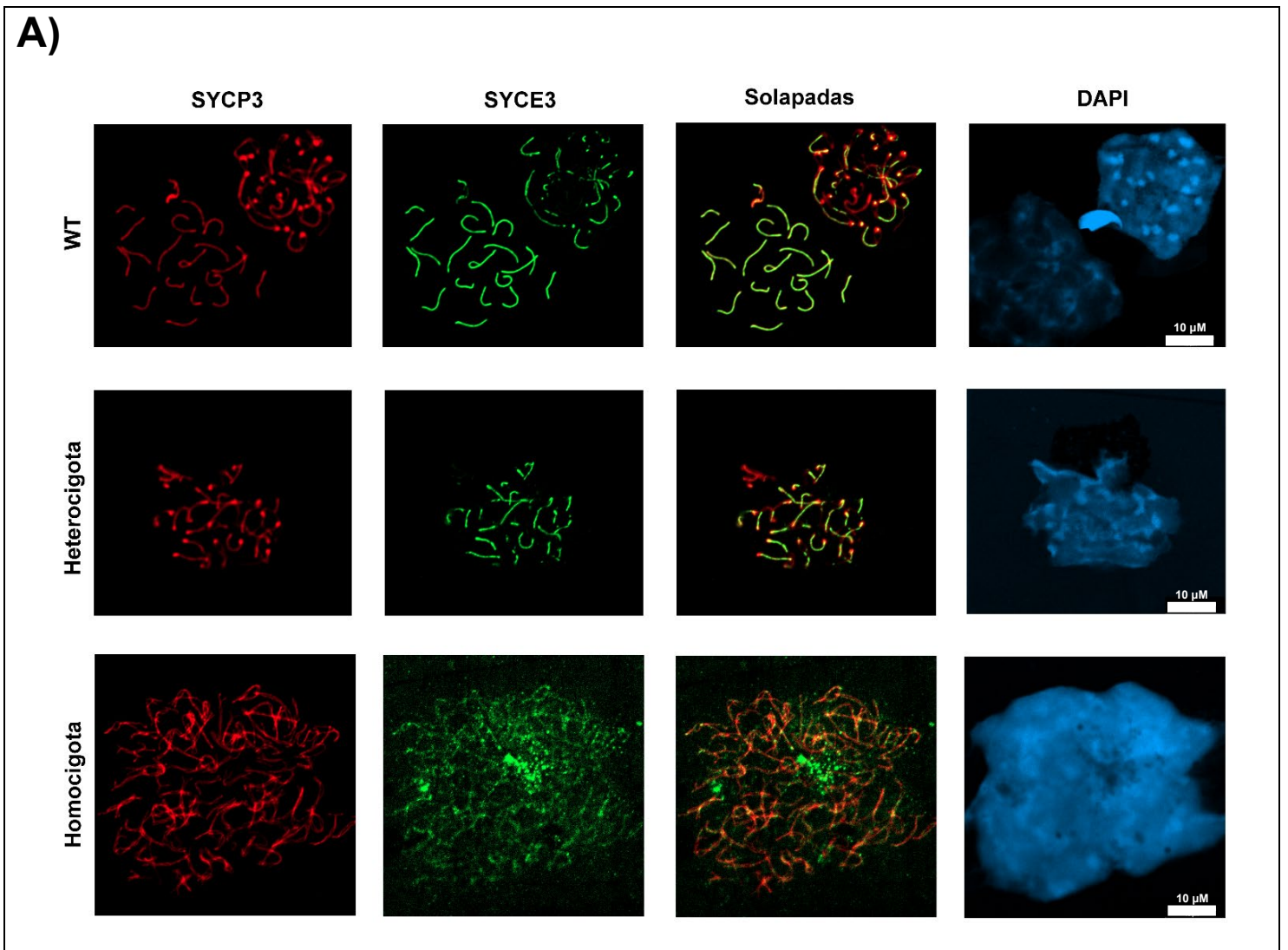
La cuantificación de fluorescencia (ver Materiales y Métodos), para el caso de los ratones mutantes homocigotas mostró que, SYCP1 presentó niveles reducidos de marca en comparación con los de los WT (n=10) ( $p < 0,0001$ ).

Por otra parte, la distribución de esta proteína también mostró diferencias con respecto a lo observado en individuos WT; en condiciones normales, SYCP1 se presenta únicamente en las regiones del CS donde se ya se produjo la sinapsis cromosómica (Figura suplementaria 3). En los mutantes homocigotas la marca de SYCP1 se observó a lo largo de los ejes cromosómicos alineados, no sinapsados.

Además, en tanto en los WT y heterocigotas SYCP1 presentó una marca continua, en los mutantes homocigotas se observó marca de tipo intermitente (Figura 24 B).

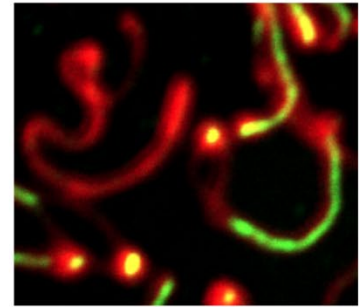
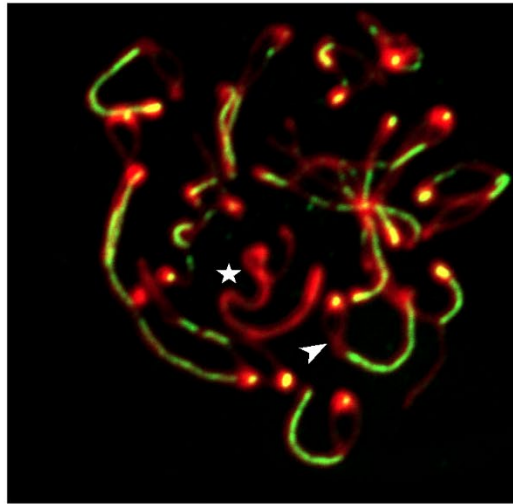


SYCE3 se encuentra cargada al CS en formación en los mutantes homocigotas, pero presenta una marca diferente.

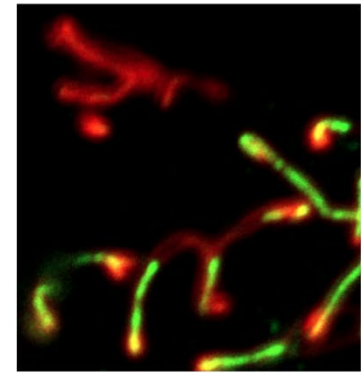
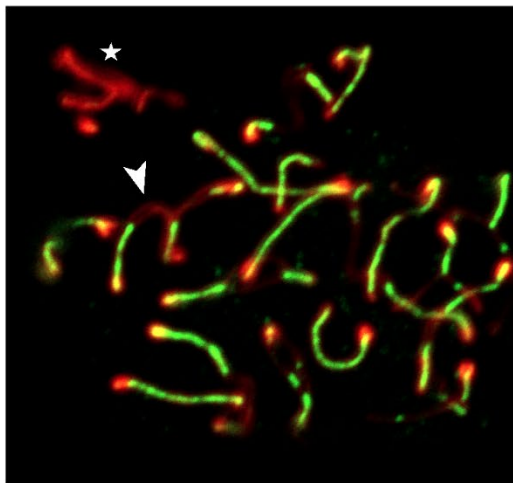


B)

WT



Heterocigota



**Figura 25. Inmunolocalización de las proteínas SYCP3 y SYCE3**

- A) SYCP3 se muestra en rojo. SYCE3 (verde) se detectó en esparcidos para las 3 condiciones analizadas. En el caso de individuos WT y mutantes heterocigotas se encontraron CS completamente ensamblados. En el caso de mutantes homocigotas que muestran elementos laterales alineados, pero no sinapsados también se encontró presencia de SYCE3. Se muestra la superposición de SYCE3 y SYCP3. En la última columna se muestra referencia de marca nuclear con DAPI. Se utilizó objetivo 63X, barras de referencia de 10µm.
- B) Se muestra detalle de la marca de SYCP3 en conjunto con SYCE3 para individuos WT y heterocigota. Flechas indican regiones donde se presenta únicamente la marca de SYCP3 en las zonas Sinapsadas. Estrellas marcan el cuerpo XY donde la sinapsis se limita únicamente a la región pseudoautosómica y por lo cual la marca de SYCE3 es muy limitada o nula.

SYCE3 interactúa con SYCP1 para crear un andamiaje para la localización de SYCE1/SIX6OS y SYCE2/TEX12 (Crichton *et al.*, 2023). Cuando SYCP1 está

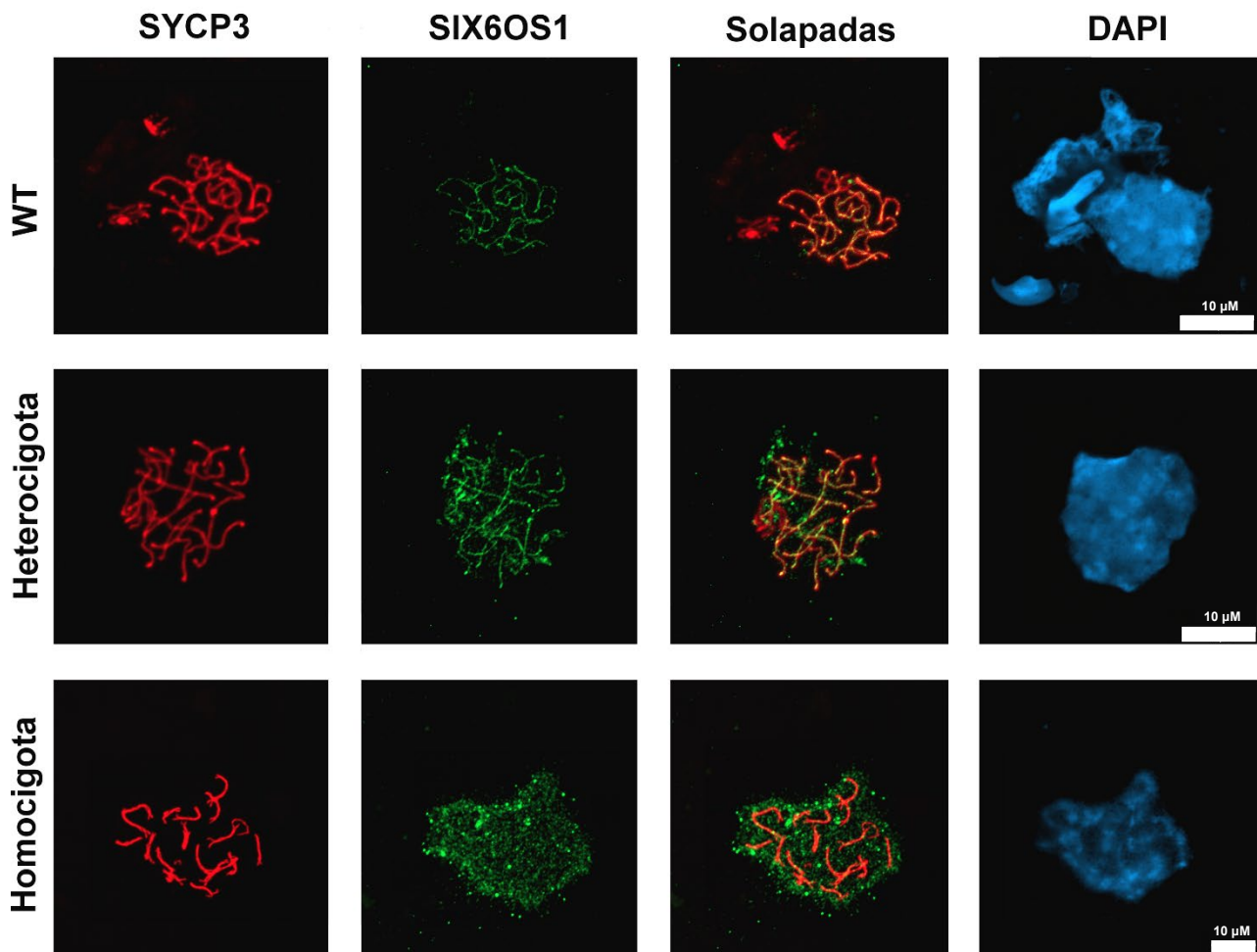
ausente se pierde toda la RC, sin carga de proteínas del EC como SYCE1, SYCE2 y SYCE3.

Como puede ser apreciado en la Figura 25 A y B, en el caso de individuos WT y heterocigotas, la proteína SYCE3 únicamente se presenta en lugares donde se ya se dio la sinapsis cromosómica. En el caso de los mutantes homocigotas, se aprecia marca de SYCE3 a lo largo de todo el eje cromosómico (Figura 25 A, fila inferior), de forma similar a lo observado en estos mutantes para SYCP1.

TEX12 no se detecta sobre el CS en formación de los mutantes homocigotas.

Resultaba también de interés analizar qué ocurría en los ratones con genoma editado con la distribución de componentes del CS que normalmente se cargan al mismo con posterioridad a SYCE1, proteína afectada por la mutación en estudio. Para ello se realizaron estudios de inmunodetección de la proteína TEX12. Los resultados no demostraron diferencias significativas entre ratones de tipo WT y mutantes heterocigotas (véase Figura 24). Sin embargo, no se logró detectar la presencia de la proteína TEX12 sobre la estructura del CS en formación en los ratones mutantes homocigotas (Figura 24).

SIX6OS1 no se detecta sobre los CSs en formación de los mutantes homocigotas.



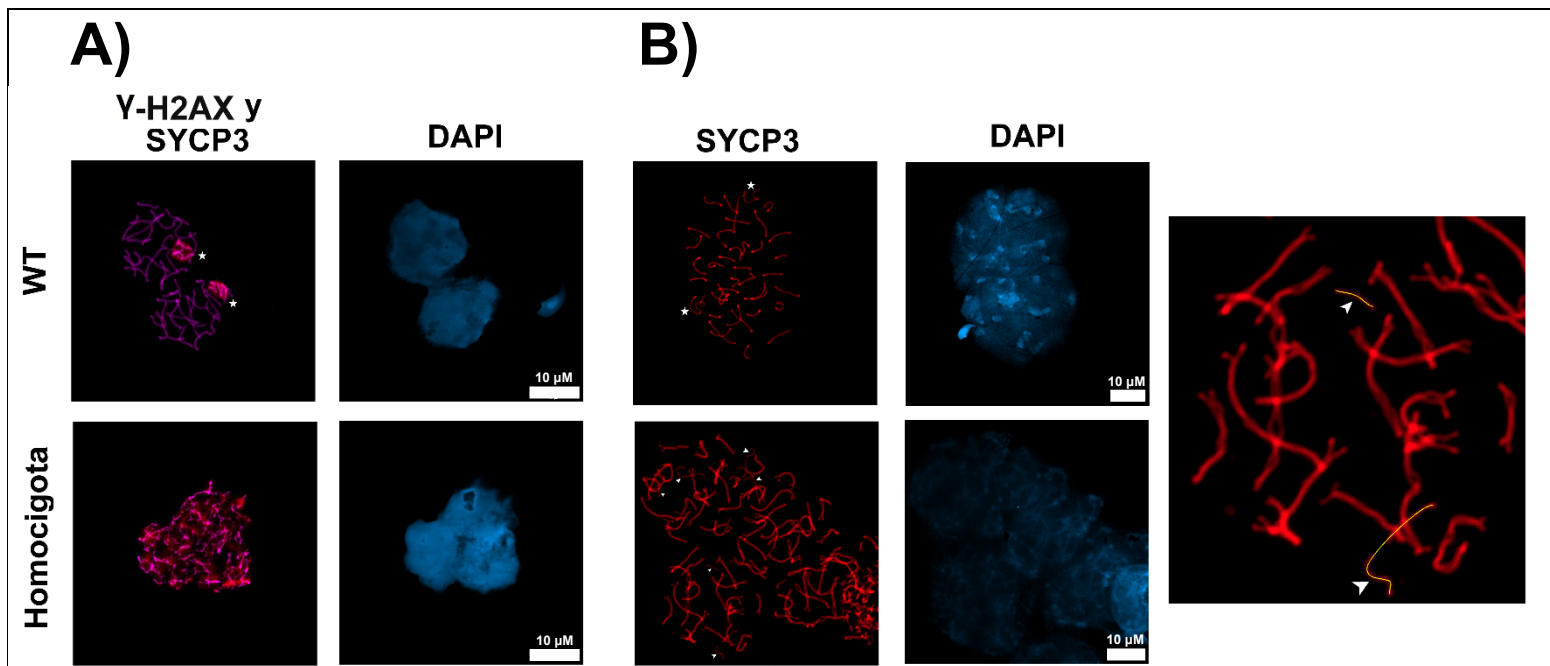
**Figura 26. Inmunolocalización de las proteínas SIX6OS1 y SYCP3.**

SYCP3 se muestra en rojo. SIXOS1 (verde) se detectó en esparcidos para las condiciones WT y heterocigota, sobre los CSs ensamblados. En el caso de mutantes homocigotas, que muestran ELs alineados, pero no sinapsados, no se encontró presencia de SIXOS1. Se muestra también la superposición de SIXOS1 y SYCP3 (“solapadas”), y, en la última columna, la referencia de marca nuclear con DAPI. Se utilizó objetivo 63X, barras de referencia de 10μm.

Se predice que la mutación *Syce1* 197-2A>G resultará en un producto truncado de 66 aminoácidos (Maor-Sagie *et al.*, 2015). Esta mutación interrumpiría ambos sitios de unión, y probablemente anularía la formación del complejo SYCE1-SIX6OS1, funcionando, por lo tanto, como una mutación nula.

Nuestros análisis de ratones mutantes revelaron que, mientras que para individuos WT y heterocigotas se aprecia la marca de SIX6OS1 en los segmentos sinapsados, sin diferencias identificables entre ambas condiciones, para los mutantes homocigotas se observó un patrón difuso de SIX6OS1, no localizada sobre los ejes de SYCP3 (Figura 26).

En los espermatoцитos de los mutantes homocigotas, los cromosomas sexuales no se alinean.



**Figura 27. Análisis del cuerpo XY a partir de ensayos de inmunofluorescencia.**

A) SYCP3 se muestra en magenta, en conjunto con  $\gamma$ H2AX que se muestra en rojo. en a tinción de  $\gamma$ H2AX en los WT se limita al cuerpo XY. Los individuos mutantes homocigotas mostraron tinción difusa de  $\gamma$ H2AX.

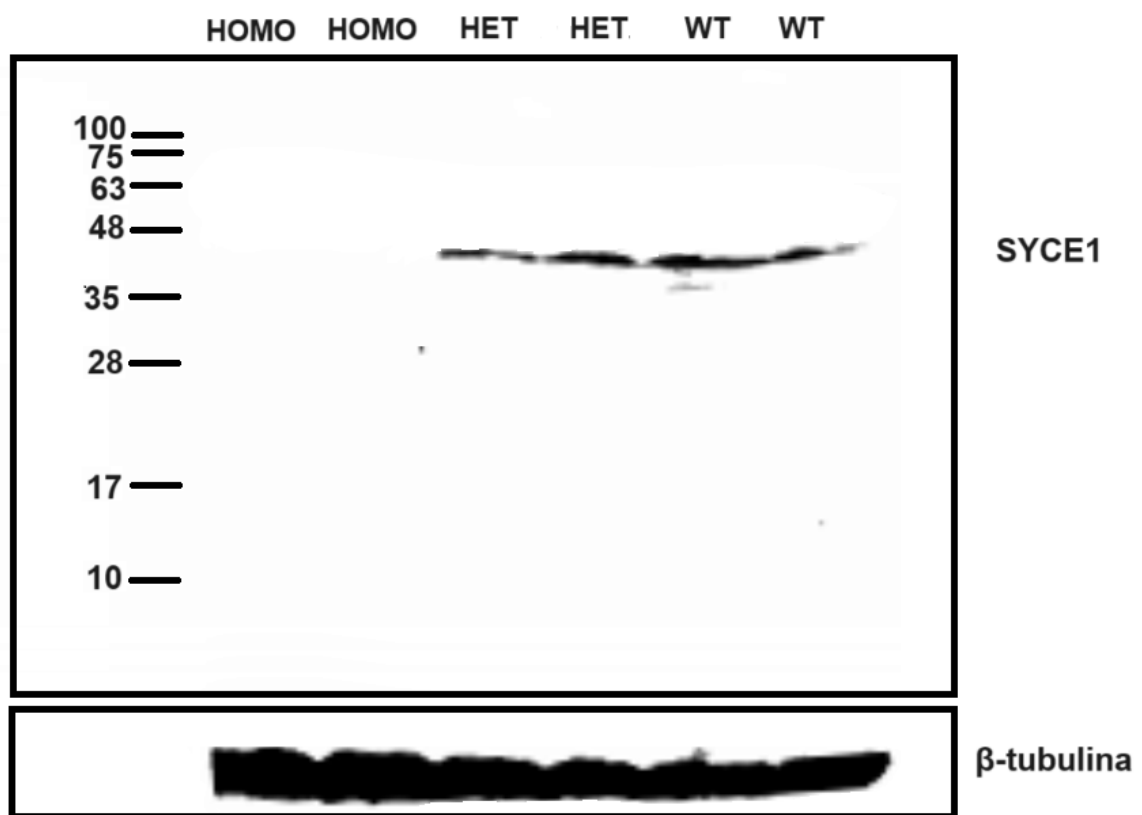
B) SYCP3 se muestra en rojo. Con estrellas se marcan los cromosomas sexuales sinapsados por su región pseudoautosómica formando el cuerpo XY, para dos núcleos de individuos WT. En el caso de los individuos homocigotas, se marcan con puntas de flecha los cromosomas sexuales no sinapsados ni alineados de tres núcleos donde los cromosomas sexuales no se aparean ni se alinean. En la última columna se muestra la referencia de marca nuclear con DAPI. Se utilizó objetivo 63X, barras de referencia de 10  $\mu$ m. A la derecha se muestra detalle de SYCP3 en homocigota señalando con una línea amarilla los pares sexuales no sinapsados ni alineados.

Una observación interesante en relación a los resultados obtenidos en los espermatoцитos mutantes homocigotas para SYCE1, fue que los cromosomas sexuales no logran alinearse correctamente. En estos mutantes, la formación del

cuerpo XY no ocurre, como se evidencia al analizar las marcas de referencia del CS, pudiéndose apreciar que los cromosomas X e Y son los únicos que no se encuentran alineados (Figura 27).

**En los testículos de los ratones mutantes homocigotas no se detecta producto del gen *Syce1***

En los testículos de los ratones mutantes homocigotas para la mutación *Syce1* c.203-2A>G no se detecta la proteína trunca predicha.



**Figura 28. Evaluación de la presencia de proteína putativa predicha por Western blot.**

Se detectaron bandas correspondientes a una proteína de peso molecular estimado de 38 kDa correspondiente al tamaño esperado de la proteína SYCE1 WT. No se detectó proteína SYCE1 putativa mutante (tamaño esperado de aproximadamente 9 kDa) en las muestras de ratones mutantes homocigotos y heterocigotos. Control de carga: β-tubulina. HET: mutante heterocigota; HOMO: mutante homocigota.

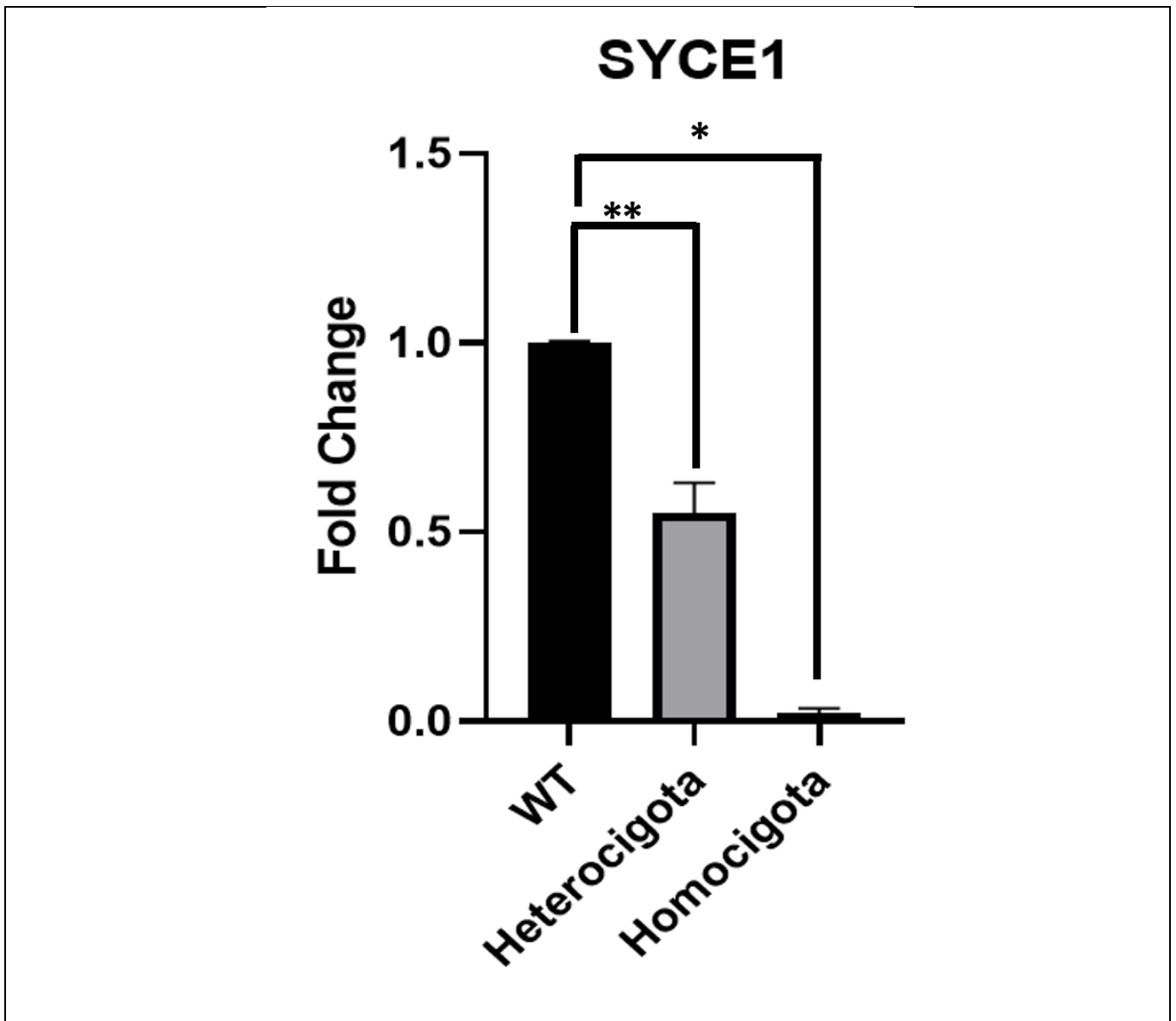
Los resultados obtenidos mediante la técnica de inmunolocalización sobre esparcidos revelaron que la proteína SYCE1 no fue detectada sobre los CS en

formación de ratones mutantes homocigotas. No obstante, cabía la posibilidad de que una forma trunca de la proteína estuviera presente en los meiocitos, ya sea dispersa en diferentes regiones del núcleo o incluso en el citoplasma, pero sin estar correctamente localizada en los CSs. Por ello se procedió a realizar ensayos de Western blot.

El análisis mediante Western blot en un extracto de proteínas totales de testículos WT y heterocigotas mostró una banda con el tamaño predicho de SYCE1 nativa, aproximadamente 38,2 kDa, correspondiente a la proteína completa, de 329 residuos (Figura 28). Es evidente una única banda, lo que resalta la especificidad de este anticuerpo hacia SYCE1.

No se detectó proteína SYCE1 trunca para mutantes heterocigotas, cuyo tamaño teórico esperado sería de 9 kDa. De igual modo, no se detectó proteína SYCE1 en la muestra de mutantes homocigotas. Es importante señalar que los experimentos de Western blot fueron realizados en condiciones óptimas para permitir la detección de una banda de bajo peso molecular (ver Materiales y Métodos). Cabe recordar asimismo que el anticuerpo anti-SYCE1 empleado fue generado contra la región amino-terminal de la proteína SYCE1, y en consecuencia era teóricamente capaz de detectar tanto la proteína completa nativa como la trunca predicha, en caso de estar presente.

Existen diferencias significativas en los niveles del ARNm de *Syce1* en los ratones homocigotos mutantes, con respecto a los de los ratones WT y heterocigotas.



**Figura 29. Cuantificación de ARNm por RT-qPCR.**

Resultados obtenidos para testículos adultos de ratones WT y mutantes. Se utilizaron 3 réplicas biológicas por condición. Se detectaron niveles disminuidos del transcrito de *Syce1* para los mutantes homocigotas  $p < 0,0001$ . En el caso de los individuos heterocigotas, se evidenciaron diferencias significativas ( $p$  valor  $< 0,001$ ), con niveles intermedios en relación a los individuos WT y mutantes homocigotas.

Con el fin de determinar si la ausencia de proteína mutante detectable se debía a una degradación de la proteína, o si también se encontraban disminuidos los niveles de su ARNm, se realizaron estudios de RT-qPCR a partir de ARN



total de testículos de ratones mutantes homocigotos, y se compararon con ratones de tipo WT y heterocigotas. Los resultados de la cuantificación del ARNm del gen *Syce1* revelaron diferencias significativas entre los ratones WT y los mutantes homocigotos ( $p < 0,0001$ ), mostrando niveles mínimos de ARNm en los testículos adultos de estos últimos. Por otro lado, la diferencia en los niveles de ARNm de *Syce1* entre los testículos de ratones WT y heterocigotas fue menos marcada en comparación con los mutantes homocigotos, pero aún significativa ( $p \text{ valor} < 0,001$ ), presentando los heterocigotas niveles de transcritos intermedios (Figura 29).

## DISCUSIÓN

### Algunas consideraciones sobre el abordaje empleado y las mejoras introducidas

En este estudio se investigó un tipo de infertilidad clasificada como idiopática. Específicamente, se analizó una variante genética que afecta al gen *Syce1*, y su potencial conexión con el fenotipo de infertilidad encontrado en pacientes que presentan la mutación en homocigosis, tal como fue reportado por Maor Sagie y colaboradores en el 2015.

Además de investigar la asociación con la infertilidad, se realizaron aportes al mecanismo de acción detrás de esta mutación y sus implicancias. Para responder a estas interrogantes se creó una línea de ratones humanizados, es decir, ratones que portaban una mutación equivalente a la observada en humanos, utilizando el sistema de mutagénesis dirigida CRISPR/Cas9. Dado que existe un alto grado de similitud entre las secuencias genómicas del gen *SYCE1* humano y *Syce1* de ratón, fue posible generar una mutación en el ratón equivalente a la mutación *SYCE1 c.197-2A>G* observada en humanos. Esta mutación se denominó *Syce1 c.203-2A>G*. La generación de este modelo animal proporcionó una valiosa herramienta para investigar la causa y el desarrollo de los casos de infertilidad relacionados con esta mutación.

El uso de la tecnología de edición genómica CRISPR/Cas9 demostró nuevamente su alta eficiencia en la generación de modelos murinos humanizados. Nuestro equipo de investigación ya contaba con experiencia en su aplicación para la creación de una línea de ratones modelo humanizados, un proyecto que también se llevó a cabo en colaboración con la UBAL del IPMont. Durante ese proceso, se había creado una línea de ratones con una mutación equivalente a la humana *SYCE1 c.613C>T* ("línea 613"; en ratón *SYCE1 c.727C>T*) mediante la precisa introducción de una modificación puntual en el genoma del ratón, generando así un "knock-in" (KI). Para lograr este objetivo, es necesario promover la utilización de la vía de reparación basada en homología (HDR). Como hemos visto, esta vía requiere la incorporación en el sistema de un ADN molde o donante hebra simple (ssODN), cuya secuencia contenga los cambios que se desea introducir y secuencias homólogas flanqueantes para su direccionamiento al sitio objetivo. En el caso de la línea 613, el molde fue

diseñado en forma simétrica, es decir, de la forma clásica, dejando aproximadamente centrada la mutación que se quería introducir, y brazos de homología a cada lado. De esta manera, se logró que entre los ratones editados generados en la F0 (la mayoría de los cuales contenían cambios de tipo *indels* producto de reparación vía NHEJ), alguno contuviera la edición buscada, como consecuencia de la reparación del DSB inducido por Cas9 vía HDR, al utilizar el molde como plantilla (Hernández López *et al.*, 2020).

Para la generación de este segundo mutante se hizo uso de la experiencia acuñada, y se incorporaron algunas modificaciones que facilitaron el trabajo. En primer lugar, en el diseño del ssODN, se empleó una estrategia de molde asimétrico con características tales que promovía la reparación por la vía HDR, y en consecuencia la introducción de los cambios genómicos deseados. Esta estrategia, reportada por Yang *et al.*, 2015, fue empleada como alternativa al clásico molde con la mutación a introducir en el centro (Hernández López *et al.*, 2020). Esta estrategia resultó más exitosa, incrementando la proporción de individuos F0 portadores de la mutación de interés (es decir, que repararon el DSB empleando el ssODN como molde), como se puede apreciar en la Tabla 8, en la que se comparan los resultados obtenidos mediante ambas estrategias.

**Tabla 10.** Comparación de porcentajes relativos de genotipos en generación F0 empleando molde simétrico (*Syce1 c.727C>T*) y asimétrico (*Syce1 c.203-2A>G*).

	<i>Syce1 c.727C&gt;T</i>	<i>Syce1 c.203-2A&gt;G</i>
KI	6%	21,4%
Indels	59%	35,7%
WT	35%	42,3%

En segundo lugar, se introdujo un sitio de restricción que permitiera discriminar genotipos sin necesidad de secuenciar. Esto fue logrado en el diseño contemplando la interrupción del PAM y la simultánea introducción de un sitio de restricción ausente en esa región, en el genoma WT. Para basar el genotipado en esta estrategia, resultó fundamental primero corroborar mediante secuenciación en el espécimen fundador de la línea, la correlación positiva entre la mutación y el sitio de restricción. Esta correlación pudo corroborarse en este

trabajo, permitiendo genotipar en base a los patrones de restricción obtenidos sobre los productos de PCR, como se detalló anteriormente. Cabe mencionar que no siempre ocurre de este modo; en el caso de la línea 613 generada por el grupo, si bien el diseño incluía también la introducción de un nuevo sitio de restricción, no se pudo basar el genotipado en ello porque el ratón fundador presentó la mutación deseada, pero no así el sitio de restricción, sugiriendo que el ssODN empleado había sido empleado sólo parcialmente como molde en el momento de la reparación/edición. Esto resultó práctico, al simplificar el procedimiento de genotipado de todos los animales descendientes del cruzamiento de individuos F1, al acortar tiempos y, sobre todo, abaratar costos.

### Los ratones mutantes *KI Syce1 c.203-2A>G* reproducen el fenotipo de los pacientes infértiles.

La mutación bajo estudio fue inicialmente informada a partir de los resultados llevados a cabo en una investigación molecular de dos hombres azoospermicos que provenían de una familia consanguínea (Maor Sagie *et al.*, 2015). Gracias a nuestro trabajo, podemos afirmar que, en el modelo murino, la mutación *Syce1 c.203-2A>G*, cuando en homocigosis, es suficiente para provocar infertilidad en ratones macho. Más aún, si bien por tratarse de una mutación hallada en varones no se analizaron en detalle las hembras, los resultados de los estudios de fertilidad nos indican que la presencia bialélica de esta mutación en ratones hembra es causa de infertilidad (ver Tabla 7). En los casos de infertilidad femenina, ésta se debería a POF, ya que, al disecar a las hembras homocigotas para la mutación, nos encontramos con que las mismas presentaban ovarios diminutos e histología que denotaba una marcada atresia folicular.

Sin embargo, se observó que la gran mayoría de ratones heterocigotas para la mutación no presentó diferencias morfológicas o funcionales en comparación con sus compañeros de camada WT, lo que también se asemeja a lo observado en el caso de los varones heterocigotas para la mutación. Por lo tanto, en este caso, podemos concluir que la infertilidad sigue un patrón de herencia recesiva, descartando la posibilidad de dominancia negativa para la mutación en estudio. Esto coincide con lo que hemos observado anteriormente para la mutación *SYCE1 c.727C>T*. Si bien la interpretación molecular de estos fenómenos será

discutida en otro capítulo, más adelante, nos interesa remarcar la conclusión de que, tanto para los ratones mutantes homocigotas como para los heterocigotas, el fenotipo reprodujo el observado en los hombres portadores de la mutación.

**La mutación *Syce1* c.203-2A>G produce interrupción de la meiosis, y muerte celular programada.**

El análisis comparativo de la histología testicular entre los ratones mutantes heterocigotas y los ratones WT adultos hermanos de camada, no reveló diferencias en cuanto al contenido celular. En ambos casos se encontraron túbulos seminíferos de aspecto y tamaño normal, que mostraban en su interior células germinales en diversos estadios de maduración, reflejo de una espermatogénesis sin alteraciones evidentes. Estos resultados concuerdan con nuestros hallazgos en los ensayos de fertilidad, así como con el fenotipo observado en humanos heterocigotas, según lo informado por Maor Sagie y colaboradores.

En contraste, las imágenes obtenidas mediante análisis microscópico de la histología testicular de los ratones mutantes homocigotas adultos revelaron túbulos seminíferos de notorio menor calibre y con un epitelio seminífero de aspecto inmaduro, que sugería una interrupción temprana del proceso de espermatogénesis.

De forma complementaria, los análisis realizados mediante CMF confirmaron una deficiencia en la espermatogénesis en los ratones mutantes homocigotas, con perfiles que evidenciaban claramente la ausencia de células postmeióticas con contenido C de ADN. Este hecho indica que la meiosis se detiene o se estanca en la profase meiótica I, lo que se condice con el fenotipo de infertilidad observado en estos ratones. Esto también explicaría la reducción en el tamaño de la gónada, ya que, si bien las células somáticas testiculares (que no requieren meiosis para su desarrollo) no se ven afectadas y continúan su desarrollo normal, el proceso de espermatogénesis está alterado, quedando arrestado o detenido, comprometiendo el normal desarrollo de la línea germinal. Esto nos indica que la mutación genética presente en los ratones homocigotas tiene un impacto significativo en la maduración de las células germinales.

La inmunomarcación con  $\gamma$ H2AX es de empleo habitual para evidenciar los DSBs. La marca de  $\gamma$ H2AX presente en los espermatoцитos de los ratones KI

homocigotas *Syce1* c.203-2A>G, en forma de una nube difusa en todos los cromosomas, se asemejó a la observada en los ratones WT y heterocigotas durante el L. Contrariamente, nunca se observó la señal restringida al cuerpo XY, típica del P. Esto sugiere que, en los mutantes homocigotas, la meiosis no progresaría más allá de la profase meiótica temprana. Asimismo, el fenotipo de inmunomarcación dispersa y sostenida de  $\gamma$ H2AX fue también reportado para los ratones KO *Syce1*<sup>-/-</sup>, *Syce3*<sup>-/-</sup> y *Six6os1*<sup>-/-</sup> (Bolcun-Filas *et al.*, 2009; Gómez-H *et al.*, 2016; Schramm *et al.*, 2011).

El papel de las caspasas en la diferenciación espermática y la madurez testicular es un tema de gran interés en biología reproductiva (Almeida *et al.*, 2011) Las caspasas son una familia de proteasas de cisteína que desempeñan un papel crucial en la apoptosis. La activación de las caspasas puede conducir a la escisión de diversos sustratos celulares, lo que en última instancia provoca la fragmentación del ADN y el inicio de la muerte celular apoptótica (McIlwain *et al.*, 2013). Para mantener la homeostasis testicular, unos sistemas pro-supervivencia y pro-apoptóticos muy activos trabajan conjuntamente para regular el grado de apoptosis de las células espermátogénicas, con el fin de producir un suministro constante de gametos masculinos de calidad (Kuladip *et al.*, 2010)

Por medio del estudio del papel de la caspasa-3 activada en relación con la muerte apoptótica de células germinales, pudimos demostrar que la mutación *Syce1* c.203-2A>G da lugar a niveles aumentados de apoptosis en los espermatocitos. Mediante la detección de la caspasa-3 activada y su translocación desde el citoplasma para concentrarse en los núcleos, se demostró que hay una diferencia significativa en la intensidad de fluorescencia presente en espermatocitos de mutantes homocigotas en comparación con ratones WT. Estos datos son concordantes con los de estudios previos donde se observó un incremento de la caspasa 3 activada en ratones con azoospermia (Kim *et al.*, 2001). Adicionalmente, se empleó la reacción de TUNEL para marcar procesos apoptóticos a nivel del epitelio seminífero, encontrándose también una diferencia significativa a favor del mutante homocigota, lo que confirma el incremento de apoptosis en estos mutantes. La no reparación de DSBs no permitiría superar

los puntos de control (*check-points*) paquiténicos, lo que a su vez conduce a la muerte celular programada.

En conjunto, estas observaciones indican que en los mutantes homocigotas se produciría una detención de la meiosis en profase temprana y un aumento de los procesos de muerte celular programada. A su vez, la pérdida de células, seguramente tiene consecuencias directas sobre el tamaño gonadal.

### La mutación *Syce1* c.203 -2A>G acarrea problemas en el correcto ensamblaje del CS.

Mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra SYCE1 y otros componentes del CS, y con el empleo de un microscopio confocal de alta resolución, pudimos visualizar la progresión de la meiosis y analizar comparativamente el ensamblaje del CS en especímenes WT, heterocigotas y homocigotas para la mutación.

En primer lugar, se quiso determinar si la proteína SYCE1 putativa aberrante que resultaría de la mutación era cargada a los CSs. En los ratones mutantes homocigotas, no se pudo detectar su presencia sobre los CS en formación, lo que indica que la mutación *Syce1* c.203-2A>G en homocigosis tiene consecuencias sobre el normal ensamblado del CS, y que la proteína predicha, o bien no está presente en los mutantes, o está presente en las células pero no se está cargando al CS. Posteriormente, mediante ensayos de Western blot, pudo determinarse que la proteína aberrante no se encuentra presente, al menos en niveles detectables.

Cuando se estudió la distribución de SYCP3 mediante inmunolocalizaciones sobre esparcidos, se pudo comprobar que para los mutantes homocigotas no se encontraron espermatoцитos con CSs totalmente sinapsados (*i.e.* estadio de P), ni parcialmente sinapsados (*i.e.* estadio de Z), sino elementos axiales, a lo sumo alineados, pero no sinapsados (*i.e.* fenotipo de asinapsis). Esto es consistente con el fenotipo de marca para  $\gamma$ H2AX que, como hemos señalado, no mostró marcaciones semejantes a las observadas para espermatoцитos en P. Por ende, pudo demostrarse que la mutación en estudio, cuando en homocigosis, estaba afectando gravemente el apareamiento o sinapsis de cromosomas homólogos.

Se cree que la formación del CS en los mamíferos sigue un proceso jerárquico que implica el ensamblaje secuencial de sus componentes (Cahoon y Hawley, 2016; Fraune *et al.*, 2012; Gao y Colaiácovo, 2018). Como hemos

mencionado (ver Introducción), este proceso comienza con la organización de los elementos axiales que contienen la proteína SYCP3 y SYCP2 a lo largo de los ejes cromosómicos. SYCP1 se posiciona con sus extremos N-terminales dentro del EC, ubicado en el centro entre los ejes emparejados, y sus extremos C-terminales se asocian con los ELs unidos a los cromosomas (de Vries *et al.*, 2005; Duncce *et al.*, 2018; Schücker *et al.*, 2015; Zickler and Kleckner, 2015; ver Figura 5B). Posteriormente, la proteína SYCE3 del EC interrumpe la red tetramérica de SYCP1 y la reorganiza en una red SYCP1-SYCE3 (Crichton *et al.*, 2022). Adicionalmente, SYCE3 recluta los complejos del EC SYCE1-SIX6OS1 y SYCE2-TEX12, que fortalecen la red SYCP1-SYCE3 y permiten su extensión a lo largo de todo el eje cromosómico para lograr una sinapsis completa (Crichton *et al.*, 2022).

Estudios anteriores basados en la generación y estudio de ratones con pérdida de función (KO) han demostrado que la ausencia de ciertas proteínas de la RC del CS como SYCP1, SYCE3 o SYCE1, resulta en la infertilidad de los animales debido a que la estructura del CS no se forma correctamente (de Vries *et al.*, 2005, Schramm *et al.*, 2011; Bolcun-Filas *et al.*, 2009). Si bien la línea murina caracterizada durante este proyecto no se trató de ratones KO, la ausencia de niveles detectables de la proteína SYCE1 aberrante hace esperable que esta línea KI presente similitudes con el KO correspondiente (*Syce1*<sup>-/-</sup>) (Bolcun-Filas *et al.*, 2009). De hecho, algunas de las observaciones reportadas para el KO de *Syce1* coinciden con las encontradas en el presente trabajo. Por ejemplo, tanto en los ratones *Syce1*<sup>-/-</sup> como en los mutantes homocigotas caracterizados durante el proyecto, se observa una alteración en la distribución de SYCP1 en el CS en formación. En condiciones normales, la proteína SYCP1 se detecta exclusivamente en las zonas ya sinapsadas del CS en formación (Meuwissen *et al.*, 1992). Sin embargo, como se presentó en la sección Resultados, en los CSs en formación del mutante homocigota se observa la presencia de SYCP1 a lo largo de los ejes cromosómicos alineados, a pesar de no estar sinapsados. Esta diferencia estaría relacionada con alteraciones en la formación normal de la estructura del CS en estos animales. Tal como en el caso de estudio de mutantes específicos estudiados para SIX6OS1 (Sánchez-Sáez *et al.*, 2020), podemos suponer que la falta de SYCE1 limita la capacidad de iniciar la formación del EC del CS; de hecho, se ha propuesto que SYCE1 y SIX6OS1



funcionan estabilizando una estructura local tridimensional del CS que media el reclutamiento y autoensamblado de SYCE2-TEX12 en fibras que, a su vez, median la elongación del CS a lo largo del eje cromosómico (Sánchez-Sáez *et al.*, 2020).

Con respecto a SYCE3, pudimos detectarla sobre los elementos axiales de los mutantes homocigotas. Este resultado está en concordancia con lo descrito para los ratones KO por Schramm y colaboradores en 2011, quienes encontraron que el cargado de SYCE3 al CS en formación no dependía de la presencia de SYCE1 (Schramm *et al.*, 2011). Esto es esperable, ya que, como se mencionó más arriba, SYCE3 estaría en un orden jerárquico de ensamblado anterior a SYCE1, y la carga del resto de los componentes de la RC del CS, con excepción de SYCP1, depende de la carga previa de SYCE3 (Schramm *et al.* 2011). Sin embargo, sí se observaron importantes diferencias con relación a la distribución de esta proteína sobre los elementos axiales no sinapsados de los mutantes homocigotas, en comparación con los WT y heterocigotas. Como se puede observar en la Figura 25 A, la distribución de SYCE3 en los casos de los WT y mutantes heterocigotas se limita a las zonas ya sinapsadas de los CS. En contraste, en los espermatoцитos de los mutantes homocigotas se detectó SYCE3 sobre todo el largo de los elementos axiales no sinapsados, si bien la densidad de marca fue menor. En consecuencia, si bien la carga en sí misma de SYCE3 al CS es independiente de la presencia de SYCE1, las alteraciones observadas en su distribución sugieren que la ausencia de SYCE1 conduce, de algún modo, a un patrón de unión inusual de SYCE3. Por ende la ausencia de SYCE1 modificaría el patrón de distribución de SYCE3. Más aún, revisando las imágenes del mutante *Syce1* línea 613 producido anteriormente en nuestro laboratorio, observamos que los resultados obtenidos con respecto a la distribución inusual de SYCP1 y de SYCE3 en este trabajo coinciden con los observados para el otro mutante, si bien no habíamos reparado en ello anteriormente.

Tomando en cuenta el orden y el modelo de ensamblado de las proteínas de la RC señalado más arriba, la distribución inusual de SYCE3 observada en los mutantes homocigotas podría ser consecuencia de la más temprana distribución inusual de SYCP1. La ausencia de SYCE1 y sus consecuencias en la

distribución de otros componentes del CS, claramente reflejan la interrelación existente entre ellos y sugieren un rol importante de la proteína SYCE1 en la distribución específica de otras proteínas del CS. Especialmente, indican que la ausencia de SYCE1 no sólo impacta en la distribución de las proteínas que se cargan al CS posteriormente a ella, sino que también tiene un impacto sobre la distribución y disposición sobre los ejes cromosómicos, de los componentes que se cargan con anterioridad (*i.e.* SYCP1 y SYCE3).

Según nuestros resultados en ratones homocigotas, también existe un impacto específico en la incorporación de TEX12 al CS. Este componente del EC del CS no pudo detectarse sobre los CS en formación de los mutantes homocigotas. Cabe mencionar que esta es una diferencia significativa con relación a los ratones KO para el gen *Syce1*, en los cuales los autores sí detectaron TEX12 cargada a la estructura, presentándose en focos intermitentes entre los elementos axiales cercanos alineados (Bolcun-Filas *et al.*, 2009). Esta diferencia entre el KO *Syce1*<sup>-/-</sup> y el KI de este trabajo no sería, en principio, esperable si el KI homocigota careciera por completo de una proteína trunca aberrante. Sin embargo, la diferencia de hecho se observa, dejando en evidencia que existen varias capas de complejidad en estos procesos y que, probablemente, algunas de las herramientas empleadas en los estudios no sean lo suficientemente sensibles. Por ejemplo, una posibilidad es que en el KI la proteína trunca aberrante sí esté presente pero en cantidades minúsculas, indetectables en ensayos de Western blot, y que de alguna manera esté afectando el ensamblaje de otras proteínas como TEX12.

¿Y qué sucede con el “socio directo” de SYCE1, es decir, SIX6OS1, con la cual SYCE1 forma un complejo, para su cargado al CS? Los análisis de los ratones homocigotas para la mutación *Syce1* c.203-2A>G revelaron que SIX6OS1 no se carga al CS en formación, lo que indicaría que, en ausencia de SYCE1 y de las interacciones multivalentes que ocurren entre ambas (Sánchez-Sáez *et al.*, 2020), SIX6OS1 por sí misma, es incapaz de integrarse al EC del CS.

De esta forma, la integridad de las interfaces de unión SYCE1-SIX6OS1, sería esencial para el cargado de SIX6OS1. Curiosamente, en pacientes con proteínas SIX6OS1 truncadas que presentan dominio  $\alpha$ -helicoidal y sitios de

unión a SYCE1, se ha observado un fenotipo menos severo, en el cual también se forman tramos cortos de SYCP1 en los cromosomas. Sin embargo, estos cromosomas que reclutan SIX6OS1 truncada experimentan una asinapsis parcial en lugar de una asinapsis extensa, aunque esta asinapsis parcial es suficiente para causar defectos en la reparación de DSBs, alterar la formación del cuerpo XY y dificultar la progresión a través de la etapa de P (Fan *et al.*, 2021).

Finalmente, el mutante *Syce1* c.203-2A>G, con su fenotipo de retención de reclutamiento de algunos componentes como SYCP1 y SYCE3 en los ejes cromosómicos, y falta de reclutamiento de SIX6OS1 y de complejos SYCE2-TEX12, sugiere un modelo jerárquico de ensamblaje del CS en el que SYCE1-SIX6OS1 se sitúan aguas abajo de SYCP1 y SYCE3, y aguas arriba de SYCE2-TEX12, lo cual es consistente con los datos proporcionados por los mutantes KO (Bolcun-Filas *et al.*, 2007, 2009; De Vries *et al.*, 2005; ; Gómez-H *et al.*, 2016; Hamer *et al.*, 2008; Schramm *et al.*, 2011).

Estos resultados apoyan la existencia de una coordinación crucial entre los elementos constitutivos del CS en el proceso de su formación y estabilización. El presente estudio ofrece, por lo tanto, una perspectiva que contribuye significativamente a nuestra comprensión de la organización y función de este complejo esencial en la meiosis.

### **En las células meióticas de los individuos mutantes homocigotas no se forma el cuerpo XY**

Como hemos visto, los cromosomas homólogos en los espermatoцитos de los ratones KI homocigotas para la mutación *Syce1* c.203-2A>G no están sinapsados. Sin embargo, los elementos axiales están presentes y SYCP1 se detecta lo largo de ellos, indicando que los núcleos han avanzado más allá del estadio de L y, al no poder ocurrir la sinapsis cromosómica, quedan “arrestados” o detenidos en un estado de asinapsis que recuerda a un pre-P.

No obstante, ocurren anomalías que nos indican que no se trata simplemente de un arresto meiótico, sino que hay un apartamiento de lo que correspondería a un proceso normal. Un ejemplo de esto es lo ocurrido con los cromosomas sexuales.

Como hemos mencionado varias veces a lo largo del texto, en los espermatoцитos de los mutantes homocigotas no hay un cuerpo XY evidente ni un alineamiento de los cromosomas XY en el estadio de asinapsis. Por el contrario, los cromosomas sexuales aparecen alejados entre sí, en regiones distantes del núcleo. Podemos suponer que, cualquiera sea el mecanismo que produce el acercamiento entre cromosomas homólogos, la corta región de complementariedad entre ambos integrantes del par sexual (región pseudoautosómica), resulta insuficiente en los mutantes homocigotas para desencadenar dicho mecanismo y, por ende, provocar el acercamiento y alineamiento entre ambos cromosomas. En consecuencia, SYCE1 parece cumplir un rol para establecer el cuerpo XY y la correcta alineación de los cromosomas sexuales. Este hecho, por sí solo, podría tener implicancias en la viabilidad de los gametos masculinos en formación y la fertilidad de los individuos con esta proteína afectada, ya que la no formación del cuerpo XY y correcta inactivación de su cromatina, son, por sí mismos, causa de arresto meiótico, al ser sensadas por los puntos de control paquiténicos (Subramanian y Hochwagen, 2014).

La ausencia del cuerpo XY también ha sido reportada para varios mutantes *null* de componentes de CS (*Sycp1*<sup>-/-</sup>, *Syce1*<sup>-/-</sup>, *Tex12*<sup>-/-</sup>, *Syce2*<sup>-/-</sup> y *Syce3*<sup>-/-</sup>) que carecen de sinapsis, donde las DSBs no se reparan adecuadamente y los cromosomas X e Y no sinapsan correctamente (Bolcun-Filas *et al.*, 2007, 2009; De Vries *et al.*, 2005; Gómez-H *et al.*, 2016; Hamer *et al.*, 2008; Schramm *et al.*, 2011).

### Sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la infertilidad

La mutación estudiada, *Syce1* c.203-2A>G, corresponde a la modificación del sitio aceptor de *splicing* en el intrón 3-4 del gen *Syce1*, lo que resulta en la imposibilidad de procesar ese intrón y que la traducción continúe dentro del intrón hasta que se encuentra con un codón *stop* no canónico. En este caso, la proteína trunca, de existir, además de ser mucho más corta que la proteína WT, poseería 15 aa que no se encuentran presentes en la proteína normal, compartiendo únicamente los primeros 68 aa con ella. En consecuencia, podría suceder que esta proteína trunca tan corta no fuera capaz de cargarse a los CSs, que se cargara a los CSs pero no pudiera interactuar con los componentes que se unen

corriente abajo, o incluso que interactuara parcialmente con algún componente pero de modo fallido, impidiendo el correcto ensamblaje del CS. Los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia descartaron las últimas posibilidades, ya que no observamos la proteína trunca sobre los CSs en los espermatoцитos de los ratones mutantes.

En este contexto, se plantearon dos posibilidades respecto a los casos de infertilidad observados. Una posibilidad es que la supuesta proteína trunca SYCE1 estuviera presente pero no pudiera incorporarse al CS debido a que su interacción con SYCE3 y SIX60S1 se viera impedida, lo que sería esperable ya que, a juzgar por los resultados de los estudios *in vitro*, carecería de algunos dominios necesarios para ello (Sánchez-Sáez et al., 2020). La otra posibilidad es que la proteína SYCE1 trunca, o su ARNm, no estuvieran presentes, lo que podría ocurrir, ya sea por degradación de la proteína aberrante, o afectación de los niveles del transcripto con el intrón no procesado. Para abordar estas posibilidades, en primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de Western blot. Los resultados no pudieron detectar la presencia de la proteína trunca predicha en los ratones mutantes homocigotas ni en los mutantes heterocigotas.

Para investigar la presencia del transcripto, se cuantificaron los niveles de transcripto *Syce1* en ratones mutantes homocigotas mediante RT-qPCR, y se compararon con sus compañeros de camada WT y heterocigotas. Los resultados revelaron, en comparación con la condición WT, niveles mínimos de transcripto en los mutantes homocigotas y niveles intermedios en los mutantes heterocigotas. Por lo tanto, la presencia homocigota de la mutación *Syce1* c.203-2A>G conduce a un fenotipo similar al observado por nuestro grupo para ratones portadores de la mutación *Syce1* c.727C>T (Hernández López et al., 2020), y los mecanismos moleculares en la base de la enfermedad (patogenia) serían también similares.

Es significativo resaltar que la mayoría de las mutaciones relacionadas con la infertilidad se encuentran en individuos homocigotos, típicamente en familias consanguíneas. Por tratarse de mutaciones recesivas, ambos alelos deben presentar la mutación para que se manifieste el fenotipo de infertilidad. Esto explica por qué la mayoría de los casos de infertilidad relacionados con el CS se

detectan en familias consanguíneas (e.g. pareja de primos hermanos), donde es más probable que los individuos compartan las mismas mutaciones.

Por otra parte, los hombres heterocigotas para la mutación fueron fértiles y fenotípicamente normales, condición que se reprodujo en los ratones mutantes generados en este estudio. Una información relevante para entender por qué mutaciones heterocigotas suelen ser silenciosas y no se detectan con frecuencia en la población general, se relaciona con la vía *Non-sense mediated decay* (NMD). En ese sentido, el organismo regula la expresión de proteínas defectuosas para evitar interferencias con funciones normales. Un mecanismo posible es la vía NMD, que funciona para degradar transcritos aberrantes que contienen codones de terminación prematuros (PTCs). Las mutaciones que generan PTCs causan aproximadamente un tercio de todas las enfermedades genéticas humanas conocidas (Miller y Pearce, 2014), y es bien sabido que el NMD es un importante mecanismo de protección, en heterocigosis, contra enfermedades, al degradar transcritos anómalos (Miller and Pearce, 2014).

En el curso de diversos estudios genéticos se ha advertido la presencia de mutaciones en genes relacionados con el CS en individuos que aún mantienen su fertilidad (ver Tabla 1). Este hallazgo reviste una importancia sustancial en la comprensión de la genética de la infertilidad. Los individuos heterocigotos, al conservar al menos una copia no mutada del gen en cuestión, pueden mantener su capacidad reproductiva. Esta circunstancia se debe a que el alelo no afectado es capaz de compensar la función disminuida o alterada del alelo mutante, lo que en última instancia se traduce en una fertilidad normal. De ese modo, muchas mutaciones heterocigotas no tienen consecuencias fenotípicas, al permitir la producción de cantidades suficientes de producto desde el alelo WT, y degradarse el ARNm producido por el alelo mutante. En caso de no degradarse, esos ARNm podrían conducir a la producción de proteínas anómalas que, eventualmente, podrían llegar a interferir con la función de la proteína normal, por ejemplo, secuestrando otros productos interactuantes, receptores, etc. En el caso del CS, ese posible efecto es claro, ya que se trata de componentes estructurales que interactúan entre sí formando una especie de andamio, tienen un orden preciso de ensamblado, y las distintas regiones de cada una de estas proteínas cumple un rol específico en el ensamblado. Es así

que la mayoría de las mutaciones heterocigotas pasan desapercibidas, ya que no presentan la problemática típicamente relacionada con las mutaciones del CS. Esto contrasta con lo observado en la mutación de SYCP3 reportada por Miyamoto *et al.* en 2003, en la cual se informó de un efecto dominante negativo en pacientes heterocigotos debido a la interferencia de la proteína SYCP3 trunca con la polimerización de la proteína WT (Bolor *et al.*, 2009). Si se encuentran mutaciones heterocigotas que conduzcan a una proteína trunca no degradada en otros genes del CS, incluyendo SYCE1, es altamente probable que también tendrán efecto dominante negativo, al interferir con la polimerización y correcta formación del CS.

En el caso concreto de la mutación en estudio, a pesar de no tratarse estrictamente de una mutación *non-sense* (creación de codón *stop* prematuro como consecuencia directa de la mutación puntual), el no procesamiento del intrón 3-4 conduce a la aparición, dentro del marco de lectura, de un triplete que funcionará como codón *stop* prematuro durante la eventual traducción del transcripto.

Postulamos que la posible degradación de ese transcripto aberrante por NMD y, en consecuencia, la falta de una proteína SYCE1 trunca interferente, al menos en niveles detectables mediante procedimientos habituales de estudio, podría entonces explicar el fenotipo de los ratones mutantes heterocigotas, ya que éstos producirán la proteína normal sin interferencia y, por ende, presentarán fenotipo fértil.

## CONCLUSIONES

En esta tesis, se llevó a cabo una investigación exhaustiva sobre un tipo de infertilidad clasificada como idiopática, centrándonos en la mutación *Syce1* c.203-2A>G como una posible causa subyacente. Los resultados obtenidos han arrojado importantes hallazgos que contribuyen significativamente a la comprensión de la infertilidad asociada con esta mutación.

En primer lugar, se confirmó que la mutación *Syce1* c.203-2A>G es responsable de la infertilidad en ratones homocigotas y se estableció una conexión con la infertilidad en pacientes humanos que también presentan esta mutación en homocigosis. Además, se demostró que la infertilidad en estos casos sigue un patrón de herencia recesiva, sólo manifestándose cuando está en homocigosis. Por otra parte, la introducción de la mutación *Syce1* c.203-2A>G en el genoma de ratones provoca infertilidad tanto en machos como hembras cuando está presente en homocigosis lo que permite sospechar que, en caso de identificarse mujeres homocigotas para esta mutación, las mismas también serán infértiles.

La utilización de la tecnología de edición genómica CRISPR/Cas9 para generar un modelo murino humanizado fue exitosa para la mutación *Syce1* c.203-2A>G, permitiéndonos investigar las causas y los mecanismos en la base de la enfermedad. Esta metodología demostró alta eficiencia y se consolidó como una herramienta valiosa para el estudio de mutaciones genéticas y sus efectos fenotípicos. Además, se introdujeron modificaciones que mejoraron la eficiencia de mutagénesis y el genotipado con respecto a experiencias anteriores del grupo, lo que representa un avance de cara a futuros estudios.

En conjunto, los análisis histológicos, citométricos, de inmunofluorescencia y TUNEL realizados en los ratones mutantes homocigotas revelaron una interrupción temprana del proceso de meiosis, lo cual condujo a una disminución significativa en el tamaño de las gónadas, y afectó el contenido celular y la formación adecuada de los espermatozoides, desencadenando mecanismos de apoptosis. Por esta razón, podemos afirmar que la sola presencia de la mutación en homocigosis provoca azoospermia no obstructiva en ratones, coincidiendo con el fenotipo encontrado en humanos homocigotas para la mutación.



La mutación estudiada provoca alteraciones en el ensamblaje del CS y la sinapsis de los cromosomas homólogos en los gametos en formación. La proteína putativa trunca SYCE1 que resultaría como consecuencia de la mutación no se detecta cargada en los CS en formación, así como tampoco la proteína SIX6OS1, que se carga junto con SYCE1, ni el componente TEX12, que se ensambla después. En el caso de las proteínas de cargado previo SYCP1 y SYCE3, las mismas muestran un patrón de unión al CS diferencial al mostrado en individuos WT donde se detectan únicamente en zonas sinapsadas; en los individuos mutantes homocigotas, estas proteínas se encuentran a lo largo del CS en formación con sinapsis impedida. Los resultados también arrojaron indicios sobre posibles disfunciones en la organización de la cromatina durante la meiosis en los mutantes homocigotos SYCE1, como la no reparación de DSBs, ausencia de aproximación entre los cromosomas sexuales y no formación del cuerpo XY. Estos hallazgos proporcionan evidencia sólida de la importancia crítica de SYCE1 en la formación del CS durante la meiosis, y en el establecimiento del cuerpo XY.

Otro aspecto relevante de esta investigación fue la no detección en ensayos de Western blot de la proteína trunca putativa SYCE1 en los ratones mutantes, lo que sugiere que el fenotipo infértil se debe a la ausencia de esta proteína. Sumado a esto, los resultados de las RT-qPCRs sugieren que en los mutantes se produce la degradación del transcripto *Syce1*, lo que a su vez lleva a la ausencia de niveles detectables de la proteína SYCE1. Por lo tanto, podemos afirmar que las consecuencias fenotípicas observadas no serían causadas por alteraciones en las interacciones de SYCE1 trunca con otros componentes del CS, sino más bien por la ausencia de esta proteína.

En conclusión, los hallazgos de esta tesis demuestran que la mutación *Syce1* c.203-2A>G afecta la formación del CS y, en consecuencia, el proceso de meiosis, y destacan la importancia de esta proteína en procesos típicos de la espermatogénesis como la formación del cuerpo XY en células meióticas. Los hallazgos aquí presentados pueden tener implicancias significativas para la investigación y el diagnóstico de la infertilidad en seres humanos, y también resaltan el valor de la tecnología de edición genómica CRISPR/Cas9 para la generación de modelos animales humanizados que nos permitan estudiar

enfermedades genéticas con mayor precisión. Estos resultados abren nuevas vías para futuras investigaciones en el campo de la reproducción y la genética, y podrían eventualmente conducir a terapias dirigidas para el tratamiento de la infertilidad idiopática asociada a la mutación en el gen *Syce1*.

## PERSPECTIVAS Y OTROS RESULTADOS PRELIMINARES

En primer lugar, se aseguró la conservación de la línea de investigación para futuros propósitos científicos. Una vez que se completó la caracterización de la línea *Syce1* c.203-2A>G, se procedió a la preservación mediante la congelación de semen de machos heterocigotos para la mutación en colaboración con el UBAL del IPMont. Este material es extremadamente valioso, y nos permitirá utilizar la misma línea en proyectos futuros con diferentes objetivos.

Por otra parte, considerando las disponibilidades de equipamiento, así como la instalación de un microscopio de superresolución para el desarrollo de técnicas de vanguardia tales como la microscopía *direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy* (dSTORM), *DNA-points accumulation for imaging in nanoscale topography* (PAINT), y microscopía de expansión (ExM), se han dado los puntapiés iniciales tendientes a incorporar estas tecnologías en futuros estudios. Al utilizar estos enfoques innovadores, se busca avanzar en nuestra comprensión de los mecanismos precisos que gobiernan el ensamblaje y desensamblaje del CS, haciendo hincapié en la secuencia temporal de los eventos. Además, buscaremos explorar la interacción de varios componentes moleculares dentro del mismo, con un interés particular en su distribución espacial, especialmente en los puntos de sinapsis y desinapsis. A través de la integración y comparación de estas técnicas de microscopía de súperresolución en sistemas modelo tanto normales como relacionados con la infertilidad, se buscará proporcionar ideas cruciales sobre los procesos dinámicos que ocurren dentro del CS durante la meiosis, que ayuden a comprender las causas de la infertilidad a nivel molecular. En ese sentido, utilizaremos la línea mutante *Syce1* c.203-2A>G de ratones generada en este estudio como modelo para el estudio de problemas de ensamblado del CS a nivel de superresolución, en casos de patologías.

Dicho plan de trabajo estipulado estará enmarcado en el desarrollo de una futura tesis de doctorado, para la cual se cuenta ya con resultados preliminares para las técnicas de PAINT. Como avances alcanzados hasta el momento, destacamos:

Se puso a punto la técnica de DNA-PAINT para nuestro sistema de estudio, en el microscopio de superresolución;

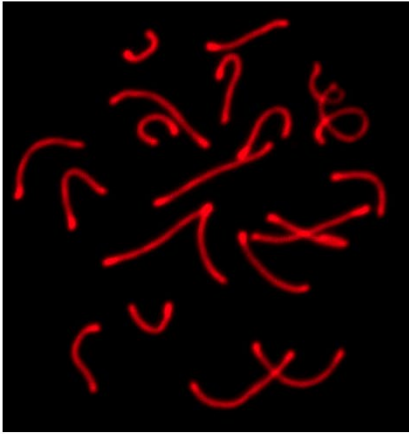
Dado que, en los primeros ensayos, a partir de esparcidos de suspensiones testiculares totales, resultaba difícil identificar los núcleos meióticos, se acopló la técnica con un paso previo de clasificación celular (*sorting*) de la población con contenido 4C, lo que fue muy eficaz para enriquecer en las células de interés de entre el total de células testiculares;

Otra innovación realizada, fue que se incluyó inmunomarcación común contra un componente del CS como guía de orientación, en simultáneo con la técnica de PAINT para otro de los componentes (SYCP3 o SYCP1, según el caso).

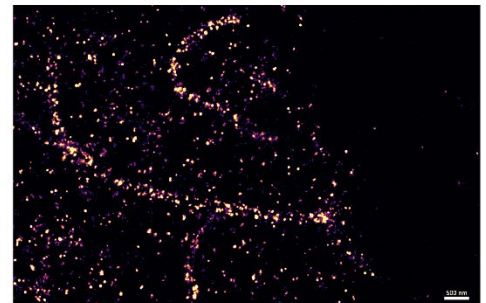
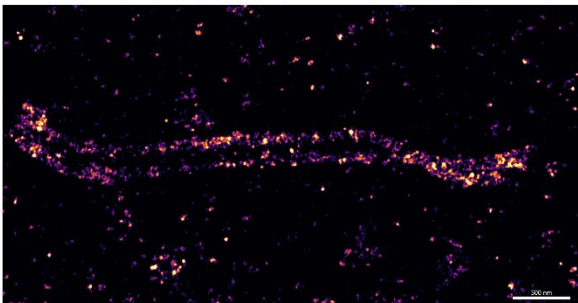
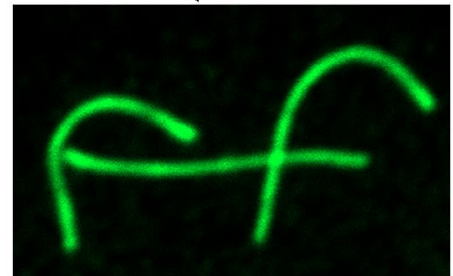
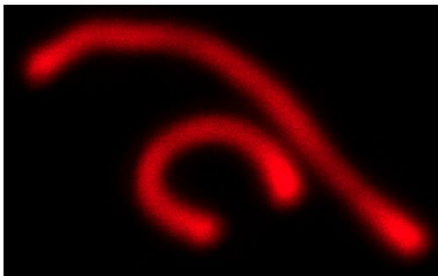
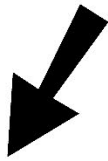
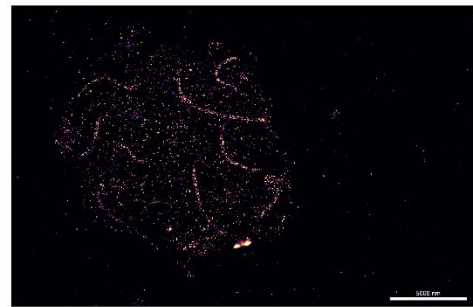
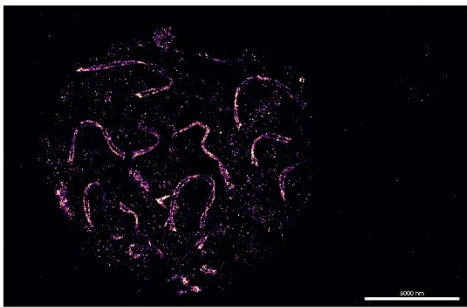
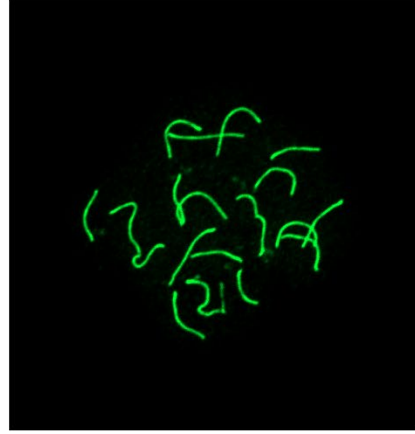
Es importante señalar que, según nuestro conocimiento, no existen antecedentes del uso de DNA-PAINT para estudios del CS. Algunos de los resultados preliminares obtenidos se ejemplifican en la Figura 30.

A)

SYCP3

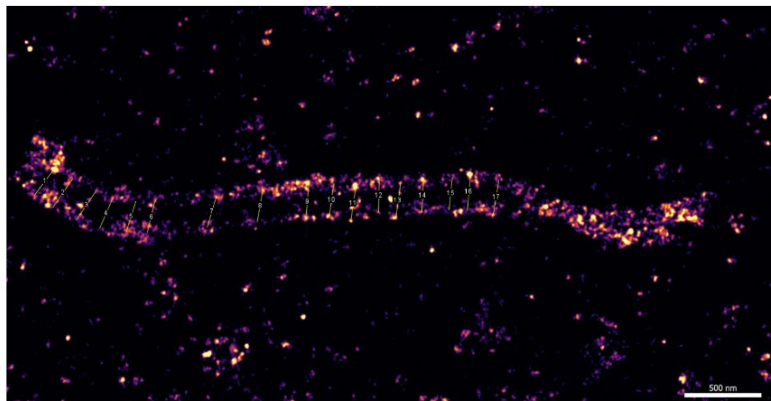


SYCP1

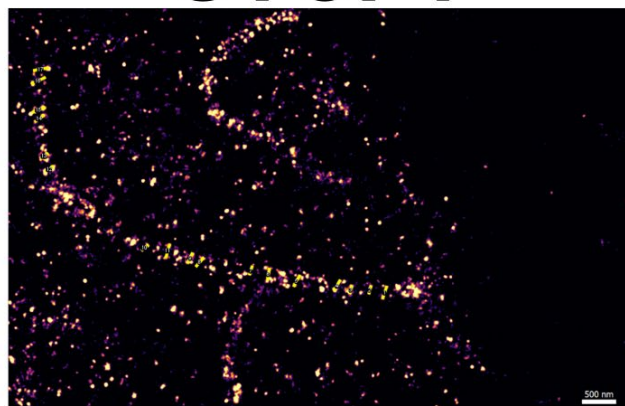


[B)

## SYCP3



## SYCP1



**Figura 30. Detalles estructurales del EL y FT del CS de ratones WT, revelados por la técnica de DNA-PAINT.**

A) Izquierda: Distribución de la proteína SYCP3 mediante microscopía confocal (arriba en rojo) y con DNA-PAINT. En esta última, la imagen muestra dos estructuras lineales separadas permitiendo diferenciar claramente ambos ejes de los EL, aún en estado de P. Derecha: Distribución de los C-termini de SYCP1 mediante microscopía confocal (arriba en verde) y con DNA-PAINT. Las localizaciones mediante DNA-PAINT muestran dos estructuras lineales separadas; esto permite diferenciar ambos extremos C-terminales de los FT. Abajo se muestra comparación a mayor aumento. Referencia de tamaño para las imágenes superiores es de 5000 nm, y de 500 nm en las imágenes inferiores.

B) Se pueden apreciar las diferentes líneas utilizadas para medir la distancia entre los ejes de ambas estructuras. Para el caso de SYCP1 se encuentra una distancia de promedio de 135 nm (Tabla 11), y 219 nm para el caso de SYCP3 (Tabla 11). Estos valores se alinean con los datos obtenidos en estudios de tomografía electrónica del CS y de superresolución (114nm para el ancho del CE y 220nm para el ancho del LE) Spindler *et al.*, 2019).

Como se aprecia, resulta interesante que, tanto para SYCP3 como para SYCP1, se pudieron obtener imágenes de alta calidad, reproduciendo las distancias obtenidas mediante otras metodologías. Este tipo de estudios nos permite medir la distancia entre las diferentes estructuras del CS tal como se puede apreciar en la Tabla 11. En estudios siguientes se buscará efectuar estas mediciones en los mutantes *Syce1* c.203-2A>G, y comparar distancias con las de los ratones WT, pudiendo así determinar con exactitud cuánto más alejados se encuentran los ejes en los casos de patologías dadas por asinapsis.

Con el objetivo de obtener medidas precisas se podrá utilizar técnicas de superresolución variadas, que permitan diferenciar ambos EL y otros componentes del CS, posibilitando de esta forma su medición. En futuros estudios se buscará cuantificar distancias en los diferentes elementos del CS de

individuos WT y homocigotas, permitiendo obtener una mayor comprensión a nivel estructural y de ensamblaje del CS en condiciones normales y de infertilidad.

**Tabla 11.** Cálculo de longitudes para las proteínas SYCP3 y SYCP1

<b>SYCP3</b>	Longitud
1	235,678
2	224,129
3	229,396
4	205,832
5	204,282
6	200,584
7	206,062
8	211,52
9	216,823
10	212,536
11	220,928
12	216,233
13	240,039
14	213,787
15	214,35
16	241,51
17	224,828
Promedio	<b>218,7363</b>

<b>SYCP1</b>	Longitud
1	162,42
2	96,242
3	91,479
4	154,92
5	153,09
6	145,46
7	106,26
8	139,61
9	138,92
10	95,087
11	173,75
12	112,55
13	102,85
14	133,76
15	159,52
16	192,82
17	190,83
Promedio	<b>134,9218</b>

## REFERENCIAS

- Adams, I. R., Davies, O. R. (2023). Meiotic chromosome structure, the synaptonemal complex, and infertility. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, Vol. 24(1), p. 35-61. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-110122-090239>
- Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C. L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., Shah, R. (2021). Male infertility. *The Lancet*, Vol. 397, p. 319-333. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, Vol. 13, p. 37. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
- Ahuja, J. S., Sandhu, R., Mainpal, R., Lawson, C., Henley, H., Hunt, P. A., Yanowitz, J. L., Börner, G. V. (2017). Control of meiotic pairing and recombination by chromosomally tethered 26S proteasome. *Science*, Vol. 355(6323), p. 408-411. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4778>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>th</sup> Ed. New York: Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26914/>
- Almeida, C., Correia, S., Rocha, E., Alves, A., Ferraz, L., Silva, J., Sousa, M., Barros, A. (2013). Caspase signalling pathways in human spermatogenesis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 30(4), p. 487-95. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-9938-8>
- Almeida, C., Cunha, M., Ferraz, L., Silva, J., Barros, A., Sousa, M. (2011). Caspase-3 detection in human testicular spermatozoa from azoospermic and non-azoospermic patients. *International Journal of Andrology*, Vol. 34(5), p. e407–e414. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01151.x>
- Alsheimer, M., Baier, A., Schramm, S., Schütz, W., Benavente, R. (2010). Synaptonemal complex protein SYCP3 exists in two isoforms showing different conservation in mammalian evolution. *Cytogenetic and Genome Research*, Vol. 128(1-3), p. 162-168. <https://doi.org/10.1159/000303341>



- Alsheimer, M., Benavente, R. (1996). Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: expression pattern of nuclear lamin C2 and its regulation. *Experimental Cell Research*, Vol. 228(2), p. 181-188. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0315>
- An, M., Liu, Y., Zhang, M., Hu, K., Jin, Y., Xu, S., Wang, H., Lu, M. (2021). Targeted next-generation sequencing panel screening of 668 Chinese patients with non-obstructive azoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 38(8), p. 1997-2005. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02154-9>
- Arimura, T., Helbling-Leclerc, A., Massart, C., Varnous, S., Niel, F., Lacène, E., Fromes, Y., Toussaint, M., Mura, A. M., Keller, D. I., Amthor, H., Isnard, R., Malissen, M., Schwartz, K., Bonne, G. (2005). Mouse model carrying H222P-*Lmna* mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Human Molecular Genetics*, Vol. 14(1), p. 155-169. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi017>
- Babakhanzadeh, E., Nazari, M., Ghasemifar, S., Khodadadian, A. (2020). Some of the factors involved in male infertility: A prospective review. *International Journal of General Medicine*, Vol. 13, p. 29-41. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S241099>
- Bai, M., Li, Q., Shao, Y., Huang, Y., Li, D., Ma, Y. (2015). Generation of site-specific mutant mice using the CRISPR/Cas9 system. *Yi Chuan*, Vol. 37(10), p. 1029-1035. <https://doi.org/10.16288/j.ycz.15-127>
- Ball, R. L., Fujiwara, Y., Sun, F., Hu, J., Hibbs, M. A., Handel, M. A., & Carter, G. W. (2016). Regulatory complexity revealed by integrated cytological and RNA-seq analyses of meiotic substages in mouse spermatocytes. *BMC genomics*, 17(1), 628. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2865-1>
- Bardhi, E. y Drakopoulos, P. (2021). Update on male infertility. *Journal of Clinical Medicine*, Vol. 10, p. 4771. <https://doi.org/10.3390/jcm10204771>
- Barratt, C. L. R., Björndahl, L., De Jonge, C. J., Lamb, D. J., Osorio Martini, F., McLachlan, R., Oates, R. D., van der Poel, S., St John, B., Sigman, M., Sokol, R., Tournaye, H. (2017). The diagnosis of male infertility: an

- analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Human Reproduction Update*, Vol. 23(6), p. 660-680. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx021>
- Boitani, C., di Persio, S., Esposito, V., Vicini, E. (2016). Spermatogonial cells: mouse, monkey and man comparison. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, Vol. 59, p. 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.03.002>
  - Bolcun-Filas, E. y Handel, M. A. (2018). Meiosis: the chromosomal foundation of reproduction. *Biology of Reproduction*, Vol. 99(1), p. 112-126. <https://doi.org/10.1093/biolre/iory021>
  - Bolcun-Filas, E., Costa, Y., Speed, R., Taggart, M., Benavente, R., De Rooij, D. G., Cooke, H. J. (2007). SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 176(6), p. 741–747. <https://doi.org/10.1083/jcb.200610027>
  - Bolcun-Filas, E., Hall, E., Speed, R., Taggart, M., Grey, C., de Massy, B., Benavente, R., Cooke, H. J. (2009). Mutation of the mouse *Syce1* gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLOS Genetics*, Vol. 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000393>
  - Bolor, H., Mori, T., Nishiyama, S., Ito, Y., Hosoba, E., Inagaki, H., Kogo, H., Ohye, T., Tsutsumi, M., Kato, T., Tong, M., Nishizawa, H., Pryor-Koishi, K., Kitaoka, E., Sawada, T., Nishiyama, Y., Udagawa, Y., Kurahashi, H. (2009). Mutations of the SYCP3 gene in women with recurrent pregnancy loss. *American Journal of Human Genetics*, Vol. 84(1), p. 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.12.002>
  - Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, Vol. 151(8), p. 2551-2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
  - Bui, M. D., Luong, T. L. A., Tran, H. D., Duong, T. T. H., Nguyen, T. N., Nguyen, D. T., Nong, V. H. (2023). A novel frameshift microdeletion of the

- TEX12 gene caused infertility in two brothers with nonobstructive azoospermia. *Reproductive Sciences*, Vol. 30(9), p. 2876-2881. <https://doi.org/10.1007/s43032-023-01226-8>
- Buonomo, S. B., Clyne, R. K., Fuchs, J., Loidl, J., Uhlmann, F., Nasmyth, K. (2000). Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell*, Vol. 103(3), p. 387-398. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00131-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00131-8)
  - Burgoyne, P. S., Mahadevaiah, S. K., Turner, J. M. (2009). The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 10(3), p. 207-216. <https://doi.org/10.1038/nrg2505>.
  - Cascales, L., García-Osorio, O., Ten, J., Girela, J., Moliner, B., De Juan, J., Bernabeu, R. (2015). Influencia de la criptoazoospermia y la azoospermia obstructiva en la calidad embrionaria tras microinyección intracitoplasmática de espermatozoides. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*. Vol. 2(2), p. 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.medre.2015.05.001>.
  - Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G. K. (2008). Caspases - an update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 151(1), p. 10-27. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.05.010>
  - Clermont, Y. (1960). Cycle of the seminiferous epithelium of the guinea pig. A method for identification of the stages. *Fertility and Sterility*, Vol. 11, p. 563-573. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)33961-9](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)33961-9)
  - Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*, Vol. 52(1), p. 198-236. <https://doi.org/10.1152/physrev.1972.52.1.198>
  - Clermont, Y., Perey, B. (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *The American Journal of Anatomy*, Vol. 100(2), p. 241-267. <https://doi.org/10.1002/aja.1001000205>
  - Cool, J., Capel, B. (2009). Mixed signals: development of the testis. *Seminars in Reproductive Medicine*, Vol. 27(1), p. 5-13. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1108005>

- Cool, J., DeFalco, T., Capel, B. (2012). Testis formation in the fetal mouse: dynamic and complex de novo tubulogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, Vol. 1(6), p. 847-859. <https://doi.org/10.1002/wdev.62>
- Costa, Y., Speed, R., Ollinger, R., Alsheimer, M., Semple, C. A., Gautier, P., Maratou, K., Novak, I., Höög, C., Benavente, R., Cooke, H. J. (2005). Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *Journal of Cell Science*, Vol. 118(12), p. 2755-2762. <https://doi.org/10.1242/jcs.02402>
- Crichton, J. H., Duncce, J. M., Dunne, O. M., Salmon, L. J., Devenney, P. S., Lawson, J., Adams, I. R., Davies, O. R. (2023). Structural maturation of SYCP1-mediated meiotic chromosome synapsis by SYCE3. *Nature Structural & Molecular Biology*, Vol. 30(2), p. 188–199. <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00909-1>
- Crispo, M., Van Maele, L., Tabareau, J., Cayet, D., Errea, A., Ferreira, A. M., Rumbo, M., Sirard, J. C. (2013). Transgenic mouse model harboring the transcriptional fusion ccl20-luciferase as a novel reporter of pro-inflammatory response. *PloS One*, Vol. 8(11), e78447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078447>
- Davies, O. R., Maman, J. D., Pellegrini, L. (2012). Structural analysis of the human SYCE2-TEX12 complex provides molecular insights into synaptonemal complex assembly. *Open Biology*, Vol. 2(7). <https://doi.org/10.1098/rsob.120099>
- De Boer, E., Lhuissier, F. G., Heyting, C. (2009). Cytological analysis of interference in mouse meiosis. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 558, p. 355-382. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-103-5\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-103-5_21)
- De Rooij D. (2001). Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*, Vol. 121(3), p. 347-354. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210347>
- De Vries, F. A., de Boer, E., van den Bosch, M., Baarends, W. M., Ooms, M., Yuan, L., Liu, J. G., van Zeeland, A. A., Heyting, C., Pastink, A. (2005). Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic

- recombination, and XY body formation. *Genes & Development*, Vol. 19(11), p. 1376–1389. <https://doi.org/10.1101/gad.329705>
- Dunce, J. M., Dunne, O. M., Ratcliff, M., Millán, C., Madgwick, S., Usón, I., Davies, O. R. (2018). Structural basis of meiotic chromosome synapsis through SYCP1 self-assembly. *Nature Structural & Molecular Biology*, Vol. 25(7), p. 557-569. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0078-9>
  - Dunce, J. M., Salmon, L. J., Davies, O. R. (2021). Structural basis of meiotic chromosome synaptic elongation through hierarchical fibrous assembly of SYCE2-TEX12. *Nature Structural & Molecular Biology*, Vol. 28(8), p. 681-693. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00636-z>
  - Dunne, O. M., Davies, O. R. (2019). Molecular structure of human synaptonemal complex protein SYCE1. *Chromosoma*, Vol. 128(3), p. 223-236. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-00688-z>
  - Egel, R., Penny, D. (2007). On the origin of meiosis in eukaryotic evolution: coevolution of meiosis and mitosis from feeble beginnings. *Recombination and Meiosis. Genome Dynamics and Stability*, Vol. 3. [https://doi.org/10.1007/7050\\_2007\\_036](https://doi.org/10.1007/7050_2007_036)
  - Eijpe, M., Offenbergh, H., Jessberger, R., Revenkova, E., Heyting, C. (2003). Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 160(5), p. 657-670. <https://doi.org/10.1083/jcb.200212080>
  - Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, Vol. 391(6662), p. 43–50. <https://doi.org/10.1038/34112>
  - Fan, S., Jiao, Y., Khan, R., Jiang, X., Javed, A. R., Ali, A., Zhang, H., Zhou, J., Naeem, M., Murtaza, G., Li, Y., Yang, G., Zaman, Q., Zubair, M., Guan, H., Zhang, X., Ma, H., Jiang, H., Ali, H., Dil, S., Shi, Q. (2021). Homozygous mutations in C14orf39/SIX6OS1 cause non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency in humans. *American Journal of Human Genetics*, Vol. 108(2), p. 324-336. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.01.010>

- Feng, K., Ge, H., Chen, H., Cui, C., Zhang, S., Zhang, C., Meng, L., Guo, H., Zhang, L. (2022). Novel exon mutation in SYCE1 gene is associated with non-obstructive azoospermia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Vol. 26(4), p. 1245-1252. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17180>
- Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S. K., Celeste, A., Romanienko, P. J., Camerini-Otero, R. D., Bonner, W. M., Manova, K., Burgoyne, P., Nussenzweig, A. (2003). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Developmental Cell*, Vol. 4(4), p. 497–508. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00093-5](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00093-5)
- Fraune, J., Schramm, S., Alsheimer, M., Benavente, R. (2012). The mammalian synaptonemal complex: protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Experimental Cell Research*, Vol. 318(12), p. 1340-1346. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.018>
- Gao, J., Colaiácovo, M. P. (2018). Zipping and unzipping: protein modifications regulating synaptonemal complex dynamics. *Trends in Genetics: TIG*, Vol. 34(3), p. 232-245. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.12.001>
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 119(3), p. 493–501. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.3.493>
- Gaysinskaya, V., Bortvin, A. (2015). Flow cytometry of murine spermatocytes. *Current Protocols in Cytometry*, Vol. 72. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0744s72>
- Geisinger, A. (2003). *Expresión génica diferencial durante la espermatogénesis de la rata*. [Tesis de doctorado]. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA.
- Geisinger, A., Benavente, R. (2016). Mutations in genes coding for synaptonemal complex proteins and their impact on human fertility. *Cytogenetic and Genome Research*, Vol. 150(2), p. 7785. <https://doi.org/10.1159/000453344>

- Geisinger, A., Rodríguez-Casuriaga, R. (2010). Flow cytometry for gene expression studies in mammalian spermatogenesis. *Cytogenetic and Genome Research*, Vol. 128(1-3), p. 46-56. <https://doi.org/10.1159/000291489>
- Geisinger, A., Rodríguez-Casuriaga, R. (2017). Flow Cytometry for the Isolation and Characterization of Rodent Meioocytes. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), Vol. 1471, p. 217-230. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6340-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6340-9_11)
- Gerton, J. L., Hawley, R. S. (2005). Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nature Reviews. Genetics*, Vol. 6(6), p. 477-487. <https://doi.org/10.1038/nrg1614>
- Ghezraoui, H., Piganeau, M., Renouf, B., Renaud, J. B., Sallmyr, A., Ruis, B., Oh, S., Tomkinson, A. E., Hendrickson, E. A., Giovannangeli, C., Jasin, M., Brunet, E. (2014). Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. *Molecular Cell*, Vol. 55(6), p. 829-842. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.002>
- Gómez-H, L., Felipe-Medina, N., Sánchez-Martín, M., Davies, O. R., Ramos, I., García-Tuñón, I., de Rooij, D. G., Dereli, I., Tóth, A., Barbero, J. L., Benavente, R., Llano, E., Pendas, A. M. (2016). C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. *Nature Communications*, Vol. 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13298>
- Griswold M. D. (2016). Spermatogenesis: The commitment to meiosis. *Physiological Reviews*, Vol. 96(1), p. 1-17. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015>
- Güney, A. I., Javadova, D., Kırac, D., Ulucan, K., Koc, G., Ergeç, D., Tavukcu, H., Tarcan, T. (2012). Detection of Y chromosome microdeletions and mitochondrial DNA mutations in male infertility patients. *Genetics and Molecular Research: GMR*, Vol. 11(2), p. 1039-1048. <https://doi.org/10.4238/2012>.
- Hai, Y., Hou, J., Liu, Y., Liu, Y., Yang, H., Li, Z., He, Z. (2014). The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial



- stem cells and spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Vol. 29, p. 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.007>
- Halenbeck, R., MacDonald, H., Roulston, A., Chen, T. T., Conroy, L., Williams, L. T. (1998). CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. *Current Biology: CB*, Vol. 8(9), p. 537–540. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)79298-x](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)79298-x)
  - Hamer, G., Gell, K., Kouznetsova, A., Novak, I., Benavente, R., Höög, C. (2006). Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *Journal of Cell Science*, Vol. 119(19), p. 4025-4032. <https://doi.org/10.1242/jcs.03182>
  - Hamer, G., Wang, H., Bolcun-Filas, E., Cooke, H. J., Benavente, R, Höög, C. (2008). Progression of meiotic recombination requires structural maturation of the central element of the synaptonemal complex. *Journal of Cell Science*, Vol. 121(15), 2445–2451. <https://doi.org/10.1242/jcs.033233>
  - Han, F., Jiang, X., Li, Z. M., Zhuang, X., Zhang, X., Ouyang, W. M., Liu, W. B., Mao, C. Y., Chen, Q., Huang, C. S., Gao, F., Cui, Z. H., Ao, L., Li, Y. F., Cao, J., Liu, J. Y. (2020). Epigenetic inactivation of sox30 is associated with male infertility and offers a therapy target for non-obstructive azoospermia. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, Vol. 19, p. 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.10.038>
  - Handel, M. A., Eppig, J. J. (1998). Sexual dimorphism in the regulation of mammalian meiosis. *Current Topics in Developmental Biology*, Vol. 37, p. 333-358. [https://doi.org/10.1016/s0070-2153\(08\)60179-9](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(08)60179-9)
  - Handel, M. A., Schimenti, J. C. (2010). Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nature Reviews. Genetics*, Vol. 11(2), p. 124-136. <https://doi.org/10.1038/nrg2723>
  - Hann, M. C., Lau, P. E., Tempest, H. G. (2011). Meiotic recombination and male infertility: from basic science to clinical reality? *Asian Journal of Andrology*, Vol. 13(2), p. 212-218. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.1>
  - Hernández López, D. (2021). *Etiología y mecanismos de un tipo de infertilidad humana vinculada a una mutación en un gen codificante para un componente del complejo sinaptonémico*. [Tesis de maestría].



Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA.

- Hernández-Hernández, A., Masich, S., Fukuda, T., Kouznetsova, A., Sandin, S., Daneholt, B., Höög, C. (2016). The central element of the synaptonemal complex in mice is organized as a bilayered junction structure. *Journal of Cell Science*, Vol. 129(11), p. 2239-2249. <https://doi.org/10.1242/jcs.182477>
- Hernández-López, D., Geisinger, A., Trovero, M. F., Santiñaque, F. F., Brauer, M., Folle, G. A., Benavente, R., Rodríguez-Casuriaga, R. (2020). Familial primary ovarian insufficiency associated with an SYCE1 point mutation: defective meiosis elucidated in humanized mice. *Molecular Human Reproduction*, Vol. 26(7), p. 485-497. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa032>
- Honigberg, S. M., Purnapatre, K. (2003). Signal pathway integration in the switch from the mitotic cell cycle to meiosis in yeast. *Journal of Cell Science*, Vol. 116(11), p. 2137-2147. <https://doi.org/10.1242/jcs.00460>
- Hou, D., Yao, C., Xu, B., Luo, W., Ke, H., Li, Z., Qin, Y. y Guo, T. (2022). Variations of C14ORF39 and SYCE1 identified in idiopathic premature ovarian insufficiency and nonobstructive azoospermia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 107(3), p. 724-734. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab777>
- Inhorn, M. C., Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*, Vol. 21(4), p. 411-426. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>
- Jamsai, D, O'Bryan, M. K. (2011). Mouse models in male fertility research. *Asian Journal of Andrology*, Vol. 13(1), p. 139-151. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.101>
- Jana, K., Jana, N., De, D. K., Guha, S. K. (2010). Ethanol induces mouse spermatogenic cell apoptosis in vivo through over-expression of Fas/Fas-L, p53, and caspase-3 along with cytochrome c translocation and glutathione depletion. *Molecular Reproduction and Development*, Vol. 77(9), p. 820-833. <https://doi.org/10.1002/mrd.21227>

- Jansen, R., Embden, J. D., Gastra, W., Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, Vol. 43(6), p. 1565-1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, Vol. 337(6096), p. 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jordan, P. W., Karppinen, J. y Handel, M. A. (2012). Polo-like kinase is required for synaptonemal complex disassembly and phosphorylation in mouse spermatocytes. *Journal of Cell Science*, Vol. 125(21), p. 5061-5072. <https://doi.org/10.1242/jcs.105015>
- Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., Krausz, C. (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European Urology*, Vol. 62(2), p. 324-332. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.04.048>
- Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birnbaum, D. P., Gauthier, L. D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N. A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E. M., Seaby, E. G., Kosmicki, J. A., Walters, R. K., MacArthur, D. G. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, Vol. 581, p. 434-443. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>
- Kasak, L., Laan, M. (2021). Monogenic causes of non-obstructive azoospermia: challenges, established knowledge, limitations and perspectives. *Human Genetics*, Vol. 140(1), p. 135-154. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02112-y>
- Kershner, A., Crittenden, S. L., Friend, K., Sorensen, E. B., Porter, D. F., Kimble, J. (2013). GermLine stem cells and their regulation in the nematode *caenorhabditis elegans*. En: Hime, G., Abud, H. (Eds) *Transcriptional and Translational Regulation of Stem Cells*, Vol. 786, p. 29-46. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6621-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6621-1_3)

- Kherraf, Z. E., Cazin, C., Bouker, A., Fourati Ben Mustapha, S., Hennebicq, S., Septier, A., Coutton, C., Raymond, L., Nouchy, M., Thierry-Mieg, N., Zouari, R., Arnoult, C., Ray, P. F. (2022). Whole-exome sequencing improves the diagnosis and care of men with non-obstructive azoospermia. *American Journal of Human Genetics*, Vol. 109(3), p. 508-517. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2022.01.011>
- Kim, J. M., Ghosh, S. R., Weil, A. C., Zirkin, B. R. (2001). Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology*, Vol. 142(9), p. 3809–3816. <https://doi.org/10.1210/endo.142.9.8375>
- Krausz, C., Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature Reviews. Urology*, Vol. 15(6), p. 369-384. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0003-3>
- Kumari, A., Yadav, S., Misro, M., Ahmad, J., Sher, A. (2016). Copy number variation and microdeletions of the Y chromosome linked genes and loci across different categories of Indian infertile males. *Scientific Reports*, Vol. 5. <https://doi.org/10.1038/srep17780>
- Leblond, C., Clermont, Y. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 55(4), p. 548-573. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1952.tb26576.x>
- Liebe, B., Alsheimer, M., Höög, C., Benavente, R., Scherthan, H. (2004). Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 15(2), p. 827-837. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-07-0524>
- Liu, J. G., Yuan, L., Brundell, E., Björkroth, B., Daneholt, B., Höög, C. (1996). Localization of the N-terminus of SCP1 to the central element of the synaptonemal complex and evidence for direct interactions between the N-termini of SCP1 molecules organized head-to-head. *Experimental Cell Research*, Vol. 226(1), p. 11-19. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0197>

- Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W. T., Wang, X. (1998). The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 95(15), p. 8461–8466. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8461>
- Llano, E., Pendás, A. M. (2023). synaptonemal complex in human biology and disease. *Cells*, Vol. 12(13). <https://doi.org/10.3390/cells12131718>
- Lu, J., Gu, Y., Feng, J., Zhou, W., Yang, X., Shen, Y. (2014). Structural insight into the central element assembly of the synaptonemal complex. *Scientific Reports*, Vol. 4. <https://doi.org/10.1038/srep07059>
- Lupas, A. N., Gruber, M. (2005). The structure of alpha-helical coiled coils. *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 70, p. 37–78. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70003-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70003-6)
- Maor-Sagie, E., Cinnamon, Y., Yaacov, B., Shaag, A., Goldsmidt, H., Zenvirt, S., Laufer, N., Richler, C., Frumkin, A. (2015). Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive azoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 32(6), p. 887-891. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0445-y>
- Matzuk, M. M., Lamb, D. J. (2008). The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine*, Vol. 14(11), p. 1197-1213. <https://doi.org/10.1038/nm.f.1895>
- McCarrey J. R. (2013). Toward a more precise and informative nomenclature describing fetal and neonatal male germ cells in rodents. *Biology of Reproduction*, Vol. 89(2), p. 47. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110502>
- McIlwain, D. R., Berger, T., Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Vol. 5(4), a008656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
- McLachlan, R. I. (2013) Approach to the patient with oligozoospermia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol. 98(3), p. 873-880, <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3650>

- McLachlan, R. I., O'Bryan, M. K. (2010). State of the art for genetic testing of infertile men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 95(3), p. 1013-1024. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1925>
- McLaren A. (1998). Gonad development: assembling the mammalian testis. *Current Biology: CB*, Vol. 8(5), p. 175-177. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)70104-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70104-6)
- Menchaca, A., Schlapp, G., Meikle, M., Crispo, M. (2017). Transgenesis and gene edition in mammals. Reference Module in Life Sciences, Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.09222-0>.
- Merritt, C., Seydoux, G. (2010). The Puf RNA-binding proteins FBF-1 and FBF-2 inhibit the expression of synaptonemal complex proteins in germline stem cells. *Development*, Vol. 137(11), p. 1787-1798. <https://doi.org/10.1242/dev.050799>
- Meuwissen, R. L., Offenber, H. H., Dietrich, A. J., Riesewijk, A., van Iersel, M., Heyting, C. (1992). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *The EMBO Journal*, Vol. 11(13), p. 5091-5100. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05616.x>
- Miller, M. P., Amon, A., Ünal, E. (2013). Meiosis I: when chromosomes undergo extreme makeover. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 25(6), p. 687-696. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.07.009>
- Miyamoto, T., Hasuike, S., Yogev, L., Maduro, M. R., Ishikawa, M., Westphal, H., Lamb, D. J. (2003). Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet*, Vol. 362, p. 1714-1719. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14845-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14845-3)
- Moens, P. B., Heyting, C., Dietrich, A. J., van Raamsdonk, W., Chen, Q. (1987). Synaptonemal complex antigen location and conservation. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 105(1), p. 93–103. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.1.93>
- Morelli, M. A. y Cohen, P. E. (2005). Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction*, Vol. 130(6), p. 761-781. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00865>

- Moses, M. J. (1956). Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, Vol. 2(2), p. 215-218. <http://www.jstor.org/stable/1602905>
- Moses, M.J. (1968). Synaptonemal complex. *Annual Review of Genetics*, Vol. 2(1), p. 363-412. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.02.120168.002051>
- Nabi, S., Askari, M., Rezaei-Gazik, M., Salehi, N., Almadani, N., Tahamtani, Y., Totonchi, M. (2022). A rare frameshift mutation in SYCP1 is associated with human male infertility. *Molecular Human Reproduction*, Vol. 28(4). <https://doi.org/10.1093/molehr/gaac009>
- Nishimura, H., L'Hernault, S. W. (2017). Spermatogenesis. *Current Biology: CB*, Vol. 27(18), p. 988-994. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.067>
- Oatley, J. M., Brinster, R. L. (2012). The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiological Reviews*, Vol. 92(2), p. 577-595. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2011>
- Offenberg, H. H., Schalk, J. A., Meuwissen, R. L., van Aalderen, M., Kester, H. A., Dietrich, A. J., Heyting, C. (1998). SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Research*, Vol. 26(11), p. 2572-2579. <https://doi.org/10.1093/nar/26.11.2572>
- O'Flynn O'Brien, K. L., Varghese, A. C., Agarwal, A. (2010). The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertility and Sterility*, Vol. 93(1), p. 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.10.045>
- Ollinger, R., Alsheimer, M., Benavente, R. (2005). Mammalian protein SCP1 forms synaptonemal complex-like structures in the absence of meiotic chromosomes. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 16(1), p. 212-217. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-09-0771>
- Oud, M. S., Ramos, L., O'Bryan, M. K., McLachlan, R. I., Okutman, Ö., Viville, S., de Vries, P. F., Smeets, D. F. C. M., Lugtenberg, D., Hehir-Kwa, J. Y., Gilissen, C., van de Vorst, M., Vissers, L. E. L. M., Hoischen, A., Meijerink, A. M., Fleischer, K., Veltman, J. A., Noordam, M. J. (2017). Validation and application of a novel integrated genetic screening method

- to a cohort of 1,112 men with idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia. *Human Mutation*, Vol. 38(11), p. 1592-1605. <https://doi.org/10.1002/humu.23312>
- Page, S. L., Hawley, R. S. (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, p. 525-558. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.155141>
  - Pashaei, M., Rahimi Bidgoli, M. M., Zare-Abdollahi, D., Najmabadi, H., Haji-Seyed-Javadi, R., Fatehi, F., Alavi, A. (2020). The second mutation of SYCE1 gene associated with autosomal recessive nonobstructive azoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 37(2), p. 451-458. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01660-1>
  - Punab, M., Poolamets, O., Paju, P., Vihljajev, V., Pomm, K., Ladva, R., Korrovits, P., Laan, M. (2017). Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Human Reproduction*, Vol. 32(1), p. 18-31. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew284>
  - Qin, W., Dion, S. L., Kutny, P. M., Zhang, Y., Cheng, A. W., Jillette, N. L., Malhotra, A., Geurts, A. M., Chen, Y. G., Wang, H. (2015). Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing in mice by zygote electroporation of nuclease. *Genetics*, Vol. 200(2), p. 423-430. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176594>
  - Ramesh, M. A., Malik, S. B., Logsdon, J. M., Jr (2005). A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Current Biology: CB*, Vol. 15(2), p. 185-191. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.003>
  - Rao, H. B., Qiao, H., Bhatt, S. K., Bailey, L. R., Tran, H. D., Bourne, S. L., Qiu, W., Deshpande, A., Sharma, A. N., Beebout, C. J., Pezza, R. J., Hunter, N. (2017). A SUMO-ubiquitin relay recruits proteasomes to chromosome axes to regulate meiotic recombination. *Science*, Vol. 355(6323), p. 403-407. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6407>
  - Reijo, R., Lee, T. Y., Salo, P., Alagappan, R., Brown, L. G., Rosenberg, M., Rozen, S., Jaffe, T., Straus, D., Hovatta, O. (1995). Diverse



- spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genetics*, Vol. 10(4), p. 383-393. <https://doi.org/10.1038/ng0895-383>
- Rice, W. R., Chippindale, A. K. (2001). Sexual recombination and the power of natural selection. *Science*, Vol. 294(5542), p. 555-559. <https://doi.org/10.1126/science.1061380>
  - Rodríguez-Casuriaga, R. (2011). Análisis de la espermatogénesis del cobayo mediante citometría de flujo, y desarrollo de un método de purificación de células en profase meiótica temprana. [Tesis de doctorado]. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA.
  - Rodríguez-Casuriaga, R., Folle, G. A., Santiñaque, F., López-Carro, B., Geisinger, A. (2013). Simple and efficient technique for the preparation of testicular cell suspensions. *Journal of Visualized Experiments*, Vol. 78, p. 50102 <https://doi.org/10.3791/50102>
  - Rodríguez-Casuriaga, R., Geisinger, A. (2021). Contributions of flow cytometry to the molecular study of spermatogenesis in mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 22(3), p. 1151. <https://doi.org/10.3390/ijms22031151>
  - Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 146(5), p. 905-916. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.5.905>
  - Russell, L.D., Ettlín, R.A., Hikim, A.P.S., Clegg, E.D. (1993), Histological and histopathological evaluation of the testis. *International Journal of Andrology*, Vol. 16, p. 83-83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1993.tb01156.x>
  - Salcedo, H. (1995). Meiosis. *Revista de la Facultad de Medicina*, Vol. 3(3). Recuperado a partir de <https://www.revistas.unam.mx/index.php/rfm/article/view/74642>
  - Sánchez-Sáez, F., Gómez-H, L., Dunne, O. M., Gallego-Páramo, C., Felipe-Medina, N., Sánchez-Martín, M., Llano, E., Pendas, A. M., Davies, O. R. (2020). Meiotic chromosome synapsis depends on multivalent



- SYCE1-SIX6OS1 interactions that are disrupted in cases of human infertility. *Science Advances*, Vol. 6(36) p. eabb1660  
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abb1660>
- Scherthan H. (2007). Telomere attachment and clustering during meiosis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, Vol. 64(2), p. 117-124.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-006-6463-2>
  - Schilit, S. L. P., Menon, S., Friedrich, C., Kammin, T., Wilch, E., Hanscom, C., Jiang, S., Kliesch, S., Talkowski, M. E., Tüttelmann, F., MacQueen, A. J., Morton, C. C. (2020). SYCP2 Translocation-mediated dysregulation and frameshift variants cause human male infertility. *American Journal of Human Genetics*, Vol. 106(1), p. 41-57.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.11.013>
  - Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, Vol. 9(7), p. 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
  - Schlapp, G., Goyeneche, L., Fernández, G., Menchaca, A., Crispo, M. (2015). Administration of the nonsteroidal anti-inflammatory drug tolfenamic acid at embryo transfer improves maintenance of pregnancy and embryo survival in recipient mice. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 32(2), p. 271–275. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0378-x>
  - Schmekel, K., Meuwissen, R. L., Dietrich, A. J., Vink, A. C., van Marle, J., van Veen, H., Heyting, C. (1996). Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Experimental Cell Research*, Vol. 226(1), p. 20-30. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0198>
  - Schramm, S., Fraune, J., Naumann, R., Hernandez-Hernandez, A., Höög, C., Cooke, H. J., Alsheimer, M., Benavente, R. (2011). A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genetics*, Vol. 7(5).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002088>

- Schücker, K., Holm, T., Franke, C., Sauer, M., Benavente, R. (2015). Elucidation of synaptonemal complex organization by super-resolution imaging with isotropic resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 112(7), p. 2029-2033. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414814112>
- Shao, S., Ren, C., Liu, Z., Bai, Y., Chen, Z., Wei, Z., Wang, X., Zhang, Z., Xu, K. (2017). Enhancing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing *Saccharomyces cerevisiae* Rad52. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 92, p. 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.09.012>
- Sharma, R., Agarwal, A. (2011). Spermatogenesis: an overview. *Springer*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9_2)
- Solari, A. J., Tres, L. L. (1967). The ultrastructure of the human sex vesicle. *Chromosoma*, Vol. 22(1), p. 16–31. <https://doi.org/10.1007/BF00291284>
- Speijer, D., Lukeš, J., Eliáš, M. (2015). Sex is a ubiquitous, ancient, and inherent attribute of eukaryotic life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 112(29), p. 8827-8834. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501725112>
- Spindler, M. C. (2020). *Molecular architecture of meiotic multiprotein complexes* [Tesis de doctorado. Universität Würzburg]. Repositorio de la Universidad de Würzburg. <https://doi.org/10.25972/OPUS-21210>
- Spindler, M. C., Filbeck, S., Stigloher, C., Benavente, R. (2019). Quantitative basis of meiotic chromosome synapsis analyzed by electron tomography. *Scientific Reports*, Vol. 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52455-4>
- Sternberg, S. H., Doudna, J. A. (2015). Expanding the biologist's toolkit with CRISPR-Cas9. *Molecular Cell*, Vol. 58(4), p. 568-574. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.032>
- Stouffs, K., Seneca, S. y Lissens, W. (2014). Genetic causes of male infertility. *Annales d'Endocrinologie*, Vol. 75(2), p. 109-111. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2014.03.004>
- Subramanian, V. V., & Hochwagen, A. (2014). The meiotic checkpoint network: step-by-step through meiotic prophase. *Cold Spring Harbor*

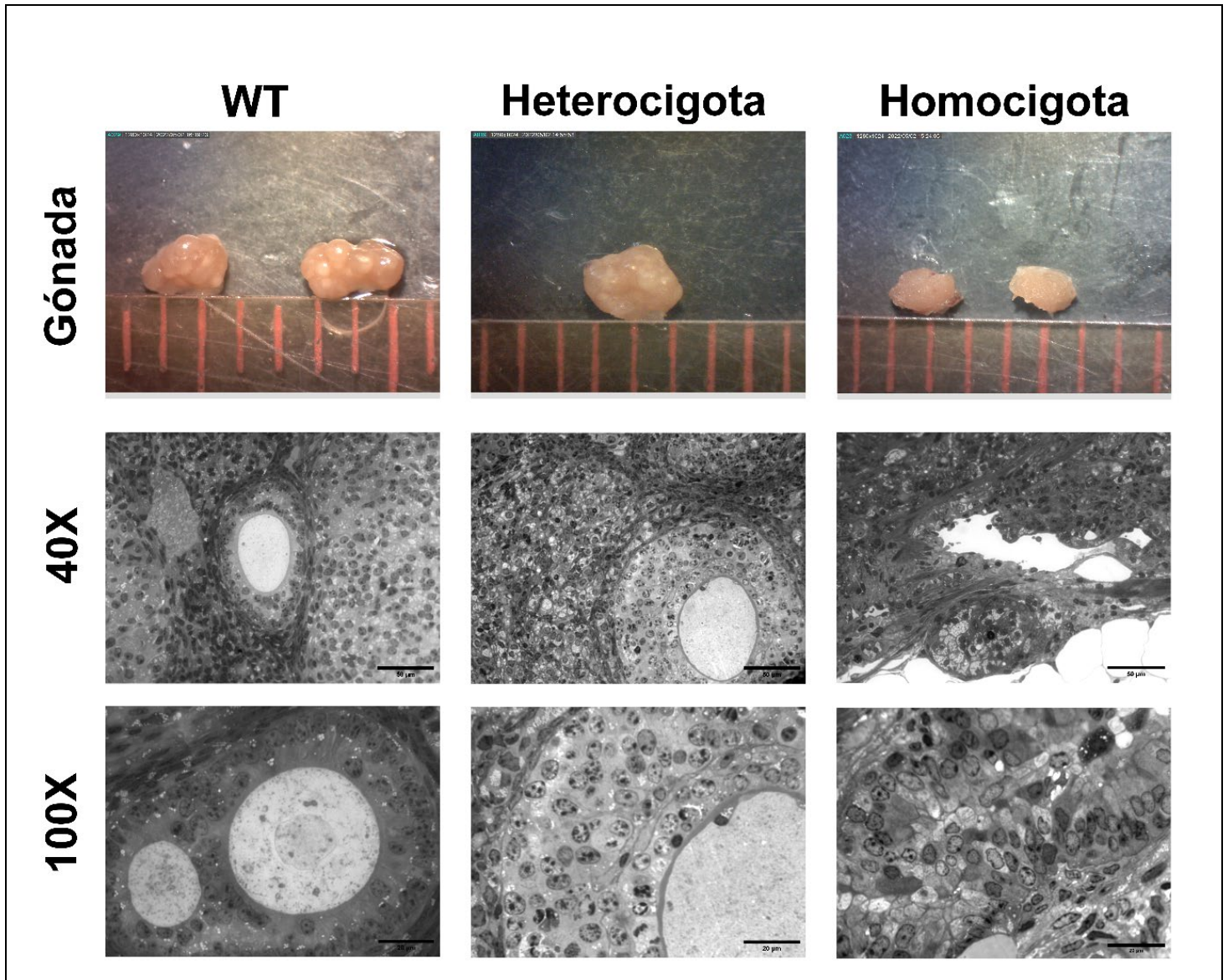
- perspectives in biology*, Vol. 6(10), p. a016675.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016675>
- Syrjänen, J. L., Pellegrini, L., Davies, O. R. (2014). A molecular model for the role of SYCP3 in meiotic chromosome organisation. *eLife*, Vol. 3.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.02963>
  - Takemoto, K., Imai, Y., Saito, K., Kawasaki, T., Carlton, P. M., Ishiguro, K. I., Sakai, N. (2020). Sycp2 is essential for synaptonemal complex assembly, early meiotic recombination and homologous pairing in zebrafish spermatocytes. *PLOS Genetics*, Vol. 16(2).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008640>
  - Tarsounas, M., Pearlman, R. E., Gasser, P. J., Park, M. S., Moens, P. B. (1997). Protein-protein interactions in the synaptonemal complex. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 8(8), p. 1405-1414.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.8.8.1405>
  - Trovero, M. F., Rodríguez-Casuriaga, R., Romeo, C., Santiñaque, F. F., François, M., Folle, G. A., Benavente, R., Sotelo-Silveira, J. R., Geisinger, A. (2020). Revealing stage-specific expression patterns of long noncoding RNAs along mouse spermatogenesis. *RNA Biology*, Vol. 17(3), p. 350-365. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1700332>
  - Vander Borght, M., Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*, Vol. 62, p. 2-10.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>
  - Veitia R. A. (2020). Primary ovarian insufficiency, meiosis and DNA repair. *Biomedical Journal*, Vol. 43(2), p. 115-123.  
<https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.03.005>
  - Vicdan, A., Vicdan, K., Günalp, S., Kence, A., Akarsu, C., Zeki Işık, A., Sözen, E. (2004). Genetic aspects of human male infertility: the frequency of chromosomal abnormalities and y chromosome microdeletions in severe male factor infertility. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, Vol. 117(1), p. 49-54.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2003.07.006>
  - Vidal, F., Templado, C., Navarro, J., Brusadin, S., Marina, S., Egozcue, J. (1982). Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males.

- Human Genetics*, Vol. 60(4), p. 301-304.  
<https://doi.org/10.1007/BF00569207>
- Von Wettstein, D., Rasmussen, S. W., Holm, P. B. (1984). The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annual Review of Genetics*, Vol. 18, p. 331-413.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ge.18.120184.001555>
  - Wettstein, R and Sotelo, JR. (1971). The molecular architecture of synaptonemal complexes. *Advances in Cell and Molecular Biology*, Vol. 1, p. 109-152.
  - Winkel, K., Alsheimer, M., Ollinger, R., Benavente, R. (2009). Protein SYCP2 provides a link between transverse filaments and lateral elements of mammalian synaptonemal complexes. *Chromosoma*, Vol. 118(2), p. 259-267. <https://doi.org/10.1007/s00412-008-0194-0>
  - Winters, B. R., Walsh, T. J. (2014). The epidemiology of male infertility. *The Urologic Clinics of North America*, Vol. 41(1), p. 195-204.  
<https://doi.org/10.1016/j.ucl.2013.08.006>
  - Wu, X., Lin, D., Sun, F., Cheng, C. Y. (2021). Male infertility in humans: an update on non-obstructive azoospermia (NOA) and obstructive azoospermia (OA). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 1288, p. 161-173. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-77779-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-77779-1_8)
  - Yang, F., De La Fuente, R., Leu, N. A., Baumann, C., McLaughlin, K. J., Wang, P. J. (2006). Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 173(4), p. 497-507.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200603063>
  - Yang, F., Silber, S., Leu, N. A., Oates, R. D., Marszalek, J. D., Skaletsky, H., Brown, L. G., Rozen, S., Page, D. C., & Wang, P. J. (2015). TEX11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse. *EMBO molecular medicine*, Vol. 7(9), p. 1198–1210. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404967>
  - Yatsenko, S. A., Rajkovic, A. (2019). Genetics of human female infertility. *Biology of Reproduction*. Vol, 101, p. 549-66.  
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioz084>

- Yuan, L., Liu, J. G., Hoja, M. R., Wilbertz, J., Nordqvist, K., Höög, C. (2002). Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science*, Vol. 296(5570), p. 1115-1118. <https://doi.org/10.1126/science.1070594>
- Yuan, L., Pelttari, J., Brundell, E., Björkroth, B., Zhao, J., Liu, J. G., Brismar, H., Daneholt, B., Höög, C. (1998). The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers in vivo. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 142(2), p. 331-339. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.2.331>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., van der Poel, S. (2017). The international glossary on infertility and fertility care, *Fertility and Sterility*, Vol. 108(3), p. 393-406. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>
- Zickler, D, Kleckner, N. (1998). The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annual Review of Genetics*, Vol. 32, p. 619-697. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.32.1.619>
- Zwettler, F. U., Spindler, M. C., Reinhard, S., Klein, T., Kurz, A., Benavente, R., Sauer, M. (2020). Tracking down the molecular architecture of the synaptonemal complex by expansion microscopy. *Nature Communications*, Vol. 11(1), p. 3222. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17017-7>



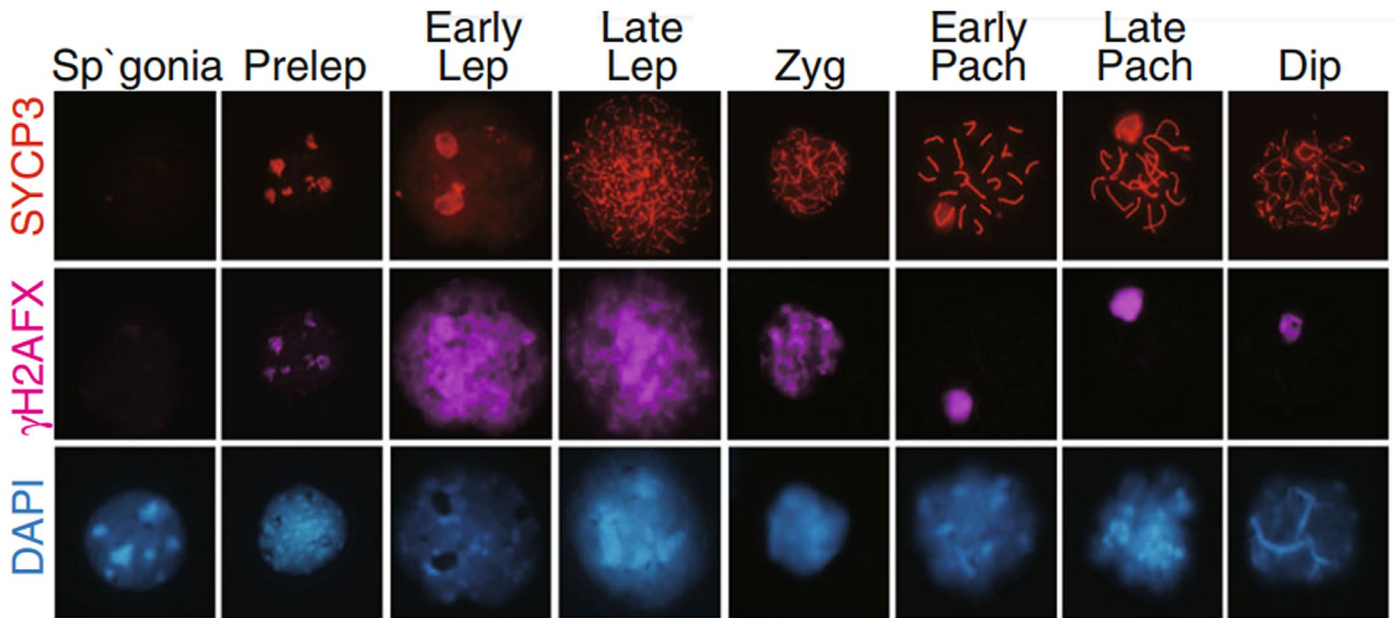
## ANEXOS



### Figura suplementaria 1. Ovarios y su análisis histológico sobre cortes semifinos.

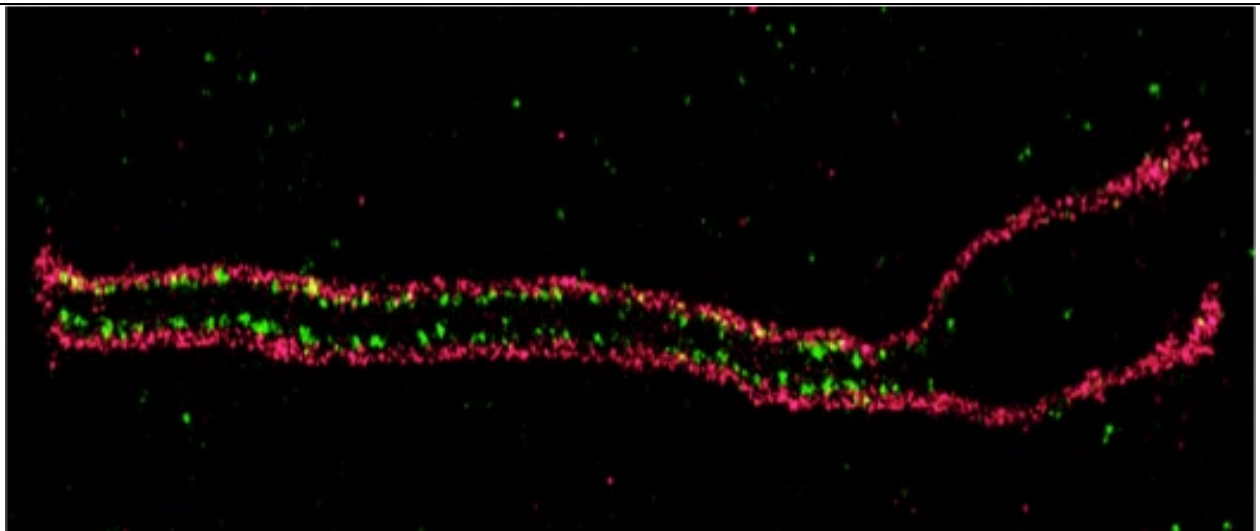
Aspecto de ovarios de ratonas adultas. Mutantes homocigotas mostraron diferencias significativas de tamaño en comparación con sus compañeras de camada WT y heterocigotas. La referencia de tamaño corresponde a una regla dividida en milímetros.

Análisis histológicos sobre cortes semifinos de ovarios de ratonas adultas. Los ovarios de ratonas WT y heterocigotas presentan aspecto y tamaño normales, mientras que el desarrollo gonadal de las homocigotas es deficiente y carente de folículos y ovocitos, indicando insuficiencia ovárica primaria. Para el aumento 40x, las barras corresponden a 50 µm, mientras que para 100X corresponden a 20 µm.



**Figura suplementaria 2.** Patrón de localización de SYCP3 y  $\gamma$ H2AFX en las diferentes subetapas meióticas.

SYCP3 en rojo muestra una marca específica para cada una de las subetapas meióticas; histona H2AFX fosforilada ( $\gamma$ H2AFX) en violeta, marcando roturas de doble cadena dispersas en los núcleos durante los estadios tempranos de la primera profase meiótica, y restringida a los cromosomas XY durante la P y D; los núcleos marcados con DAPI en azul. Sp`gonia: Espermatogonias; Prelep: pre L; Early Lep: L temprano; Late Lep: L tardío; Zyg: Z; Early Pach: P temprano; Late Pach: P tardío; Dip: D. Extraído de Ball et al., 2016.



**Figura suplementaria 3.** CS observado por microscopía de superresolución de dSTORM.

Se observa el CS por medio de dSTORM. Se muestra SYCP3 en magenta y SYCP1 en verde. Se puede apreciar como SYCP1 se ubica únicamente en las regiones sinapsadas del CS. Imagen cedida por el Dr. Ricardo Benavente. Disponible en: <https://www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/en/zeb/team/staff-scientists/ricardo-benavente/>