

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



“Efecto de la hipertermia en modificaciones post-traduccionales de histonas en cromosomas sexuales durante el MSCI”

Sofía Belén Montaner Pérez

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGÍSTER EN GENÉTICA**

Directora de Tesis: Dra. Marcia Manterola
Co-Directora de Tesis: Dra. Katherine Marcelain

2022

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	2
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
Influencia del ambiente y la temperatura en la espermatogénesis.....	10
Consecuencias de la hipertermia en la línea germinal y efectos en la meiosis.	12
Regulación epigenética de la meiosis.....	15
Silenciamiento meiótico de los cromosomas sexuales (MSCI).	16
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
METODOLOGÍA	22
Animales y Diseño Experimental.....	22
Microesparcidos de Túbulos seminíferos.	24
Inmunocitoquímica.	24
Análisis de las imágenes.	25
RESULTADOS	28
I. Evaluación de modificaciones post-traduccionales de histonas mediante inmunofluorescencia.....	28
II. Efecto de la hipertermia en la sinapsis de los cromosomas sexuales.....	59
III. Efectos de la hipertermia en la progresión de la Profase I.....	60
DISCUSIÓN	62
CONCLUSIONES	74
ANEXO 1	77
ANEXO 2	80
REFERENCIAS	96

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema de las etapas de la espermatogénesis en mamíferos, con sus respectivas sub-etapas y componentes celulares.....**11**
- Figura 2:** Principales etapas de la profase meiótica. Esquema de la formación del complejo sinaptonémico en autosomas y cromosomas X e Y, durante las etapas de la profase meiótica, formación del MSC1 y mantención de la condensación de los cromosomas sexuales en espermátidas redondas (PMSC)..... **16**
- Figura 3:** Esquema del mecanismo molecular del MSC1 y modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a su establecimiento y mantención.....**18**
- Figura 4:** Estadio de la Profase I de espermátidas post-hipertermia presentes en cada tiempo de sacrificio.....**23**
- Figura 5:** Ejemplo de medición de intensidad en microfotografía de espermátida con inmunodetección de SYCP3 y γ H2AX mediante el software ImageJ.....**27**
- Figura 6:** La hipertermia no afecta la dinámica temporal y de localización de γ H2AX durante el MSC1.....**32-33**
- Figura 7:** La hipertermia afecta la intensidad de fluorescencia de γ H2AX en los cromosomas sexuales durante el MSC1.....**35**
- Figura 8:** La hipertermia afecta la dinámica temporal de H3K9me3 durante el MSC1.....**30-40**
- Figura 9:** La hipertermia afecta la intensidad de fluorescencia de H3K9me1 durante el MSC1.....**42**
- Figura 10:** La hipertermia afecta la localización de UbiH2A durante el MSC1.....**46-47**

Figura 11: La hipertermia afecta la intensidad de fluorescencia de UbiH2A durante el MSCI.....**49**

Figura 12: La hipertermia afecta la dinámica temporal y de localización de H3K4me1 durante el MSCI.....**53-54**

Figura 13: La hipertermia no afecta la localización de H3K4me1 en PMSC.....**56**

Figura 14: La hipertermia altera la intensidad de fluorescencia de H3K4me1 durante el MSCI.....**58**

Figura 15: Cuantificación de espermatocitos con defectos sinápticos en el PAR de cromosomas sexuales.....**59**

Figura 16: La hipertermia disminuye el número de espermatocitos.....**60**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Dinámica temporal de modificaciones post-traduccionales de histonas y variantes de histonas asociadas a MSCI durante las etapas tardías de la meiosis, segunda división meiótica y espermátidas redondas.....</i>	19
Tabla 2: <i>Anticuerpos Primarios utilizados en el presente estudio.....</i>	24
Tabla 3: <i>Número de espermatoцитos analizados para γH2AX por cada sub-estadio de Paquiteno y Diploteno, y por cada grupo de estudio.....</i>	29
Tabla 4: <i>Número de espermatoцитos analizados para H3K9me3 por cada sub-estadio de Paquiteno y Diploteno, y por cada grupo de estudio.....</i>	36
Tabla 5: <i>Número de espermatoцитos analizados para UbiH2A por cada sub-estadio de Paquiteno y Diploteno, y por grupo de estudio</i>	43
Tabla 6: <i>Número de espermatoцитos analizados para H3K4me1 por cada sub-estadio de Paquiteno y Diploteno, y por cada grupo de estudio.....</i>	50

ABREVIATURAS

cDNA: DNA complementario.

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

HSFs: Factores de Shock Térmico.

HSPs: Proteínas de Shock Térmico.

H-PTM: Modificaciones post-traduccionales de histonas.

H3K4me1: Monometilación de la histona H3 en la lisina 4.

H3K4me2: Dimetilación de la histona H3 en la lisina 4.

H3K4me3: Trimetilación de la histona H3 en la lisina 4.

H3K9ac: Acetilación de la histona H3 en la lisina 9.

H3K9me3: Trimetilación de la histona H3 en la lisina 9.

mRNA: RNA mensajero.

miRNAs: microRNAs.

MSCI: Silenciamiento meiótico de los cromosomas sexuales.

ncRNA: RNA no codificante.

PBS: Buffer fosfato salino.

PBST: Buffer fosfato salino + Tween 20.

PHT: Post-Hipertermia.

T°: Temperatura.

UbiH2A: Ubiquitinación de la histona H2A en la lisina 119.

γ H2AX: Fosforilación de la histona H2AX en serina 139.

RESUMEN

La temperatura es un importante factor ambiental que contribuye al drástico aumento de la infertilidad masculina en el mundo. El aumento de temperatura o hipertermia afecta mecanismos fundamentales que regulan la meiosis, como la sinapsis cromosómica, *crossing overs*, y estabilidad del DNA, desencadenando apoptosis de espermatocitos. En plantas, la hipertermia gatilla mecanismos epigenéticos que median la respuesta meiótica frente al estrés térmico y permiten su adaptabilidad a largo plazo. En ratones, la hipertermia altera el acetiloma de las células germinales y sugiere que el epigenoma podría cambiar frente a este estrés. Sin embargo, aún se desconoce si la alta temperatura induce cambios epigenéticos en las células germinales y si afecta el establecimiento de la memoria epigenética durante la meiosis.

En esta tesis se estudió el efecto de la hipertermia testicular transitoria (42°C durante 15 minutos) sobre las modificaciones epigenéticas que silencian y remodelan la cromatina de los cromosomas sexuales X-Y durante la meiosis masculina en ratón a las 3, 48 y 120 horas post-hipertermia. Las modificaciones post-traduccionales de histonas se evaluaron mediante inmunofluorescencia indirecta. Se encontraron cambios en la temporalidad de H3K9me3 en las etapas de Paquiteno tardío y Diploteno temprano a las 48 y 120 hrs PHT. También se encontraron variaciones en la intensidad de fluorescencia de todos los marcadores analizados: γ H2AX, H3K9me3, H2A K119ub y H3K4me1. Los hallazgos se concentran particularmente a las 48 y 120 horas post-hipertermia. Los resultados obtenidos indican que la hipertermia altera las modificaciones de histonas analizadas. Más investigación es necesaria para identificar el origen de los cambios observados y su implicancia biológica en los procesos de reparación del DNA, silenciamiento transcripcional y sobrevida de espermatocitos.

ABSTRACT

Temperature is an important environmental factor that contributes to the drastic increase of male infertility around the world. High temperature or hyperthermia affects crucial regulatory mechanisms of meiosis, such as chromosomal synapse, crossing overs and DNA stability, leading to apoptosis of spermatocytes. In plants, hyperthermia triggers epigenetics mechanisms that modulate the meiotic response to heat stress, allowing its long-term adaptability. In mice, hyperthermia alters germ cells acetylome, suggesting potential epigenetic changes due to heat stress. Nevertheless, it is still unknown whether high temperature induces epigenetic changes in germ cells, affecting the epigenetic memory during meiosis.

The present research studied the effect of temporary testicular hyperthermia (42°C for 15 minutes) on silencing and chromatin-remodeling epigenetic mechanisms on the X-Y sex chromosomes during mice meiosis at 3, 48 and 120 hours post-hyperthermia. Histone post-translational modifications were assessed by indirect immunofluorescence.

Variation in the timing of H3K9me3 were found in Late pachytene and Early diplotene stages at 48 and 120H PHT. Changes were also found in the fluorescence intensity of all the analyzed markers: (γ H2AX, H3K9me3, H2A K119ub and H3K4me1). These findings are particularly concentrated at 48 and 120H PHT. The results obtained indicate that hyperthermia alters the histone post-translational modifications analyzed. More research is needed to identify the origin of the observed changes and their biological implication in DNA repair, transcriptional silencing and spermatocyte survival.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud define la Infertilidad como la imposibilidad de lograr un embarazo clínico manteniendo regularmente relaciones sexuales sin emplear un método anticonceptivo durante 12 meses o más. La prevalencia actual de infertilidad es de 8-12% (1), afectando a 186 millones de personas a nivel mundial (2). De todos los casos, aproximadamente el 50% son debidos a problemas reproductivos masculinos y alrededor del 7% de los hombres a nivel mundial son infértiles (3).

La infertilidad masculina se manifiesta como una combinación de baja concentración, pobre motilidad y morfología anormal de los espermatozoides. En los últimos 40 años, la infertilidad masculina ha aumentado sostenidamente 1.6% por año, con un incremento global de 59.3% en la población mundial (4-6). Este aumento se manifiesta a través de la presencia de oligospermia (recuento de esperma <15 millones/ml), astenospermia (motilidad total <40%), teratospermia (<4% de espermatozoides con morfología normal), o una combinación de ellas. (1, 7); bajo estos umbrales se reduce considerablemente la probabilidad de concepción (8). Un amplio número de factores, tales como factores genéticos, envejecimiento, enfermedades infecciosas y, por sobre todo factores ambientales, explicarían la drástica disminución del número de espermatozoides y el incremento del riesgo de infertilidad en la población (9, 10). Esto da cuenta de un significativo y progresivo deterioro en la salud reproductiva masculina que requiere con urgencia investigaciones para dilucidar sus causas e implicaciones.

Influencia del ambiente y la temperatura en la espermatogénesis.

La alta temperatura, polución, ejercicio, dieta y estrés son ejemplos de factores ambientales y de estilo de vida que disminuyen el número de espermatozoides (11-14) y alteran la fertilidad masculina, incluso por sobre factores genéticos o infecciosos (10, 15-19).

En el caso de la temperatura, la línea germinal masculina es particularmente sensible a cambios térmicos. En la mayoría de los mamíferos, la función testicular y la correcta progresión de la espermatogénesis es dependiente de la temperatura (20) y por ello, al menos en el hombre y en el ratón, la posición de los testículos en el cuerpo asegura que estén entre 2°C y 8°C por debajo de la temperatura corporal (21). Sin embargo, en situaciones cotidianas como largos períodos de sedentarismo (17, 22, 23), baños calientes y saunas (18, 24), uso de ropa interior ajustada o térmica (25), y el uso de computadores en el regazo (19, 26, 27), incrementan en hasta 3°C la temperatura testicular.

La espermatogénesis es un proceso de tres etapas sucesivas que son interdependientes entre sí: proliferación mitótica de espermatogonias, meiosis de espermatocitos, y espermiogénesis de espermátidas haploides (**Figura 1**). Alteraciones en cada etapa pueden impactar en las etapas sucesivas, especialmente considerando que la meiosis y espermiogénesis son hipersensibles al aumento de la temperatura (28-30). Por el contrario, las espermatogonias son menos susceptibles a la hipertermia y no sufren grandes alteraciones (31).

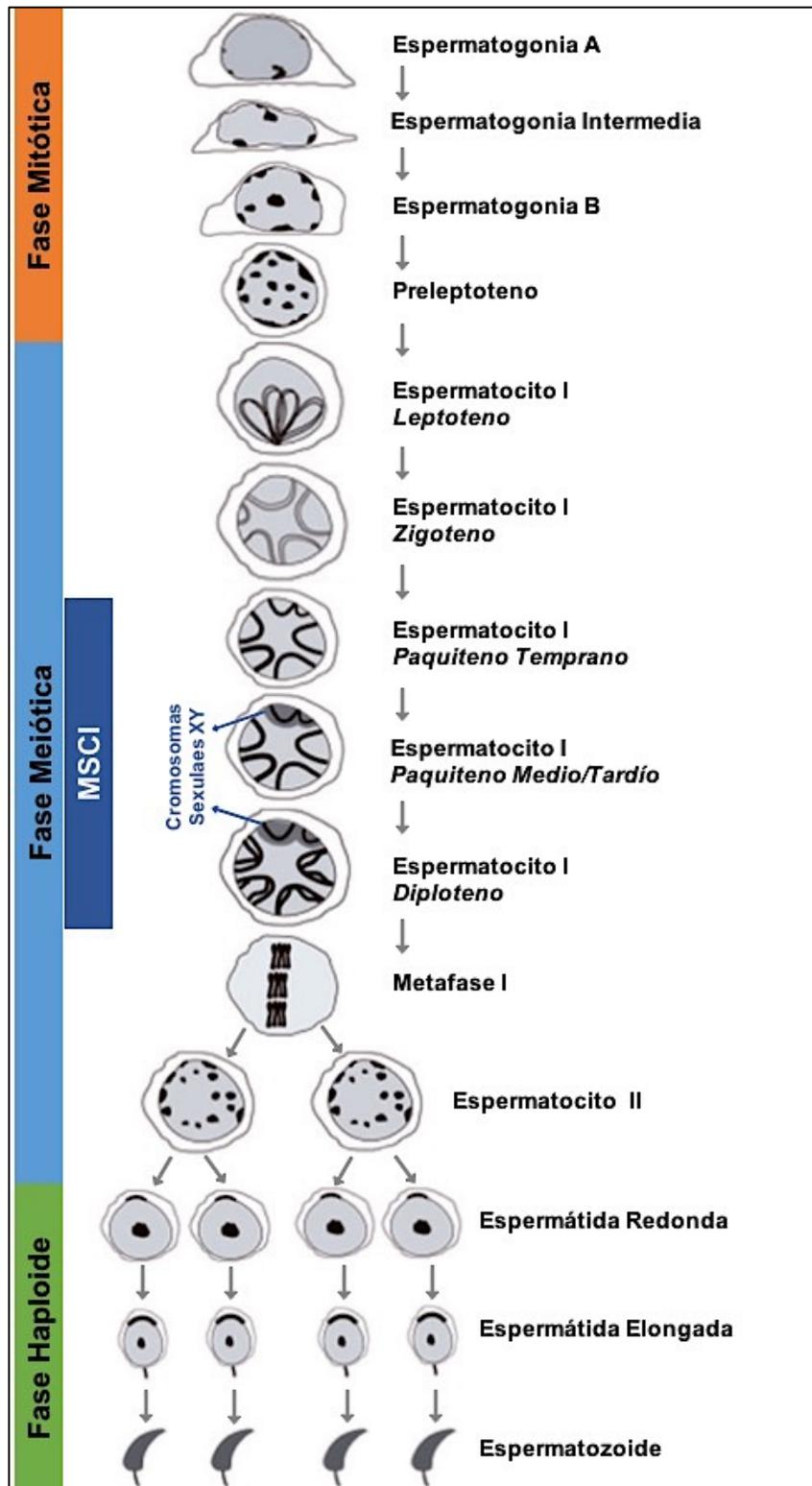


Figura 1. Esquema de las etapas de la espermatogénesis en mamíferos, con sus respectivas sub-etapas y componentes celulares. Adaptado de Wolgemuth DJ et al, 2013 (32).

Consecuencias de la hipertermia en la línea germinal y efectos en la meiosis.

En espermatocitos y espermátidas, la hipertermia produce daño en el DNA (13, 31, 33) y apoptosis a partir de los 39°C (14, 30, 34). Asimismo, en espermatozoides maduros se produce fragmentación del DNA (35) y compactación nuclear incompleta (33). Tras la hipertermia, en las células germinales también se expresan proteínas de shock térmico (o HSP por su sigla en inglés) (36), que previenen el plegamiento incorrecto y la denaturación de proteínas (37). Además, las HSPs gatillan la transcripción de proteínas chaperonas (38) y la represión de genes pro-apoptóticos, permitiendo la supervivencia celular y evitando la destrucción masiva de las células germinales (39).

En la meiosis, la hipertermia afecta eventos centrales de la Profase I, como sinapsis, recombinación y formación de *crossing-over*. En *C. elegans*, *Drosophila* y plantas, la temperatura afecta significativamente la frecuencia y localización de los *crossovers* y, a T° extremas, causa la disrupción del elemento axial del complejo sinaptonémico, lo cual produce fallas en el apareamiento, sinapsis, recombinación y segregación cromosómica (15). En ratón, el aumento de temperatura causa la presencia de cromosomas aquiasmáticos durante Metafase I, sugiriendo que podrían estar ocurriendo perturbaciones durante la formación de *crossing-over* en Paquiteno (40). Asimismo, ocurre una disminución en la transcripción génica, cambios en el splicing e inhibición de la traducción de proteínas en general (29). Esto induce la transcripción de genes de shock térmico por parte de factores de shock térmico (HSFs, *Heat Shock Factors*) y activa proteínas de shock térmico (HSPs, *Heat Shock*

Proteins), iniciando una cascada de eventos que confiere protección celular y permite su adaptabilidad frente al aumento de temperatura (37, 41).

Pese a que la hipertermia causa la apoptosis de espermatocitos debido a alteraciones masivas en el complejo sinaptonémico y daño en el DNA (42), se han encontrado espermátidas y espermatozoides que provienen de espermatocitos sometidos a hipertermia con alteraciones en la integridad y compactación del DNA, de modo que algunos espermatocitos pueden culminar la meiosis y diferenciarse a espermatozoides, pese a haber sufrido alteraciones en el genoma (13, 33). Este fenómeno es ampliamente reconocido en plantas, levaduras y moscas, en donde la flexibilidad y adecuación meiótica frente a cambios de temperatura permite la tolerancia a la hipertermia.

Respuesta Epigenética de las células germinales frente a la Hipertermia.

Se ha demostrado que en las células germinales hay mecanismos epigenéticos involucrados en la respuesta celular frente a la hipertermia (43). Los mecanismos epigenéticos regulan la función de la cromatina mediante modificaciones reversibles como metilaciones en los dinucleótidos CpG en el DNA (44) y modificaciones covalentes en histonas (45), así como también mediante el reposicionamiento de nucleosomas y la expresión de RNAs no codificantes (ncRNAs) (46). Estas modificaciones son también heredables de célula a célula y de un individuo a otro, a través de las células germinales. Varios estudios efectuados en plantas han mostrado que los cambios epigenéticos juegan un rol fundamental en la plasticidad y adaptabilidad de las células meióticas frente a la hipertermia. De hecho, no sólo

regulan la expresión génica en respuesta al aumento de la temperatura, sino que también permiten cambios transcripcionales a largo plazo y proveen “memoria” de eventos de estrés que permiten la reacción diferencial de las células germinales frente a un subsecuente estrés (43). Este fenómeno en plantas, llamado termotolerancia (47), está mediado por una reprogramación epigenética que incluye cambios en el patrón de metilación del DNA, en la expresión de micro RNAs (miRNA) y RNAs no codificantes largos (lncRNAs), y reducción de la dimetilación en la histona H3K9 (H3K9me2) y trimetilación de H3K4 (H3K4me3) (43).

En ratón, análisis proteómicos de testículos de ratones sometidos a hipertermia (43°C) mostraron que el perfil del acetiloma (set completo de proteínas acetiladas en el testículo) cambia significativamente. Es así como proteínas involucradas en la motilidad del espermatozoide, proteínas kinasas y por sobretodo, histonas y variantes de histonas, mostraron variaciones en los sitios de acetilación, además de cambios cuantitativos de acetilaciones en distintos sitios de las proteínas (48). Estos resultados demuestran que en las células germinales de ratón, las modificaciones post-traduccionales en las proteínas cambian significativamente frente a la hipertermia y sugieren que estas variaciones impactarían en la organización epigenómica, especialmente durante procesos claves de la espermatogénesis, altamente sensibles a la temperatura, como son la meiosis y espermiogénesis.

Regulación epigenética de la meiosis.

Durante la espermatogénesis, la proliferación y diferenciación celular están estrictamente regulados por mecanismos epigenéticos que son característicos de las células germinales y que controlan la generación de un espermatozoide genética y epigenéticamente competente (49). Particularmente durante la meiosis, mecanismos epigenéticos modulan el apareamiento, sinapsis, recombinación y actividad transcripcional de los cromosomas, de una manera diferente entre autosomas y cromosomas sexuales X e Y (50). La correcta ocurrencia de estos eventos es fundamental para la función de la meiosis: generar células haploides con nuevas combinaciones genéticas a partir de una célula diploide.

La regulación epigenética de la meiosis comienza desde la primera etapa de la Profase I. En Leptoteno, la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9ac) y la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) en sitios específicos del genoma guían la generación de rupturas de doble hebra en el DNA (DSBs) para permitir el reconocimiento y apareamiento entre los cromosomas homólogos (51). La posterior recombinación del DNA durante las etapas de Zigoteno y principios de Paquiteno, está también guiada por mecanismos epigenéticos como la fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX), evento inmediatamente posterior a la generación DSBs y gatillante de una cascada de eventos que induce la reparación del DNA (52). Las modificaciones epigenéticas, como metilaciones en el DNA, enriquecimiento de H3K4me3 y baja densidad de nucleosomas, son también necesarios para modular la posición y ocurrencia de los *crossing-overs* en el genoma (53, 54).

Silenciamiento meiótico de los cromosomas sexuales (MSCI).

Durante la Profase I ocurre uno de los procesos epigenéticos más importantes, bien caracterizado y distintivo de la meiosis llamado silenciamiento meiótico de los cromosomas sexuales X e Y (*Meiotic Sex Chromosome Inactivation, MSCI*). El MSCI permite la condensación y silenciamiento transcripcional de las regiones no homólogas de los cromosomas sexuales durante las etapas tardías de la Profase I, Paquiteno y Diploteno, lo cual es esencial para la generación de las células germinales y para la fertilidad masculina (55). Además, el MSCI impone una marca epigenética en la cromatina de los cromosomas X e Y, que persiste en las espermatidas (*Post Meiotic Sex Chromatin, PMSC*) (56) (**Figura 2**), y contribuye a la memoria epigenética del espermatozoide al poder ser transmitida en la descendencia del individuo (57).

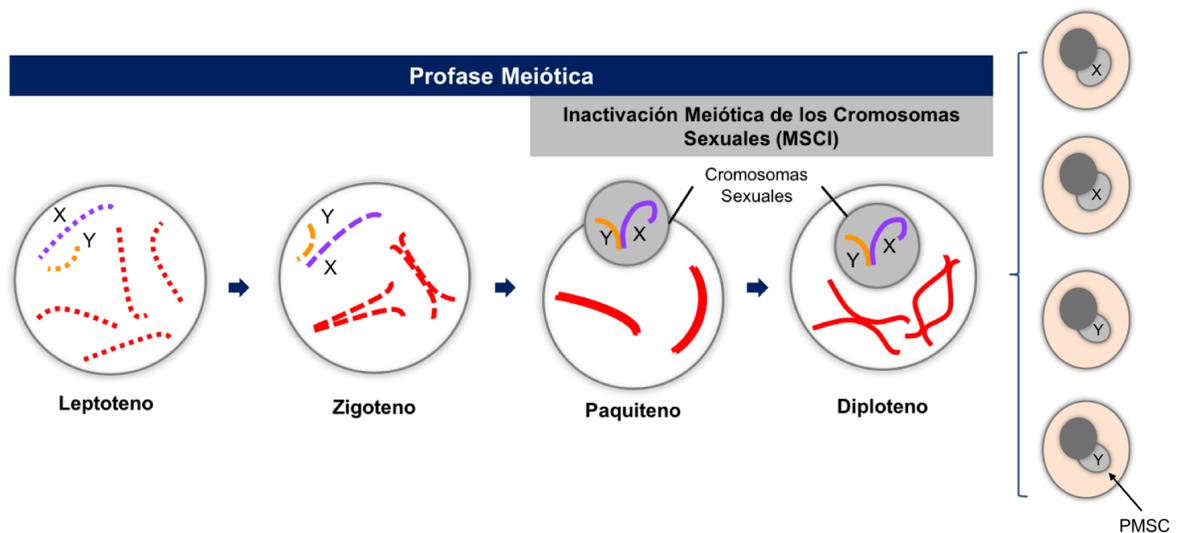


Figura 2: Principales etapas de la profase meiótica. Esquema de la formación del complejo sinaptonémico en autosomas (rojo) y cromosomas X (morado) e Y (naranja), durante las etapas de la profase meiótica, formación del MSCI y mantención de la condensación de los cromosomas sexuales en espermatidas redondas (PMSC) (adaptado de Kato 2015 (58)).

La formación del MSCI comienza en la etapa de Paquiteno temprano, en respuesta a la presencia de DSBs que aún no han sido reparados por la vía de reparación homóloga del DNA, de modo que son reclutadas otras proteínas de reparación, como ATR, proteína kinasa que fosforila a H2AX en sitios donde los ejes se encuentran en asinápsis, permitiendo la expansión de la señal de su forma fosforilada, γ H2AX, a través de los ejes cromosómicos X-Y (**Figura 3.1**) (58, 59). A continuación, MDC1 amplifica señal de γ H2AX hacia los *loops* de cromatina en ambos cromosomas sexuales a través del reclutamiento de nuevas kinasas ATR (**Figura 3.2**) (60, 61). Con la consecuente persistencia de γ H2AX, tanto en ejes como en la cromatina de X-Y, se desencadenan reclutamientos de otras proteínas de reparación y modificadoras de histonas, produciendo un remodelamiento de la cromatina de los cromosomas sexuales. Así, en Paquiteno Medio ocurre el establecimiento del MSCI con el consecuente silenciamiento de genes presentes en los cromosomas X-Y (55), y la mantención de la sinapsis de los cromosomas sexuales (62). De este modo, el MSCI se caracteriza por la presencia de proteínas ligadas a reparación de DSBs tales como γ H2AX, H2A K119ub, BRCA1 y ATR (63, 64); modificaciones post-traduccionales de histonas ligadas a condensación y silenciamiento génico como H3K9me3, H3K4me1, H3K4me2, H3K27me3 y H3.3 (53, 65, 66) y ausencia de marcadores transcripcionales como H3K9ac y RNAPol II, algunas de ellas ilustradas en la **Figura 3.3** (53, 65).

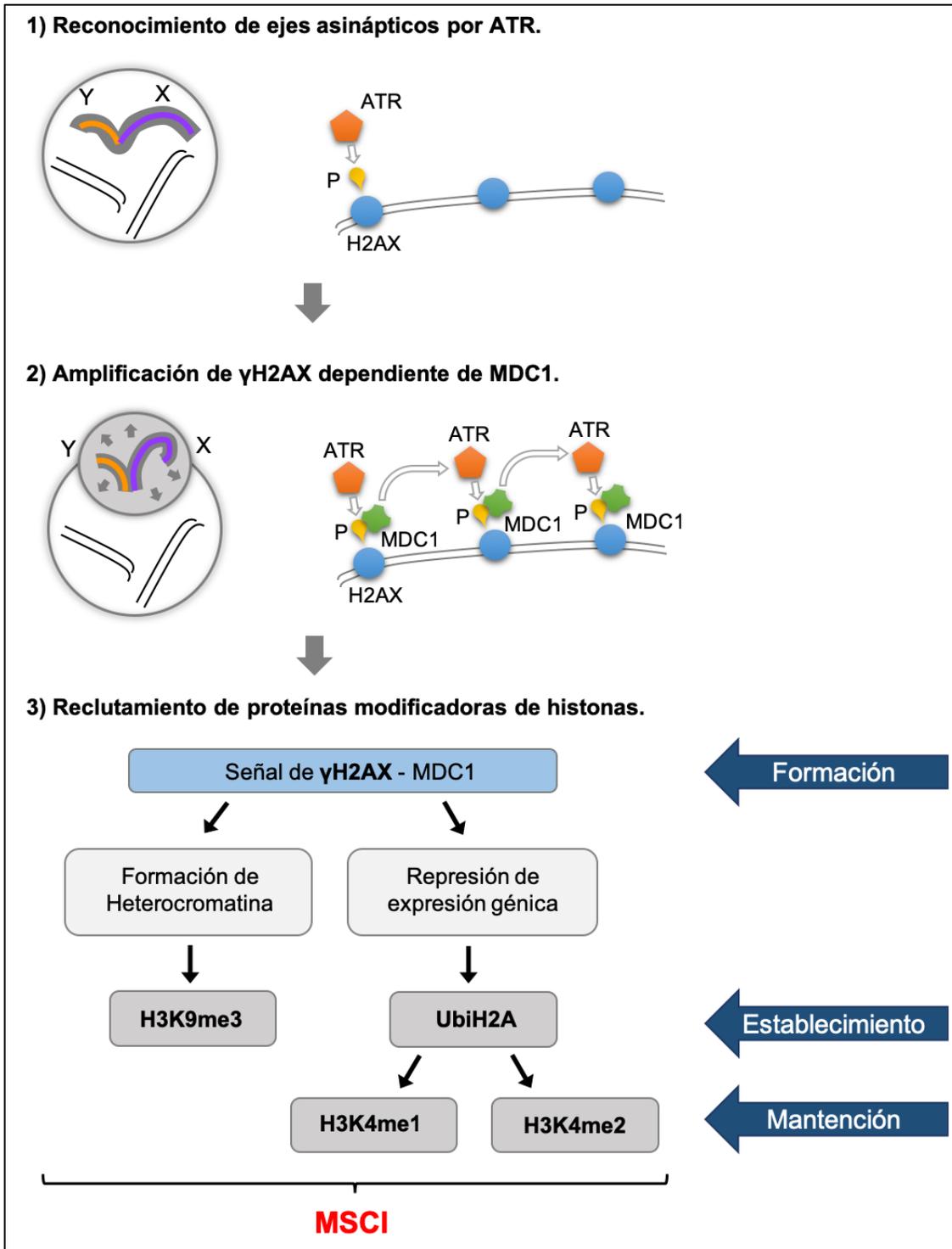


Figura 3: Esquema del mecanismo molecular del MSCI y modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a su establecimiento y mantención. Adaptado de Ichijima 2012 (60), Hasegawa 2015 (59) y Kato 2015 (58).

La persistencia de proteínas de reparación y la presencia de modificaciones post-traduccionales de histonas (H-PTM, *Histone Post Translational Modifications*) asociadas a condensación de la cromatina y silenciamiento génico en los cromosomas X e Y, permiten la formación de una estructura característica de los núcleos de espermatocitos, llamada cuerpo sexual.

Cada uno de los marcadores del MSCI seleccionados en este estudio exhibe una dinámica temporal y de localización en los cromosomas sexuales que es característica durante las etapas de Paquiteno y Diploteno, y además, algunas de ellas pueden ser heredadas a las espermátidas (**Tabla 1**). Esto favorece el estudio del MSCI, al permitir definir y disectar el rol de las modificaciones epigenéticas particulares de cada etapa, que conducen a la reprogramación epigenética de los cromosomas sexuales en la meiosis.

Tabla 1: *Dinámica temporal de modificaciones post-traduccionales de histonas y variantes de histonas asociadas a MSCI durante las etapas tardías de la meiosis, segunda división meiótica y espermátidas redondas.*

Marcador	Paquiteno Temprano	Paquiteno Medio	Paquiteno Tardío	Diploteno	Metafases	Espermátida Redonda
γ H2AX	✓	✓	✓	✓	X	X
H3K4me1	✓/X	X	✓	✓	✓	✓/X
H3K9me3	✓	✓/X	✓/X	✓	X	X
UbiH2A	✓	✓/X	✓/X	X	¿?	¿?

✓: Presencia; X: Ausencia; ✓/X: Presencia parcial en el cuerpo sexual. ¿?: No descrita en la literatura. (53, 56, 65, 67)

En mamíferos, aún se desconoce si la hipertermia induce cambios epigenéticos en las células meióticas y si afecta el establecimiento de la memoria epigenética durante la meiosis. En este contexto, surge la interrogante si el aumento de temperatura testicular causa modificaciones en la reprogramación epigenética de los cromosomas sexuales que sucede en la meiosis, particularmente a nivel de modificaciones post-traduccionales de histonas (H-PTM) en espermatocitos.

En esta investigación se estudió el efecto de la hipertermia en modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a la formación, establecimiento y mantención del MSCI en espermatocitos de ratones adultos, y si la hipertermia afecta algunas de estas marcas epigenéticas que permanecen en etapas post-meióticas.

HIPÓTESIS

La hipertermia causa alteraciones en modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas al silenciamiento meiótico de los cromosomas sexuales (MSCI) en espermatoцитos de ratón adulto (C57BL/6).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar cambios en modificaciones post-traduccionales de histonas que contribuyen a la formación, establecimiento y mantención del MSCI en espermatoцитos de ratones adultos sometidos a hipertermia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar cambios en la localización sub-celular de las modificaciones post-traduccionales de histonas ligadas al silenciamiento meiótico de los cromosomas sexuales (MSCI) en espermatoцитos de ratón.
- 2) Identificar variaciones en la dinámica temporal de las modificaciones de histonas asociadas al silenciamiento meiótico de los cromosomas sexuales (MSCI) en espermatoцитos de ratón.
- 3) Estimar semi-cuantitativamente el efecto de la hipertermia sobre la presencia de las modificaciones de histonas asociadas al silenciamiento meiótico de los cromosomas sexuales (MSCI) en espermatoцитos de ratón.

METODOLOGÍA

Animales y Diseño Experimental.

El trabajo con animales fue realizado en trabajo colaborativo con Columbia University, bajo el protocolo de animales RASCAL número AC-AAAS0560 (Y1 M00). Ratonos C57BL/6 de 3 meses de edad fueron sometidos a hipertermia al sumergirlos parcialmente en un baño termorregulado a 42°C durante 15 minutos. Tres ratones fueron eutanizados por cada grupo de estudio: Controles, 3 horas, 48 horas y 120 horas post-hipertermia. Se evaluó a las 3 horas post-hipertermia los cambios epigenéticos inmediatos al estrés térmico. A las 48 horas post-hipertermia se evaluó los cambios epigenéticos de los espermatoцитos que progresaron durante la Profase I (no afectados por el *peak* apoptótico que ocurre a las 24 horas post-hipertermia (35)); mientras que a las 120 horas post-hipertermia se evaluó aquellas células que estando a inicios de la Profase I avanzaron hasta finales de esta etapa, y a aquellos espermatoцитos que progresaron hasta etapas post-meióticas (**Figura 4**). De este modo, espermatoцитos en Paquiteno (temprano, medio y tardío) y Diploteno (temprano y medio/tardío), se evaluaron en los distintos tiempos para determinar el impacto del estrés térmico en la reprogramación epigenética del MSCI en la meiosis.

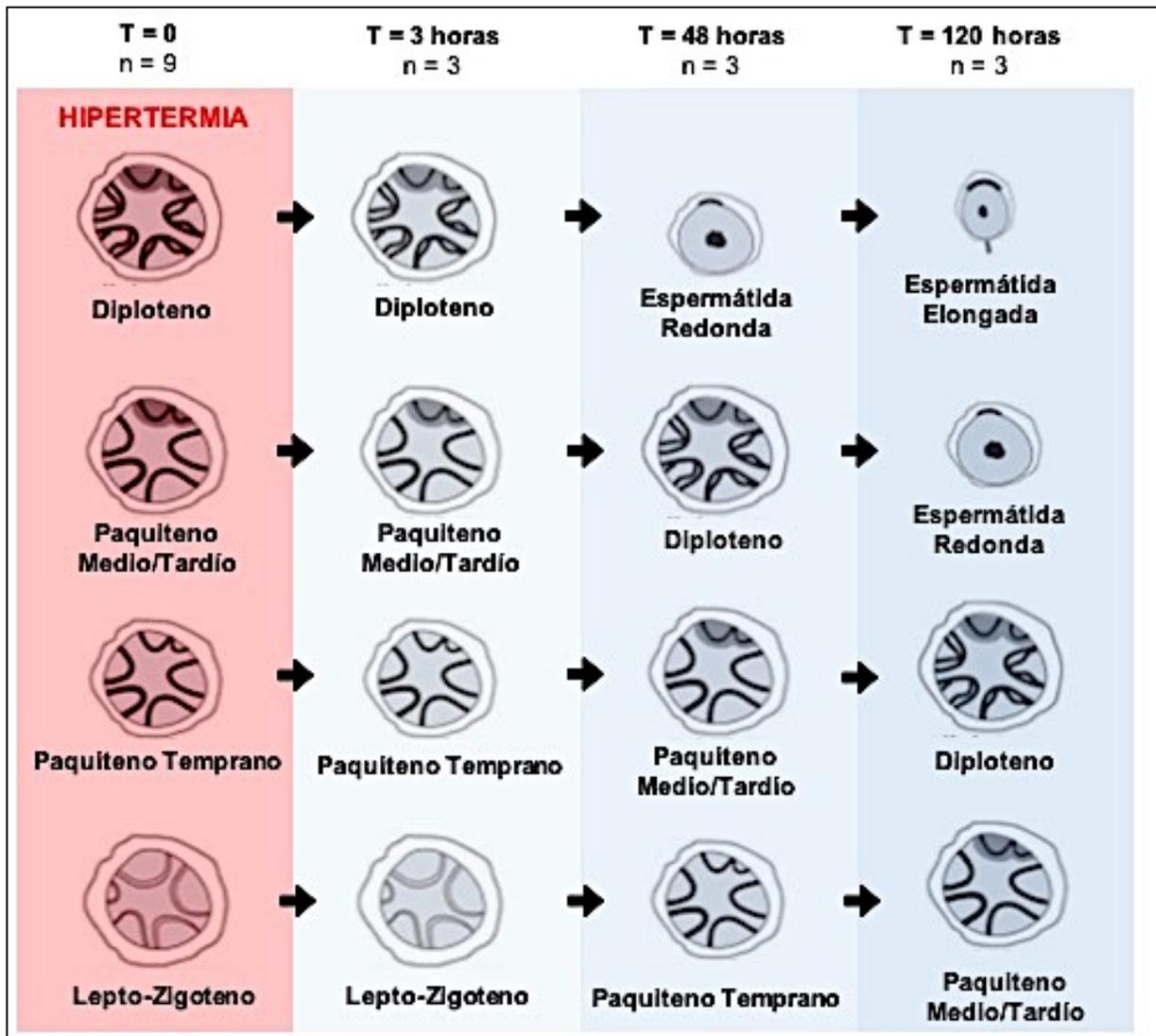


Figura 4: Estadio de la Profase I de espermatocitos y espermátidas post-hipertermia presentes en cada tiempo de sacrificio, calculado de acuerdo a la temporalidad de la espermatogénesis establecida por Bellve 1977 (68), Clermont 1969 (69), y Oakberg 1956 (70).

Microesparcidos de Túbulos seminíferos.

A partir de los testículos de cada ratón se realizaron microesparcidos, de acuerdo a Manterola et al. 2009 (71), permitiendo obtener y analizar en una misma lámina todos los tipos celulares presentes en los túbulos seminíferos. Brevemente, los túbulos seminíferos se disgregaron mecánicamente y se agregaron 200ul de solución de Sacarosa 100mM. A continuación, se esparcieron 14ul de esta dilución en la superficie de un portaobjetos previamente sumergido en Formaldehído 2%. Los microesparcidos fueron depositados en una cámara húmeda durante 2.5 horas y posteriormente secados al aire durante 1 hora. Finalmente, las láminas fueron lavadas 3 veces por arrastre con solución de Photoflo 0.08% y luego se almacenaron a -80°C hasta su uso para Inmunocitoquímica.

Inmunocitoquímica.

Las muestras fueron incubadas con los siguientes anticuerpos anti-modificaciones post-traduccionales de histonas, en conjunto con el marcador SYCP3 (elemento axial del complejo sinaptonémico) para determinar el estadio de la profase I (Paquiteno y Diploteno) y la morfología de cada cromosoma (**Tabla 2**).

Tabla 2: Anticuerpos Primarios utilizados en el presente estudio.

Anticuerpo Primario	Especie	Fabricante	Dilución	Tiempo de Incubación
SYCP3	Rabbit	Abcam (Ab15093)	1:200	12 horas a 4°C
SYCP3	Mouse	Abcam (Ab97672)	1:200	12 horas a 4°C
γ H2AX	Mouse	Upstate	1:1000	12 horas a 4°C
H3K4me1	Rabbit	Millipore	1:100	12 horas a 4°C
H3K9me3	Rabbit	Upstate	1:800	12 horas a 4°C
UbiH2A	Rabbit	Upstate	1:1500	12 horas a 4°C

Luego de 3 lavados con PBST 0.1% (PBS 1X + Tween 20), las preparaciones se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos Alexa Fluor 594 y Alexa Fluor 488, según corresponda a las especies de los anticuerpos primarios. Las placas posteriormente se contrastaron con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (0.1mg/ml) y fueron montadas con ProLong *antifade reagent* (Invitrogen) para su observación al microscopio de fluorescencia.

Análisis de las imágenes.

Las muestras se analizaron con un Microscopio de Epifluorescencia Nikon BX61, mediante el lente objetivo Nikon PL APO 100X, 1.30 NA. Sólo espermatoцитos con morfología normal y no apoptótica (según morfología descrita por Ayarza et al. 2016; **Anexo 1**) fueron seleccionados y evaluados (42). Al menos 400 espermatoцитos fueron fotografiados mediante la cámara DS-L1 Nikon. Por cada espermatoцитo, se determinó el estadio y sub-estadio de la Profase I (Leptoteno, Zigoteno, Paquiteno Temprano, Paquiteno Medio, Paquiteno Tardío, Diploteno Temprano, Diploteno Medio/Tardío) y a continuación, se evaluó el patrón de inmunomarcación de modificaciones de histonas presentes en los cromosomas sexuales a través de las etapas en que transcurre el MSCI. Se determinó la presencia/ausencia de marca fluorescente en las distintas sub-regiones de los cromosomas X-Y (**Anexo 1**). Para γ H2AX, H2A K119ub y H3K4me1, cuya presencia en los cromosomas sexuales es homogénea en toda la cromatina, ambos cromosomas sexuales fueron considerados como una unidad; pero para H3K9me3, que exhibe un patrón diferencial entre X e Y, se consideraron como independientes, pudiendo darse tres casos: 1) encontrarse en

la cromatina de ambos cromosomas, 2) en la heterocromatina pericentromérica de X junto a la totalidad de marca en Y, o bien, 3) sólo en la HPC del cromosoma X (**Figura 7**).

Para la confección de los paneles presentados en la sección “Resultados”, las imágenes fueron procesadas con el software Adobe Photoshop (**Figuras 6A, 8A, 10A, 12A, 13A y 15F**). Fotografías originales pueden ser consultadas en **Anexo 2**.

Para medir la intensidad de fluorescencia de la inmunmarcación, se seleccionaron los núcleos de espermatozoides cuyo X-Y se encontraba aislado y sin autosomas entrecruzados, para evitar la interferencia de señal. Con esta consideración, el número muestral de las subetapas Paquiteno temprano y Diploteno temprano fue de n=15, mientras que para Paquiteno medio, Paquiteno tardío y Diploteno medio/tardío el número muestral analizado fue de n=20. Utilizando el software ImageJ (National Institute of Health, USA; <https://imagej.nih.gov>), se realizaron 5 mediciones dentro de la cromatina de los cromosomas sexuales, junto con 5 mediciones de la marcación de fondo, todas con la misma área, para cada núcleo fotografiado (**Figura 5**). Estas mediciones de fondo fueron promediadas y dicho promedio fue sustraído a cada medición de intensidad de señal en los cromosomas X-Y, normalizando la intensidad de fluorescencia.

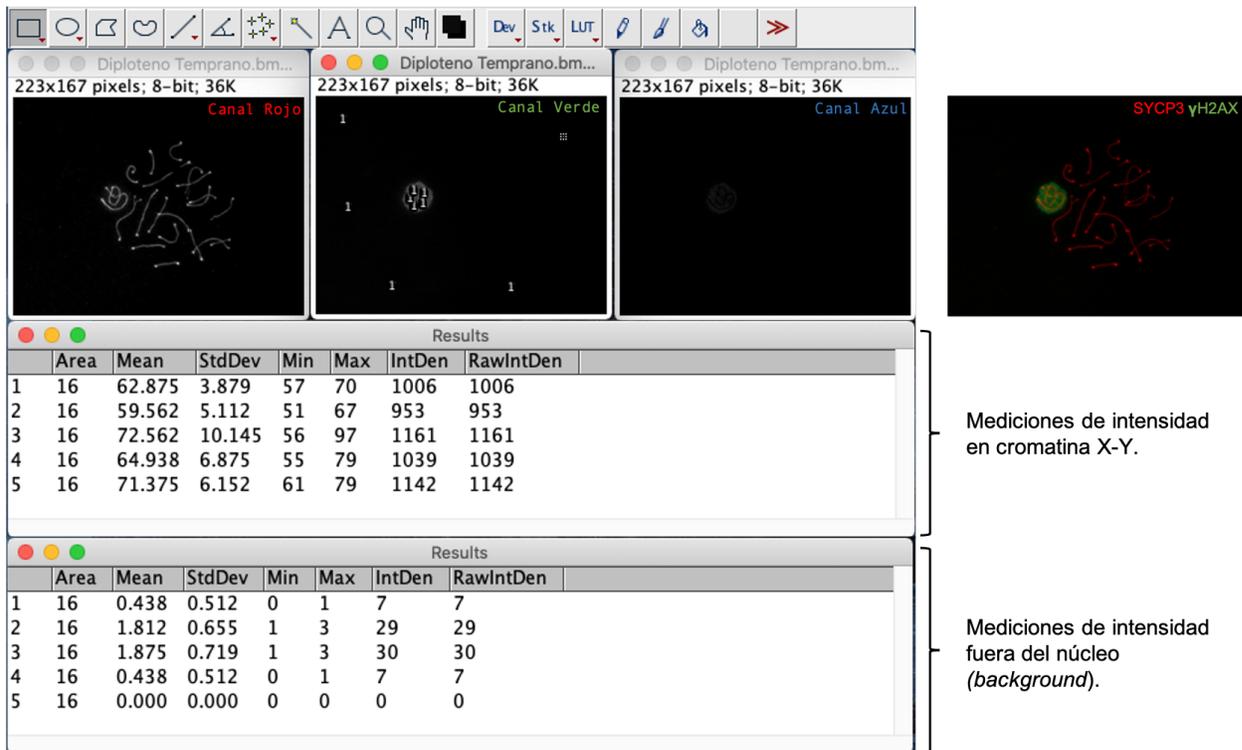


Figura 5: Ejemplo de medición de intensidad en microfotografía de espermatocito con inmunodetección de SYCP3 y γ H2AX utilizando el software ImageJ.

Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza de una vía (*one-way-ANOVA*) con un post-test de Tukey entre los resultados de cada animal de un mismo grupo de estudio y no se encontraron diferencias significativas.

Luego, para determinar las diferencias entre los grupos de estudio, se efectuó un análisis de varianza de una vía (*one-way-ANOVA*) con un post-test de Dunnett.

RESULTADOS

I. Evaluación de modificaciones post-traduccionales de histonas mediante inmunofluorescencia.

En esta tesis se analizaron las etapas de Paquiteno y Diploteno debido a que es en estos estadios donde se forma y establece el silenciamiento meiótico de los cromosomas sexuales. Asimismo, es importante destacar que diferentes eventos moleculares distinguibles ocurren dentro de Paquiteno y de Diploteno, característicos de cada sub-etapa. Por esta razón y para caracterizar en profundidad los cambios epigenéticos que ocurren dentro de Paquiteno y Diploteno, en este trabajo se subdividió estas etapas en Paquiteno temprano, medio y tardío, y Diploteno temprano y medio/tardío de acuerdo a lo descrito en la literatura (53, 65, 71). Asimismo, cada modificación de histona a estudiar en esta tesis fue seleccionada en base a su función en los eventos que forman y establecen el MSC1 y a que su patrón temporal durante la profase I en la cromatina de los cromosomas XY ha sido ya caracterizado (**Tabla 1**). En este sentido, se seleccionaron modificaciones post-traduccionales de histonas ligadas a reparación del DNA (γ H2AX, H2A K119ub), silenciamiento génico (H3K4me1) y condensación de la cromatina (H3K9me3). Esto posibilita la disección de cada etapa de la reprogramación epigenética de los cromosomas sexuales y el análisis de las eventuales alteraciones causadas tanto en su localización, en la temporalidad o en intensidad de fluorescencia, en ratones adultos sometidos a estrés térmico. El presente análisis también se enfocará en metafases y espermátidas redondas, específicamente para analizar aquellas

modificaciones de histonas, como H3K4me1, que persisten en el X-Y, y que se propagan a las células post-meióticas.

a) Efecto de la hipertermia en γ H2AX durante MSCI.

γ H2AX es una variante de la histona H2A, implicada en reparación del DNA que es fosforilada en serina 139 en presencia de DSBs en el DNA. Durante la Profase I, existen tres ondas de fosforilación de γ H2A: la primera es dependiente de la kinasa ATM y ocurre en Leptoteno, la segunda y tercera son dependientes de la kinasa ATR y ocurren en Zigoteno y Paquiteno, respectivamente. La tercera onda de fosforilación ocurre en los cromosomas XY en respuesta a la persistencia de DSBs que no han sido reparados por la vía de reparación homóloga del DNA y está involucrada directamente en la formación del MSCI (72). Por ello, en este trabajo, se evaluó si la hipertermia afecta esta onda de fosforilación de γ H2AX, particularmente su dinámica temporal y de localización en los cromosomas X e Y a las 3, 48 y 120 horas post-hipertermia (PHT). El número de espermatoцитos evaluados por grupo de estudio se indica en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Número de espermatoцитos analizados para γ H2AX por cada sub-estadio de Paquiteno y Diploteno, y por cada grupo de estudio.

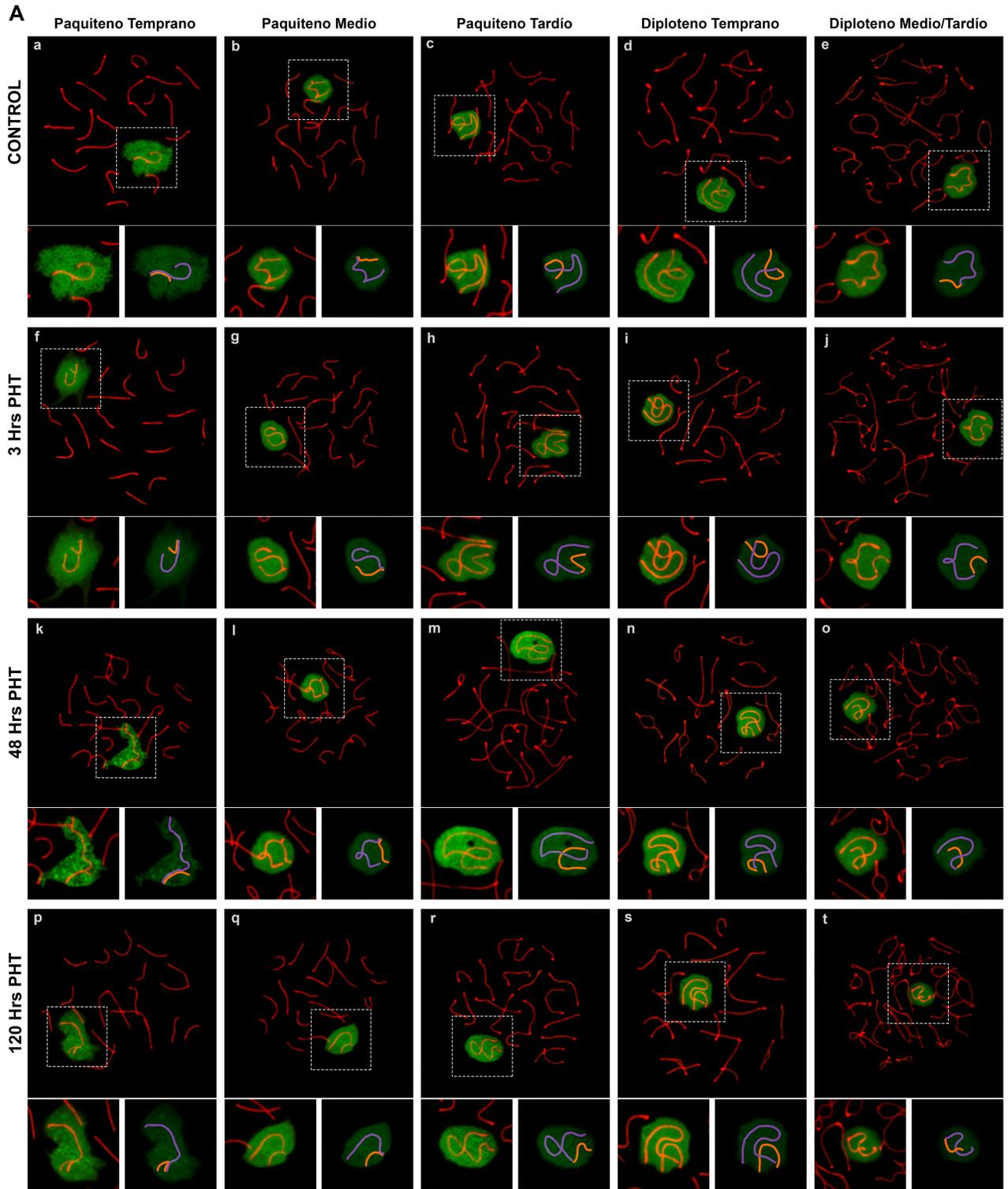
	Paquiteno temprano	Paquiteno medio	Paquiteno tardío	Diploteno temprano	Diploteno medio/tardío	TOTAL
Control	n=90	n=281	n=377	n=188	n=461	n=1307
3Hrs PHT	n=142	n=251	n=302	n=230	n=517	n=1442
48Hrs PHT	n=89	n=201	n=221	n=106	n=204	n=821
120Hrs PHT	n=73	n=229	n=158	n=138	n=231	n=829

*PHT: Post-Hipertermia

Durante Paquiteno temprano (**Figura 6Aa y 6Bb**), etapa donde todos los autosomas se encuentran sinaptados y los cromosomas X e Y presentan una gran extensión de la sinapsis de la región pseudoautosómica (PAR), se observó que el 92.6% (n=90) de los espermatoцитos controles presentaban una señal de γ H2AX en toda la cromatina de los cromosomas sexuales. Esto es coherente con la formación del MSCI en esta etapa. Luego, en Paquiteno medio (**Figura 6Ab y 6Bb**), donde la sinapsis X e Y se ha reducido y comienza el establecimiento del MSCI, se observó que en el 91.68% (n=281) de los espermatoцитos controles γ H2AX persiste en la cromatina de los cromosomas X e Y, en coherencia con el establecimiento del MSCI que ocurre en esta etapa (72). Durante Paquiteno tardío (**Figura 6Ac y 6Bc**), los cromosomas sexuales exhiben un patrón morfológico específico caracterizado por una sinapsis distal en el PAR y por modificaciones estructurales de los elementos axiales de los cromosomas X e Y, tales como engrosamientos, elongaciones y excrecencias (65). En este estadio, se observó que γ H2AX persiste intensamente en la cromatina de los cromosomas sexuales en el 88.21% (n=377) de los espermatoцитos control. Este patrón de γ H2AX persiste hasta Diploteno, etapa donde comienza (Diploteno temprano, **Figura 6Ad y 6Bd**) y termina (Diploteno medio/tardío, **Figura 6Ae y 6Be**) la desinapsis cromosómica y los cromosomas permanecen unidos sólo por los quiasmas (regiones puntuales donde ocurrió *crossing-over*). El patrón temporal y de localización de γ H2AX observado en los espermatoцитos controles está en concordancia con lo descrito en la literatura respecto a esta modificación post-traducciona l de histona (52).

Frente a la hipertermia, la dinámica temporal y de localización de γ H2AX durante las sub-etapas de Paquiteno y Diploteno en los cromosomas X e Y a las 3 horas (**Figura 6A, f-j y 6B**), 48 horas (**Figura 6A, k-o y 6B**) y 120 horas (**Figura 6A, p-t y 6B**) post-hipertermia no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a lo observado en los espermatocitos controles. Un porcentaje menor de espermatocitos (entre el 0.3 y el 14.3%) presentó patrones de localización de γ H2AX distintos a la mayoría de las células, tales como señal de γ H2AX débil en la cromatina del XY y señal de γ H2AX ausente durante el MSC1. Sin embargo, ninguno de estos patrones fue significativo respecto de los espermatocitos controles al ser analizados mediante análisis de varianza de una vía con un post-test de Dunnett.

Estos resultados sugieren que la hipertermia no tiene consecuencias en la dinámica temporal y ni en la ubicación subcelular de γ H2AX durante la formación del MSC1.



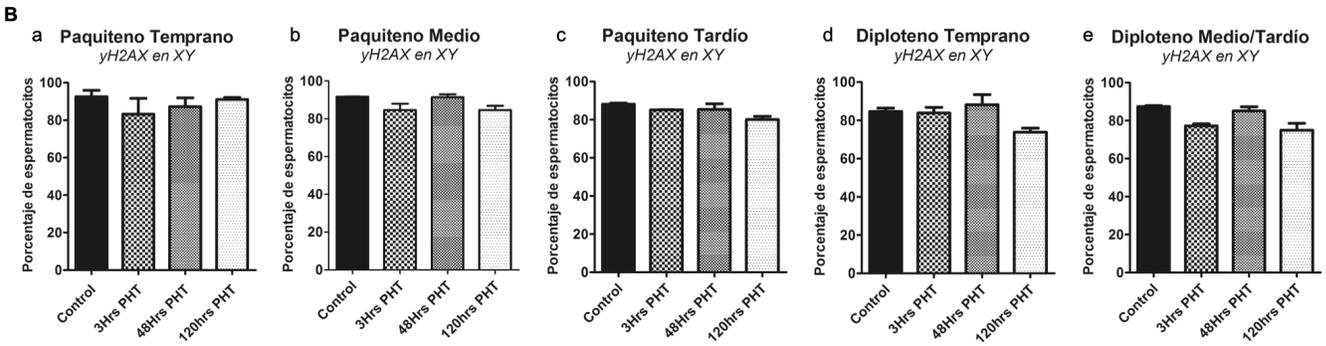


Figura 6: La hipertermia no afecta la dinámica temporal y de localización de γ H2AX durante el MSCI. (A) *Immunodetección de γ H2AX (verde) y SYCP3 (rojo) en los cromosomas sexuales X-Y (recuadro blanco) durante Paquiteno y Diploteno en controles (a-e), 3 horas PHT (f-j), 48 horas PHT (k-o) y 120 horas PHT (p-t). Paneles inferiores muestran una magnificación de los cromosomas sexuales y su correspondiente representación gráfica de cromosomas X (morado) e Y (naranja), en las que se disminuyó intencionalmente la intensidad de señal con fines didácticos. (B)* *Cuantificación de espermatocitos con presencia de γ H2AX en la cromatina de los cromosomas X-Y en Paquiteno y Diploteno. Análisis de varianza de una vía con post test de Dunnett. En cada gráfico los grupos de estudio se ordenan de izquierda a derecha como: Control, 3Hrs PHT, 48Hrs PHT y 120Hrs PHT. Barras de error indican desviación estándar.*

Luego, se determinó si la hipertermia afecta el cambio relativo de la señal de γ H2AX en los cromosomas sexuales durante el MSCI. Cuantificando la intensidad de señal presente en la cromatina del X e Y en las imágenes de inmunofluorescencia, se observó que, a las 3 horas, los espermatocitos en Paquiteno (Paquiteno temprano n=15, p=0.1198; Paquiteno Medio n=20, p=0.9899; Paquiteno Tardío n=20, p=0.3689) y Diploteno (Diploteno temprano n=15, p=0.9098; Diploteno Medio/Tardío n=20, p=0.9621) presentaban similar intensidad de señal de γ H2AX en comparación con espermatocitos controles (**Figura 7A**).

Sin embargo, al aumentar el tiempo post-hipertermia, se observó que a las 48 horas la intensidad de la señal de γ H2AX aumenta 1.3 veces en los espermatoцитos en Paquiteno Tardío (n=20; ****p=<0.0001) y 1.2 veces en los espermatoцитos en Diploteno temprano (n=15; p=**0.0043), respecto al grupo control. No se observaron diferencias significativas entre espermatoцитos en Paquiteno temprano (n=15; p=0.1014), Paquiteno medio (n=20; p=0.0555) ni en Diploteno medio/tardío (n=20; p=0.2529) a las 48hrs PHT y sus respectivos controles (**Figura 7B**).

En tanto, a las 120 horas post-hipertermia, no se encontraron diferencias significativas entre espermatoцитos PHT y controles en Paquiteno temprano (n=15; p=0.2729) y en Paquiteno medio (n=20; p=0.5213). Sin embargo, los espermatoцитos de 120hrs PHT en Paquiteno tardío presentaron una señal de γ H2AX 1.2 veces más intensa en comparación con espermatoцитos controles (n=20; **p=0.0016). De la misma forma, en Diploteno temprano, la señal de γ H2AX fue también 1.2 veces más intensa en espermatoцитos 120hrs PHT en comparación con controles (n=15; **p=0.0082). Finalmente, en Diploteno medio/tardío (n=20; p=0.9356) no se encontraron diferencias significativas entre espermatoцитos sometidos a hipertermia en comparación con los controles (**Figura 7C**).

Por lo tanto, la hipertermia no se asoció con un cambio en la temporalidad de la marcación de γ H2AX en los cromosomas X-Y durante la meiosis. Sin embargo, si se puede ligar a un aumento en la intensidad de fluorescencia a las 48 y 120 horas PHT, específicamente en Paquiteno tardío y Diploteno temprano.

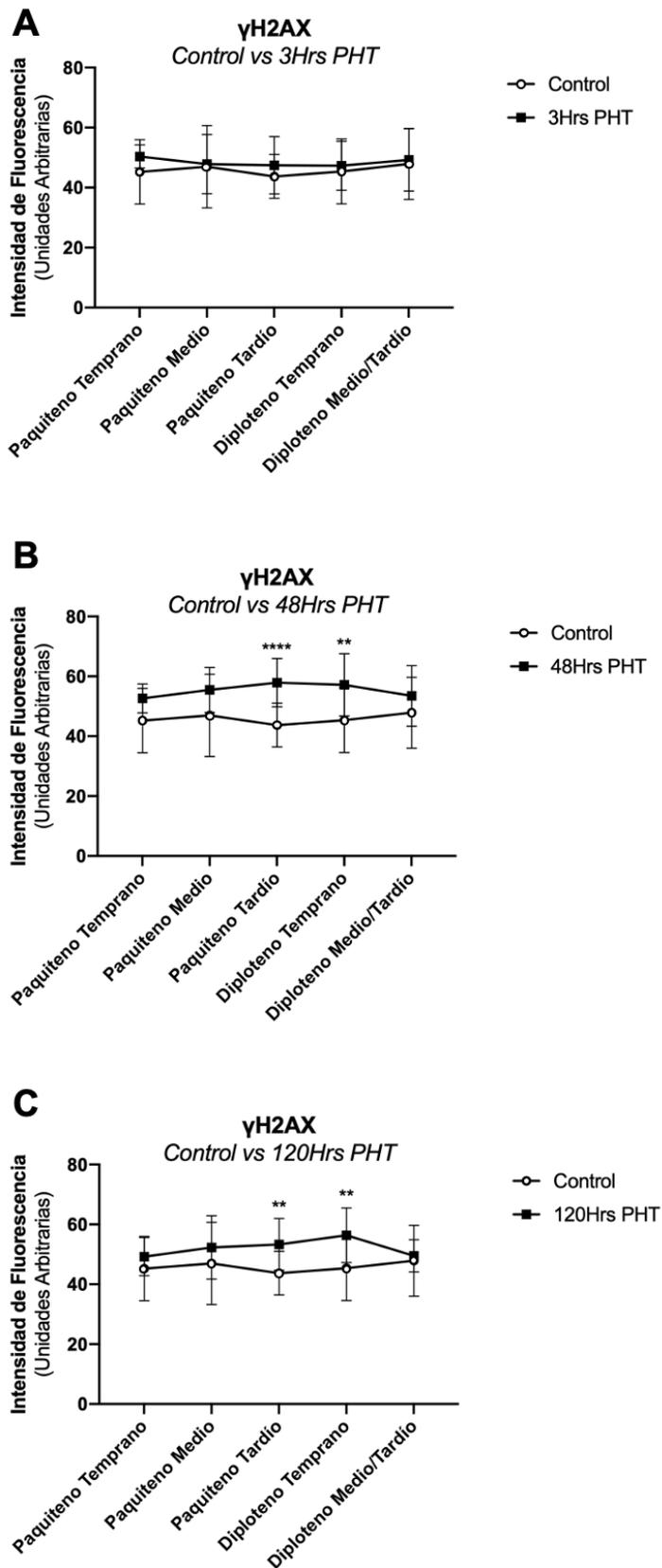


Figura 7: La hipertermia afecta la intensidad de fluorescencia de γ H2AX en lo cromosomas sexuales durante el MSCI. Cuantificación de intensidad de fluorescencia en espermatoцитos con presencia de γ H2AX en la cromatina de los cromosomas X-Y en Paquiteno y Diploteno, a las (A) 3Hrs PHT, (B) 48Hrs PHT (** $p=0.0043$, **** $p<0.0001$) y (C) 120Hrs PHT (** $p=0.0016$, ** $p=0.0082$) vs. Control. Análisis de varianza de una vía con post test de Dunnett. Barras de error indican desviación estándar.

b) Efecto de la hipertermia en H3K9me3 durante MSCI.

La trimetilación de la histona 3 en lisina 9 (H3K9me3) está asociada a la condensación de la cromatina y represión transcripcional de los cromosomas XY, presentando una temporalidad característica durante el MSCI (65). En esta tesis, se analizó la dinámica temporal y de localización de H3K9me3 en la cromatina de los cromosomas sexuales de espermatoцитos tanto de ratones controles como de ratones sometidos a hipertermia transitoria, que fueron sacrificados a las 3, 48 y 120 horas post-hipertermia. El número de espermatoцитos evaluados por grupo de estudio se indica en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Número de espermatoцитos analizados para H3K9me3 por cada sub-estadio de Paquiteno y Diploteno, y por cada grupo de estudio.

	Paquiteno Temprano	Paquiteno Medio	Paquiteno Tardío	Diploteno Temprano	Diploteno Medio/Tardío	TOTAL
Control	n=81	n=308	n=224	n=142	n=232	n=987
3Hrs PHT	n=78	n=251	n=259	n=137	n=266	n=991
48Hrs PHT	n=57	n=174	n=136	n=98	n=154	n=569
120Hrs PHT	n=59	n=138	n=127	n=94	n=177	n=595

*PHT: Post-Hipertermia

En concordancia con la literatura (65), se observó que durante Paquiteno temprano, el 78.6% (n=81) de los espermatoцитos controles presentaban H3K9me3 en toda la cromatina de los cromosomas X-Y (**Figura 8Aa** y **8Ba**). En Paquiteno medio, en el 57.33% (n=308) de espermatoцитos controles, la señal de H3K9me3 en los cromosomas sexuales disminuye y sólo se observó en la región distal del cromosoma X (heterocromatina pericentromérica, HPC) y en todo el cromosoma Y (**Figura 8Ab** y **8Bb**). Durante Paquiteno tardío (**Figura 8Ac** y **8Bc**) y Diploteno

temprano (**Figura 8Ad y 8Bd**), la señal de H3K9me3 se encuentra únicamente en la HPC del cromosoma X, y ausente tanto en el resto de la cromatina del cromosoma X como en la totalidad del cromosoma Y. Este patrón fue observado en el 88.6% (n=224) y 77.63% (n=142) de los espermatozoides controles en Paquiteno tardío y Diploteno temprano, respectivamente. Finalmente, en Diploteno medio/tardío (**Figura 8Ae y 8Be**), la señal de H3K9me3 reaparece y se observa en toda la cromatina de los cromosomas sexuales en el 68.03% (n=232) de los espermatozoides controles.

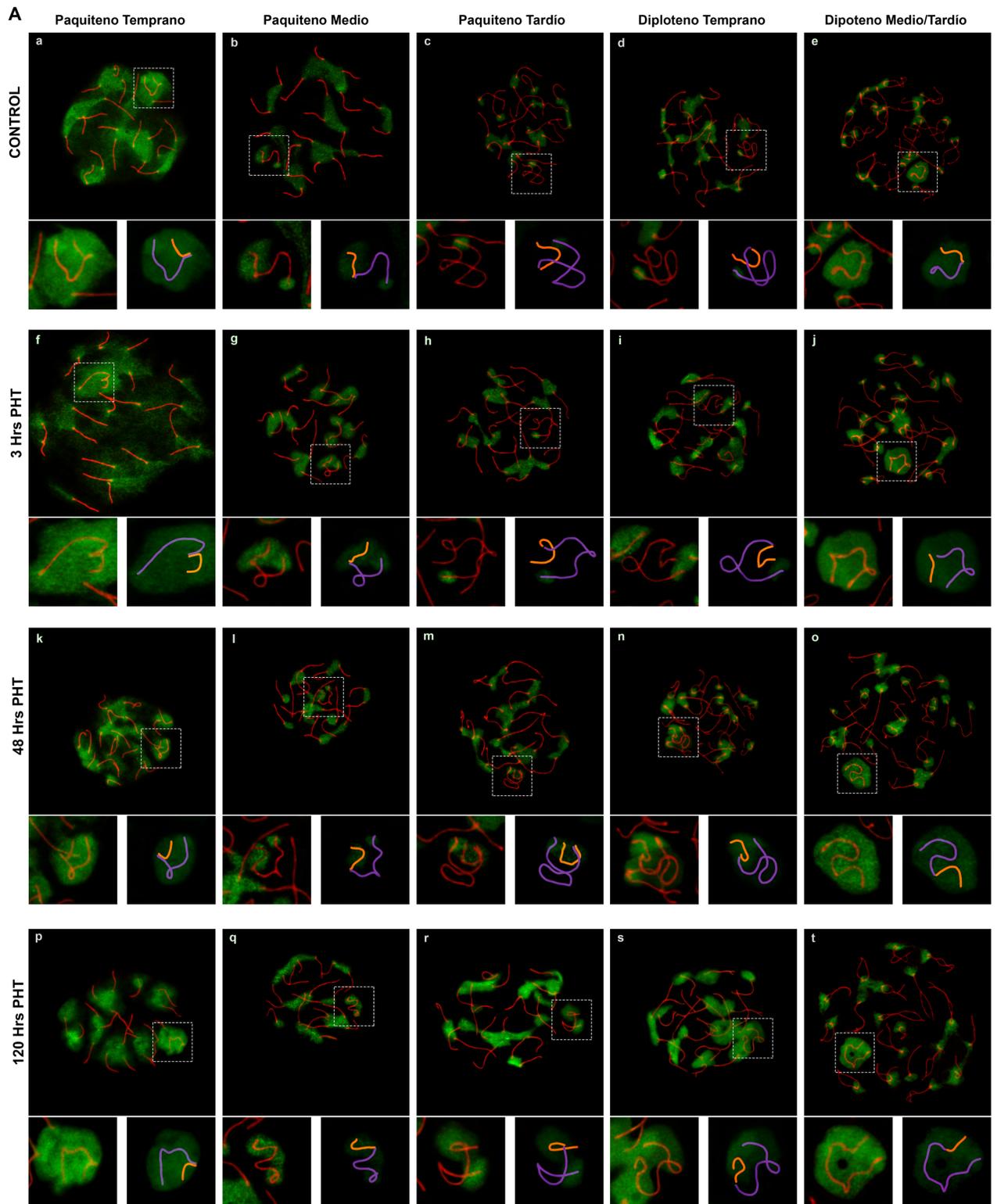
A las 3 horas post-hipertermia, los espermatozoides presentaron un patrón temporal y de localización similar al observado en las células control y ninguno de los estadios analizados presentó diferencias significativas con el control.

A las 48 horas PHT, en la etapa de Paquiteno tardío (n=136) el porcentaje de espermatozoides con señal de H3K9me3 solamente en la HPC del cromosoma X y en todo el cromosoma Y aumentó significativamente a 33.7% (p=0.029), disminuyendo por consiguiente la cantidad de espermatozoides con un patrón de H3K9me3 similar a los controles en esta etapa (**Figura 8Am y 8Bc**). Asimismo, en Paquiteno medio (n=174), 42% de los espermatozoides sólo tenían señal de H3K9me3 en la HPC del cromosoma X, mientras que el resto de las células (52.37%) en este estadio presentaban el patrón normal de H3K9me3 correspondiente a señal solamente en el cromosoma Y (**Figura 8Ai y 8Bb**). Otra diferencia significativa observada fue durante Diploteno temprano (n=96). En esta etapa sólo el 40.87% de los espermatozoides exhibieron el patrón normal de H3K9me3 (ausencia en los cromosomas sexuales); 43.8% presentaron H3K9me3 en la cromatina del Y (p=<0.0001), y 15.8% en toda la

cromatina de los cromosomas sexuales (**Figura 8An y 8Bd**). Este resultado sugiere que la condensación de los cromosomas X-Y estaría adelantada respecto al patrón control de H3K9me3. Finalmente, en Diploteno tardío (n=154), el 73,07% de los espermatoцитos presentaron señal de este marcador en toda la cromatina y sólo 22.1% exhibieron alteración del patrón con marca solamente en el cromosoma Y (**Figura 8Ao y 8Be**).

Similarmente, a las 120 horas post-hipertermia, se observaron diferencias significativas sólo en los estadios de Paquiteno tardío y Diploteno temprano. Durante Paquiteno temprano (n=59; **Figura 8Ap**) y medio (n=138; **Figura 8Aq**), el 82.1% y 67.37% de los espermatoцитos evaluados conservaron el patrón normal, respectivamente. Sin embargo, en el siguiente estadio de Paquiteno tardío (n=127; **Figura 8Ar**), sólo en el 23.83% de las células se observó ausencia de marca en el X-Y, aumentando significativamente 3.7 veces (76.17%) la presencia de la histona en el cromosoma Y ($p < 0.0001$). Del mismo modo, en Diploteno temprano (n=94; **Figura 8As**) se observó que sólo el 44.5% de los espermatoцитos analizados conservó el patrón normal, mientras que la presencia de H3K9me3 en el cromosoma Y aumentó significativamente 1.7 veces (55.5%) respecto al control ($p < 0.0001$). Finalmente, y al igual que a las 48hrs PHT, en Diploteno tardío (n=177; **Figura 8At**) no se encontraron diferencias significativas.

Estos resultados indican que la hipertermia cambia la dinámica temporal de H3K9me3 durante el MSCI en las etapas de Paquiteno tardío y Diploteno Temprano a las 48 y 120 horas post-estrés térmico.



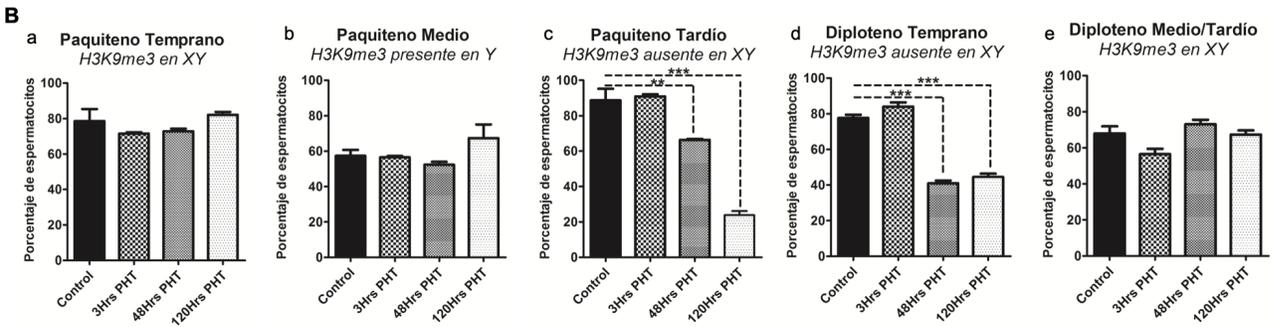


Figura 8: La hipertermia afecta la dinámica temporal de H3K9me3 durante el MSCI. (A) Inmunodetección de H3K9me3 (verde) y SYCP3 (rojo) en los cromosomas sexuales X-Y (recuadro blanco) durante Paquitenos y Diplotenos en espermatozoides controles (a-e), 3 horas PHT (f-j), 48 horas PHT (k-o) y 120 horas PHT (p-t). Paneles inferiores muestran una magnificación de los cromosomas sexuales y la correspondiente representación gráfica de cromosomas X (morado) e Y (naranja), en las que se disminuyó intencionalmente la intensidad de señal con fines didácticos. **(B)** Cuantificación de espermatozoides con presencia de H3K9me3 en la cromatina de los cromosomas X-Y durante Paquitenos y Diplotenos. Análisis de varianza de una vía con post test de Dunnett. En cada gráfico los grupos de estudio se ordenan de izquierda a derecha como: Control, 3Hrs PHT, 48Hrs PHT y 120Hrs PHT. Barras de error indican desviación estándar. ** $p = 0.0076$; *** $p < 0.0001$.

Además, el análisis de intensidad de señal de H3K9me3 en los cromosomas sexuales indicó que la hipertermia produce cambios relativos significativos en la presencia de esta histona modificada en todos los grupos de estudio (**Figura 9**). A las 3 horas post-hipertermia, durante Paquitenos tempranos ($n=15$), no se encontraron diferencias significativas, pero sí se hallaron en las etapas posteriores. De este modo, se encontró un aumento de 1.7 veces en la intensidad de fluorescencia de H3K9me3 en los cromosomas sexuales en Paquitenos medios ($n=20$, **** $p < 0.0001$), 1.8 veces en Paquitenos tardíos ($n=20$, *** $p = 0.0004$), 1.8 veces en Diplotenos tempranos

(n=15, ****p=<0.0001), mientras que en Diploteno medio/tardío (n=20) no se encontraron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia respecto al control (**Figura 9A**).

Similar a lo hallado a las 3hrs PHT, las 48 horas post-hipertermia no se encontraron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia de H3K9me3 en los cromosomas sexuales en la etapa de Paquiteno temprano (n=15) ni en Diploteno medio/tardío (n=20), pero sí se hallaron aumentos significativos de 1.9 veces en Paquiteno medio (n=20, ****p=<0.0001), 2.6 veces en Paquiteno tardío (n=20, ****p=<0.0001) y 1.6 veces en Diploteno temprano (n=15, **p=0.0018), respecto al grupo control (**Figura 9B**).

Finalmente, lo mismo se observó a las 120 horas post-hipertermia: no se encontraron diferencias en la intensidad de fluorescencia de H3K9me3 ni en Paquiteno temprano (n=15) ni en Diploteno medio/tardío (n=20), pero se encontraron aumentos de 1.8 veces en Paquiteno medio (n=20, ****p=<0.0001), 3.1 veces en Paquiteno tardío (n=20, ****p=<0.0001) y de 1.6 veces en Diploteno temprano (n=15, p=**0.0024), respecto al control (**Figura 9C**).

Estos resultados sugieren que la hipertermia afecta la dinámica temporal de H3K9me3 en las etapas de Paquiteno tardío y Diploteno Temprano a las 48 y 120 horas PHT, junto con un cambio en la intensidad de fluorescencia durante Paquiteno medio y tardío, y Diploteno temprano, en todos los grupos de estudio analizados.

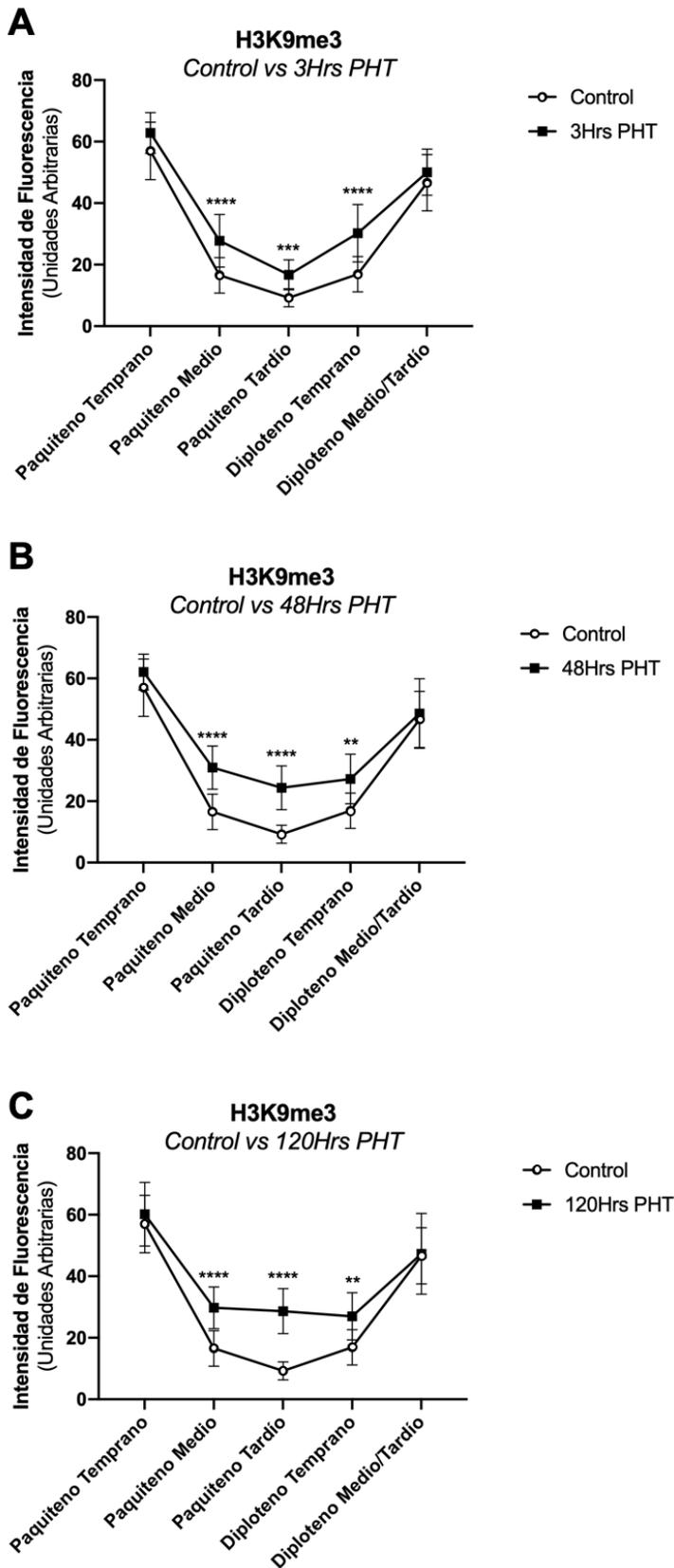


Figura 9: La hipertermia afecta la intensidad de fluorescencia de H3K9me3 durante el MSCI. Cuantificación de intensidad de fluorescencia en espermatocitos con presencia de H3K9me3 en la cromatina de los cromosomas X-Y en Paquiteno y Diploteno, a las **(A)** 3Hrs PHT ($***p=0.0004$, $****p<0.0001$), **(B)** 48Hrs PHT ($**p=0.0018$, $****p<0.0001$) y **(C)** 120Hrs PHT ($**p=0.0024$, $****p<0.0001$) vs. Control. Análisis de varianza de una vía con post test de Dunnett. Barras de error indican desviación estándar.

c) Efecto de la hipertermia en H2A K119ub durante el MSCI.

La ubiquitinación de la histona H2A clásicamente se asocia a represión transcripcional (73) y es parte de la respuesta frente a daño en el DNA, ya que puede ser encontrada en sitios donde han ocurrido DSB (59). Es por esto que no es inesperado encontrar esta modificación adyacente a MDC1, proteína que junto a γ H2AX, dan inicio a la cascada de reclutamientos que contribuirán a formar y establecer el MSCI (**Figura 3**). La identificación con el clon D27C4 permite detectar selectivamente la mono-ubiquitinación en la lisina 119 de la histona H2A (H2A K119ub), que tiene un rol dual en el MSCI. El número de espermatoцитos analizados por grupo de estudio se indica en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Número de espermatoцитos analizados para H2A K119ub por cada sub-estadio de Paquiteno y Diploteno, y por cada grupo de estudio.

	Paquiteno Temprano	Paquiteno medio	Paquiteno Tardío	Diploteno temprano	Diploteno medio/tardío	TOTAL
Control	n=89	n=273	n=322	n=204	n=393	n=1281
3Hrs PHT	n=93	n=253	n=307	n=191	n=425	n=1269
48Hrs PHT	n=65	n=201	n=284	n=138	n=307	n=995
120Hrs PHT	n=67	n=189	n=259	n=132	n=289	n=936

*PHT: Post-Hipertermia

En los espermatoцитos controles analizados, se encontró un patrón de marcación de H2A K119ub en concordancia con la literatura (74). Durante las etapas de Paquiteno temprano (**Figura 10Aa y 10Ba**), medio (**Figura 10Ab y 10Bb**) y tardío (**Figura 10Ac y 10Bc**) se observó presencia de esta modificación en la totalidad de la cromatina de los cromosomas X-Y en el 93.25% (n=89), 96.72% (n=273) y 96.67% (n=322) de los espermatoцитos analizados, respectivamente. Luego, en la etapa de Diploteno

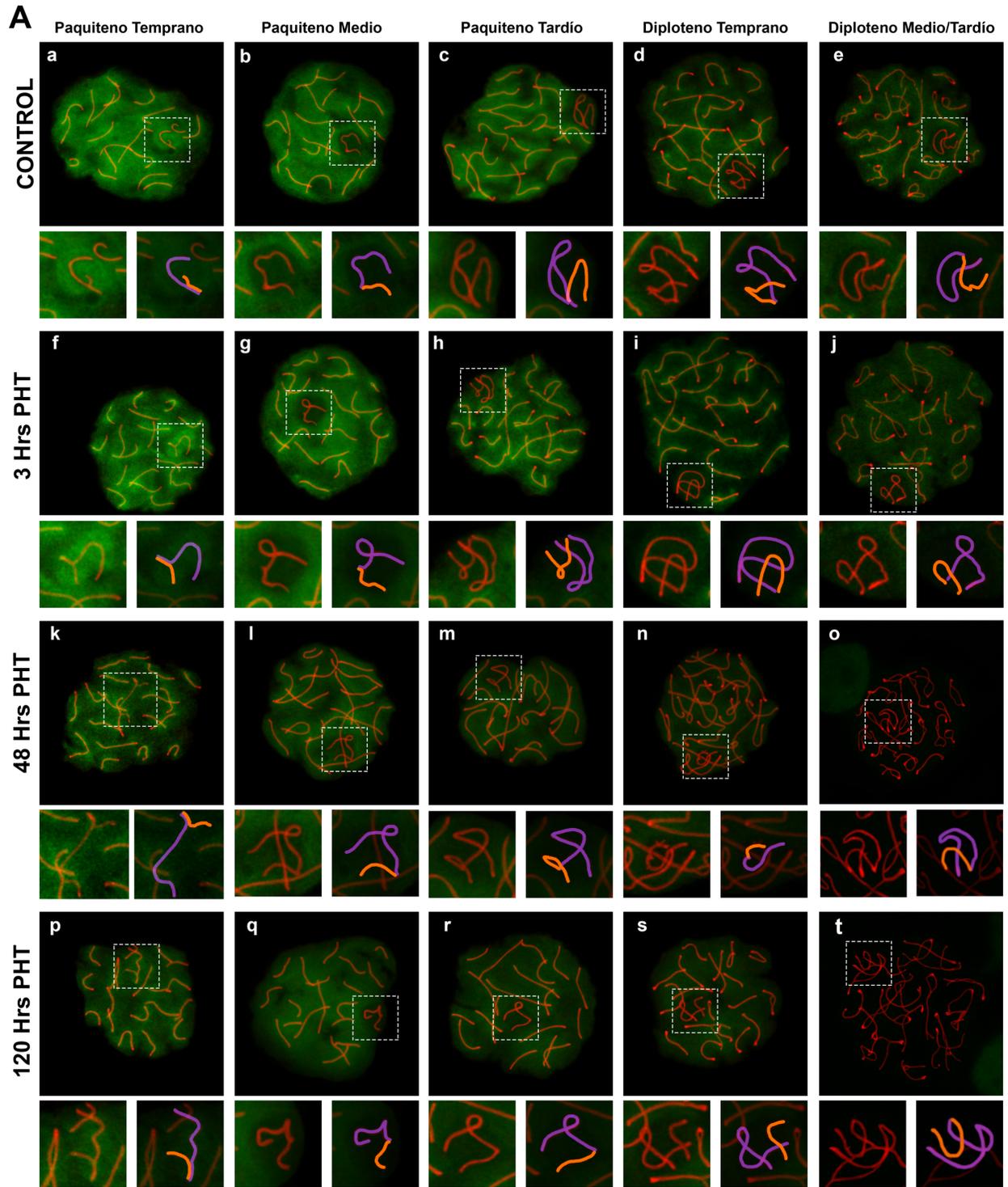
temprano (**Figura 10Ad y 10Bd**), se detectó la presencia de H2A K119ub en ambos cromosomas sexuales en el 95.74% (n=204) de los núcleos, mientras que en Diploteno medio/tardío (**Figura 10Ae y 10Be**), el 62.14% (n=393) de los espermatoцитos presentó señal de esta modificación en los cromosomas sexuales.

A las 3Hrs post-hipertermia no se detectaron diferencias significativas respecto al control. Durante Paquiteno temprano (**Figura 10Af y 10Ba**), medio (**Figura 10Ag y 10Bb**) y tardío (**Figura 10Ah y 10Bc**), se observó señal de esta ubiquitinación en el 94.36% (n=93), 93.92% (n=253) y 94.45% (n=307) de los espermatoцитos analizados, respectivamente. En el estadio de Diploteno temprano (**Figura 10Ai y 10Bd**) el 92.11% (n=191) de los núcleos analizados presentaron señal en toda la cromatina del X-Y, mientras que en Diploteno medio/tardío (**Figura 10Aj y 10Be**) se detectó presencia de esta modificación en el 53.96% (n=425) de los espermatoцитos.

En tanto, a las 48Hrs PHT, las etapas de Paquiteno temprano (**Figura 10Ak y 10Ba**), medio (**Figura 10Al y 10Bb**) y tardío (**Figura 10Am y 10Bc**) presentaron presencia de UbiH2A en el 76.89% (n=65), 93.4% (n=201) y 89.82% (n=284) de núcleos analizados, respectivamente, sin diferir significativamente de los controles. Sin embargo, en el estadio de Diploteno, tanto temprano (n=138, ***p=<0.0001) como medio/tardío (n=307, ***p=<0.0001), se encontraron diferencias significativas, ya que sólo el 70.47% (**Figura 10An y 10Bd**) y el 16.5% (**Figura 10Ao y 10Be**) de los espermatoцитos presentaron señal de esta modificación en los cromosomas X-Y, respectivamente.

De manera similar, a las 120Hrs PHT se identificó H2A K119ub en el 95.33% (n=67), 94.22% (n=189) y 91.04% (n=259) de los espermatocitos en Paquiteno temprano (**Figura 10Ap y 10Ba**), medio (**Figura 10Aq y 10Bb**) y tardío (**Figura 10Ar y 10Bc**), respectivamente, en la cromatina de ambos cromosomas sexuales. En el estadio de Diploteno también se encontró un número significativamente menor de espermatocitos con presencia de H2A K119ub en los cromosomas sexuales respecto al control; en el 69.22% de núcleos de espermatocitos en Diploteno temprano (n=132, **Figura 10As y 10Bd**) se detectó H2A K119ub, mientras que sólo en el 27.91% de espermatocitos en Diploteno medio/tardío (n=289, $***p < 0.0001$) (**Figura 10At y 10Be**) se observó presencia de esta modificación post-traducciona de histona.

Lo anterior indica que la hipertermia disminuye la presencia de H2A K119ub en la etapa de Diploteno (temprano y medio/tardío) a las 48 y 120 horas post-hipertermia.



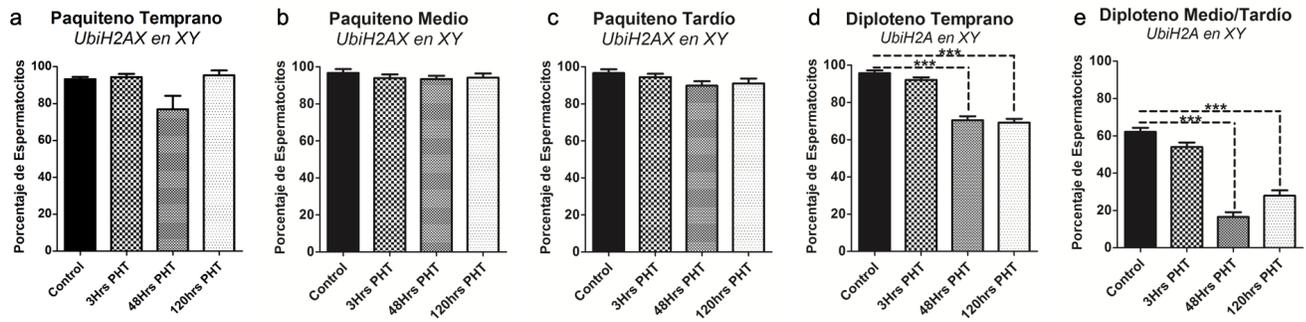
B

Figura 10: La hipertermia afecta la localización de H2A K119ub durante el MSCI.

(A) Inmunodetección de H2A K119ub (verde) y SYCP3 (rojo) en los cromosomas sexuales X-Y (recuadro blanco) durante Paquiteno y Diploteno en espermatocitos controles (a-e), 3 horas PHT (f-j), 48 horas PHT (k-o) y 120 horas PHT (p-t). Paneles inferiores muestran una magnificación de los cromosomas sexuales y la correspondiente representación gráfica de cromosomas X (morado) e Y (naranja), en las que se disminuyó intencionalmente la intensidad de señal con fines didácticos.

(B) Cuantificación de espermatocitos con presencia de H2A K119ub en la cromatina de los cromosomas X-Y durante Paquiteno y Diploteno. Análisis de varianza de una vía con post test de Dunnett. En cada gráfico los grupos de estudio se ordenan de izquierda a derecha como: Control, 3Hrs PHT, 48Hrs PHT y 120Hrs PHT. Barras de error indican desviación estándar. *** $p < 0.0001$.

Complementario a los resultados anteriores, el análisis de intensidad de señal de H2A K119ub en los cromosomas sexuales arrojó que a las 3Hrs post-hipertermia no se producen cambios significativos en la intensidad de fluorescencia (Figura 11A). Sin embargo, se encontró una disminución significativa relativa en la presencia de esta modificación en todos los estadios de la profase I analizados a las 48Hrs PHT: se detectó una disminución en la intensidad de fluorescencia de 1.7 veces en Paquiteno temprano (n=15; **** $p < 0.0001$), 2.2 veces en Paquiteno medio (n=20; **** $p < 0.0001$), 2.0 veces en Paquiteno tardío (n=20; **** $p < 0.0001$), 1.8 veces en

Diploteno temprano (n=15; ****p=<0.0001) y 2.6 veces en Diploteno medio/tardío (n=20; ****p=<0.0001) (**Figura 11B**), en comparación con los controles.

Además, a las 120Hrs PHT también se detectó una disminución relativa en la intensidad de fluorescencia. Se observó una disminución de 1.5 veces en Paquiteno temprano (n=15; ****p=<0.0001), 2.3 veces en Paquiteno medio (n=20; ****p=<0.0001) y 1.2 veces en Paquiteno tardío (n=20; *p=0.0201) (**Figura 11B**).

Estos resultados sugieren que la hipertermia incide en la intensidad de fluorescencia de H2A K119ub en la cromatina de los cromosomas sexuales, particularmente a las 48 horas PHT, en todas las sub-etapas del MSCI y a las 120 horas PHT en la etapa de Paquiteno.

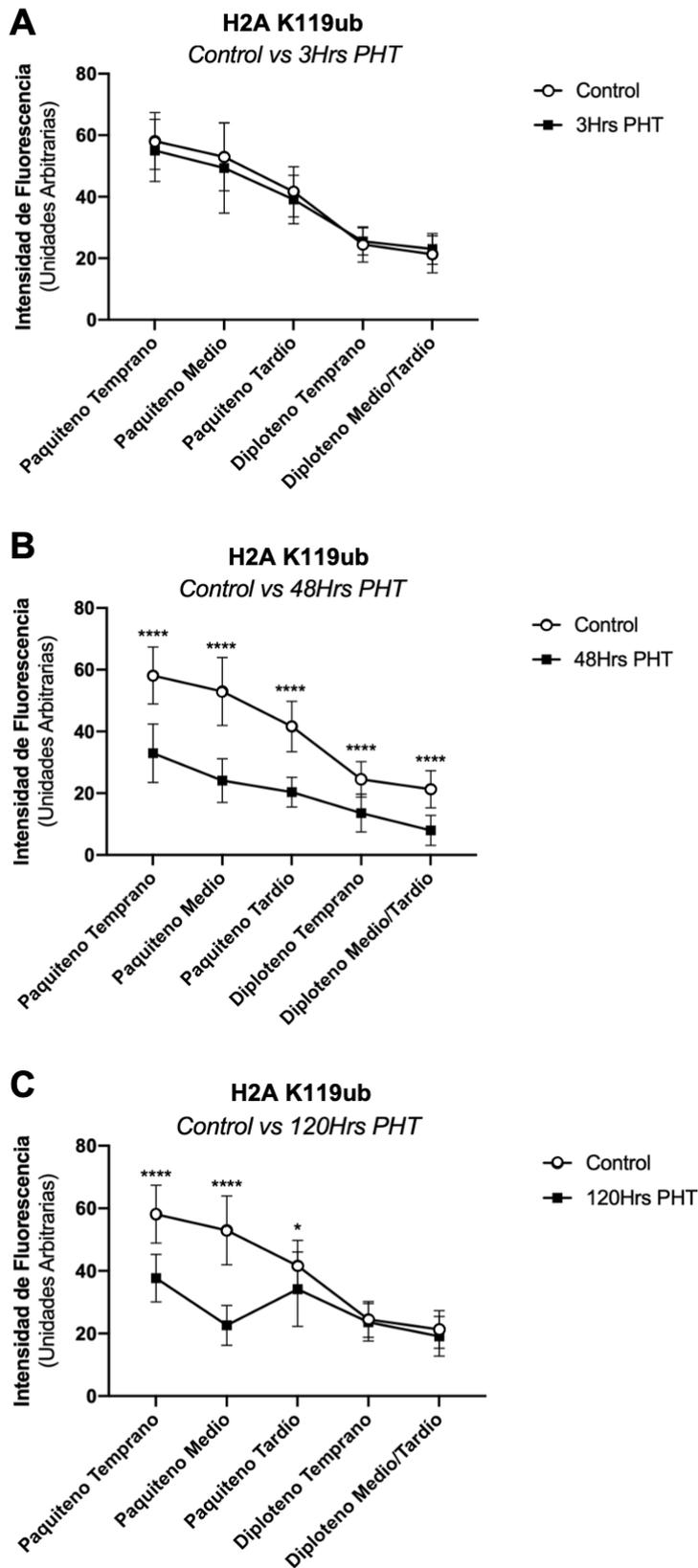


Figura 11: La hipertermia afecta la intensidad de fluorescencia de H2A K119ub durante el MSCI. Cuantificación de intensidad de fluorescencia en espermatocitos con presencia de H2A K119ub en la cromatina de los cromosomas X-Y en Paquitenio y Diploteno, a las (A) 3Hrs PHT, (B) 48Hrs PHT ($****p < 0.0001$) y (C) 120Hrs PHT ($*p = 0.0201$, $****p < 0.0001$) vs. Control. Análisis de varianza de una vía con post test de Dunnett. Barras de error indican desviación estándar.

d) Efecto de la hipertermia en H3K4me1 durante MSCI.

El rol de la monometilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me1) es fundamental en la regulación de la expresión génica durante la espermatogénesis en mamíferos, ya que se encuentra ligada específicamente al silenciamiento transcripcional (75). Durante la etapa de zigoteno, producto de la vasta presencia de DSBs programados en todo el genoma necesarios para la recombinación meiótica, la transcripción génica se encuentra reprimida, permitiendo visualizar marcas de silenciamiento génico en autosomas dentro de las que se encuentra la H3K4me1. Esta marca permanece en la cromatina de los cromosomas sexuales, contribuyendo así a la mantención del silenciamiento génico de los cromosomas X-Y (65). Además, la presencia de H3K4me1 se mantiene en células post-meióticas como Metafasas, Anafases y Espermatidas Redondas (76). El número de espermatocitos evaluados por grupo de estudio se indica en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Número de espermatocitos analizados para H3K4me1 por cada sub-estadio de Paquiteno y Diploteno, y por cada grupo de estudio.

	Paquiteno temprano	Paquiteno medio	Paquiteno tardío	Diploteno temprano	Diploteno medio/tardío	TOTAL
Control	n=84	n=256	n=301	n=193	n=427	n=1261
3Hrs PHT	n=91	n=238	n=288	n=213	n=399	n=1229
48Hrs PHT	n=59	n=193	n=212	n=98	n=234	n=796
120Hrs PHT	n=63	n=159	n=181	n=107	n=231	n=741

*PHT: Post-Hipertermia

En controles, en la etapa de Paquiteno temprano se observó la presencia de H3K4me1 en toda la cromatina de ambos cromosomas sexuales en el 98.37% (n=84) de las células analizadas (**Figura 12Aa y Ba**). Luego, en Paquiteno medio, la presencia de esta modificación en los cromosomas X-Y disminuye drásticamente,

encontrándose ausente en el 45.11% (n=256) de los espermatoцитos en este estadio (**Figura 12Ab y 12Bb**). En Paquiteno tardío (n=301, la señal de H3K4me1 nuevamente es detectable en toda la cromatina de ambos cromosomas sexuales en un 96.5% de las células (**Figura 12Ac y 12Bc**), manteniéndose hasta el término de la profase I, ya que en Diploteno temprano (**Figura 12Ad y 12Bd**) y medio/tardío (**Figura 12Ae y 12Be**) se encontró la presencia en la cromatina de X-Y en el 96.22% (n=193) y en el 97% (n=427) de los espermatoцитos, respectivamente. Los resultados obtenidos a partir de los controles se encuentran en concordancia con lo descrito en la literatura (53, 65).

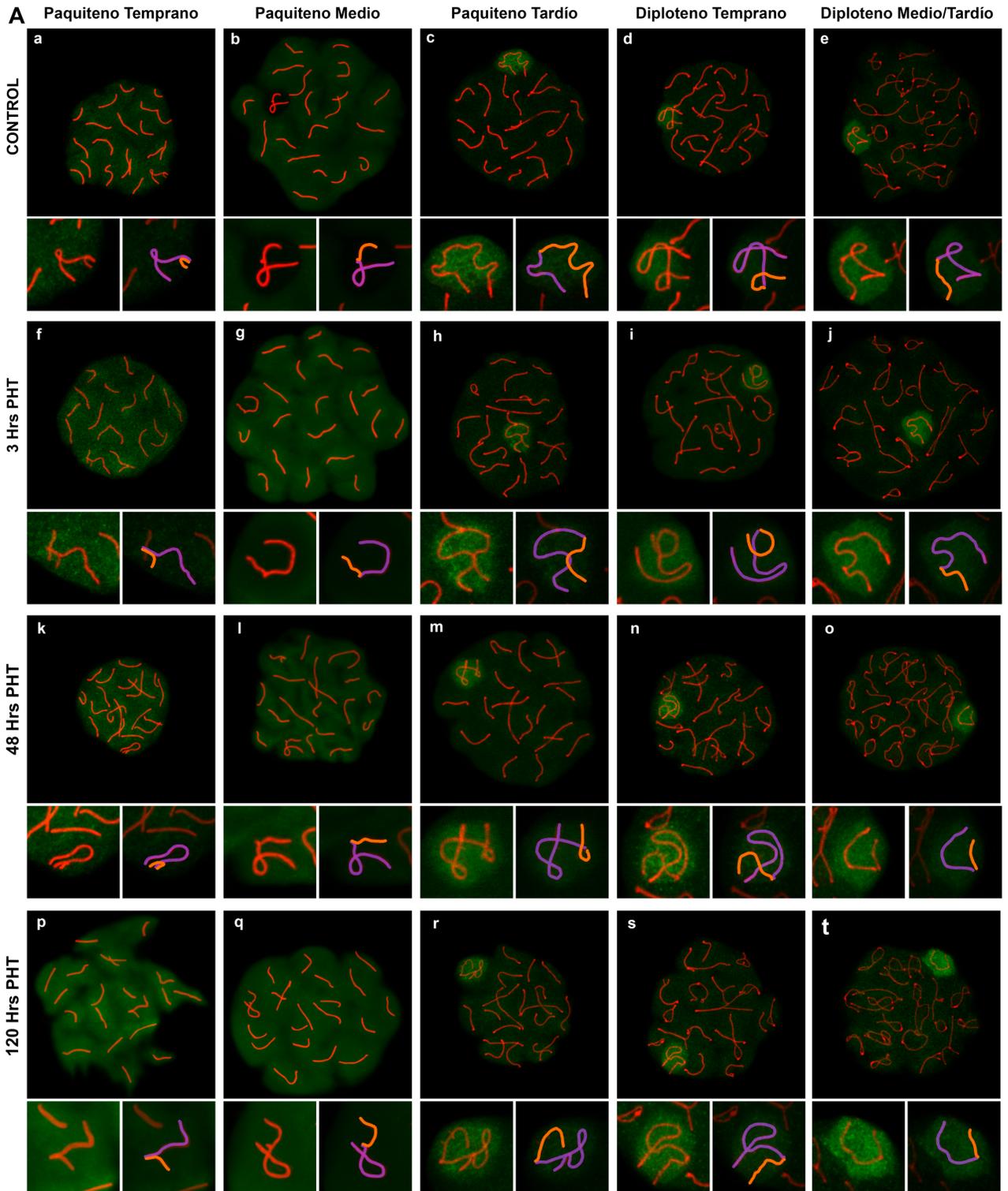
A las 3 horas post-hipertermia, se encontró presencia de H3K4me1 en los cromosomas sexuales durante Paquiteno temprano en el 96.3% (n=91, **Figura 12Af y 12Ba**). En la etapa de Paquiteno medio, el 51.13% (n=238) de los espermatoцитos carecían de marca de esta modificación post-traducciona (**Figura 12Ag y 12Bb**). En la etapa de Paquiteno tardío (n=288), el 95.64% de las células analizadas presentaron señal de H3K4me1 en la cromatina de los cromosomas sexuales (**Figura 12Ah y 12Bc**). En Diploteno se mantuvo la presencia de la marca en los cromosomas X e Y, ya que se observó en el 97.87% (n=213) y en 97.83% (n=399) de los espermatoцитos en etapas de Diploteno temprano (**Figura 12Ai y 12Bd**) y medio/tardío (**Figura 12Aj y 12Be**), respectivamente. Por lo tanto, a las 3 horas PHT no se encontraron diferencias significativas respecto al control.

En cambio, a las 48 horas post-hipertermia se detectaron diferencias significativas respecto al control. Mientras que en Paquiteno temprano el 95.43% (n=59) de los

espermatoцитos presentaban señal en los cromosomas sexuales (**Figura 12Ak y 12Ba**), sin diferir del control, en la etapa de Paquiteno medio (n=193) se encontró que sólo 61.8% de las células concordaban con el control, mientras que el 38.2% presentaban señal en los cromosomas sexuales cuando esta debería estar ausente, diferenciándose significativamente del control (** $p=0.0068$) (**Figura 12Al y 12Bb**). En las etapas posteriores no se encontraron diferencias significativas, ya que en Paquiteno tardío, Diploteno temprano y Diploteno medio/tardío se encontró la señal de H3K4me1 en el 94.11% (n=212; **Figura 12Am y 12Bc**), 96.3% (n=98; **Figura 12An y 12Bd**) y 94.69% (n=234; **Figura 12Ao y 12Be**), respectivamente.

A las 120 horas post-hipertermia, se encontraron resultados similares que a las 48Hrs PHT. En Paquiteno temprano (n=63) el 97.3% de las células analizadas presentaron señal de H3K4me1 en los cromosomas sexuales (**Figura 12Ap y 12Ba**), pero en la etapa de Paquiteno medio (n=159), el 72.35% de los espermatoцитos en este estadio presentaron señal en la cromatina sexual, lo que difiere significativamente del control (** $p=0.0003$) (**Figura 12Aq y 12Bb**). En los estadios posteriores de la profase I no presentaron diferencias significativas: en Paquiteno tardío, Diploteno temprano y Diploteno medio/tardío se encontró la señal de H3K4me1 en el 94.88% (n=181; **Figura 12Ar y 12Bc**), 94.7% (n=107; **Figura 12As y 12Bd**) y 96.76% (n=231; **Figura 12At y 12Be**), respectivamente.

Estos hallazgos indican que la hipertermia aumenta la presencia de H3K4me1 en la etapa de Paquiteno medio a las 48 y 120 horas post-hipertermia.



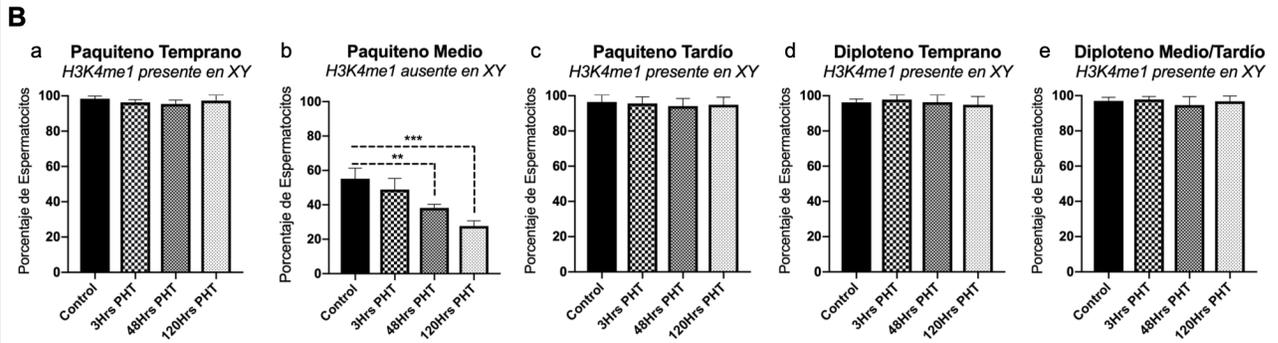


Figura 12: Efecto de la hipertermia sobre la dinámica temporal y de localización de H3K4me1 durante el MSCI. (A) Inmunodetección de H3K4me1 (verde) y SYCP3 (rojo) en los cromosomas sexuales X-Y (recuadro blanco) durante Paquiteno y Diploteno en espermatocitos controles (a-e), 3 horas PHT (f-j), 48 horas PHT (k-o) y 120 horas PHT (p-t). Paneles inferiores muestran una magnificación de los cromosomas sexuales y la correspondiente representación gráfica de cromosomas X (morado) e Y (naranja), en las que se disminuyó intencionalmente la intensidad de señal con fines didácticos. **(B)** Cuantificación de espermatocitos con presencia de H3K4me1 en la cromatina de los cromosomas X-Y durante Paquiteno y Diploteno. Análisis de varianza de una vía con post test de Dunnett. En cada gráfico los grupos de estudio se ordenan de izquierda derecha como: Control, 3Hrs PHT, 48Hrs PHT y 120Hrs PHT. Barras de error indican desviación estándar. ** $p=0.0068$; *** $p=0.0003$.

Esta modificación post-traducciona l tiene la particularidad de permanecer en la cromatina de los cromosomas sexuales en etapas post-meióticas (PMSC, *post-meiotic sex chromatin*) (56), por lo que también se analizaron células en etapa de Metafase y Espermatídas Redondas (**Figura 13**).

En las células en Metafase la presencia de H3K4me1 se mantiene en toda la cromatina de los cromosomas sexuales, donde también puede verse un vestigio de

señal del elemento axial del complejo sinaptonémico (**Figura 13Aa**). No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos de estudio, puesto que en el 100% de las Metafasas analizadas tanto en controles (n=31; **Figura 13Aa y 13Ba**), como a las 3 horas (n=36; **Figura 13Ac y 13Ba**), 48 horas (n=21; **Figura 13Ae y 13Ba**) y 120 horas PHT (n=17; **Figura 13Ag y 13Ba**) se encontró presencia de señal de H3K4me1 en la cromatina de los cromosomas sexuales.

En tanto, en las Espermátidas redondas la presencia de H3K4me1 se puede visualizar en yuxtaposición a la región DAPI positiva característica de estas células, llamada cromocentro (**Figura 13Ab**). No se hallaron diferencias significativas en ninguno de los grupos de estudio, debido a que en placas controles (n=127; **Figura 13Ab y 13Bb**), 3Hrs PHT (n=131; **Figura 13Ad y 13Bb**), 48Hrs PHT (n=83; **Figura 13Af y 13Bb**) y a las 120Hrs PHT (n=94; **Figura 13Ah y 13Bb**), se encontró la presencia de esta modificación post-traducciona de histona en la totalidad de las células analizadas en todos los grupos de estudio.

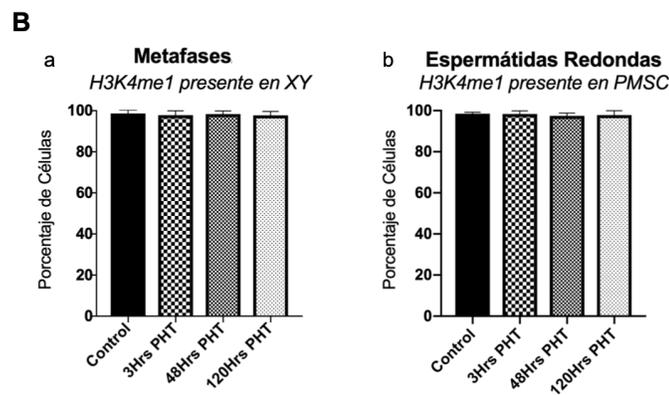
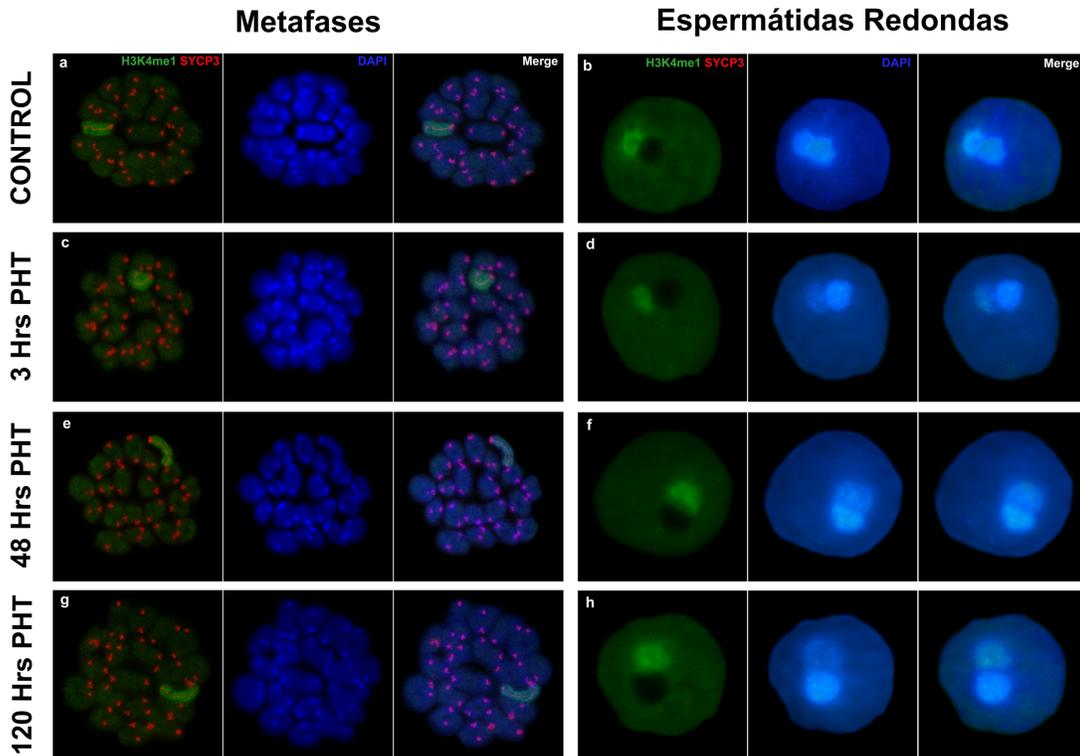


Figura 13: La hipertermia no afecta la localización de H3K4me1 en PMSC.

(A) Inmunodetección de H3K4me1 (verde), SYCP3 (rojo) y DAPI (azul) en la cromatina sexual post-meiótica (PMSC) en Metafases y Espermátidas Redondas controles, 3 horas PHT, 48 horas PHT y 120 horas PHT. **(B)** Cuantificación de células post-meióticas con presencia de H3K4me1 en la cromatina de los cromosomas X-Y durante Metafases y Espermátidas Redondas. Análisis de varianza de una vía con post test de Dunnett. En cada gráfico los grupos de estudio se ordenan de izquierda derecha como: Control, 3Hrs PHT, 48Hrs PHT y 120Hrs. Barras de error indican desviación estándar.

Por otro lado, al cuantificar la intensidad de fluorescencia se encontraron diferencias significativas en todos los grupos de estudio respecto al control. A las 3 horas post-hipertermia (**Figura 14A**), se halló un aumento de intensidad de fluorescencia sólo en la etapa de Paquiteno temprano (n=15; *p=0.019), representando un aumento de 1.9.

A las 48 horas post-hipertermia (**Figura 14B**), se detectaron diferencias significativas en todos los grupos de estudio respecto a los controles, incluyendo las etapas post-meióticas analizadas. Se encontró un aumento en la intensidad de fluorescencia de H3K4me1 de 2.0 veces en Paquiteno temprano (n=15; ****p<0.0001), 3.3 veces en Paquiteno medio (n=20; ****p<0.0001), 2.2 veces en Paquiteno tardío (n=20; ****p<0.0001), 1.9 veces en Diploteno temprano (n=15; ****p<0.0001) y 1.3 veces en Diploteno medio/tardío (n=20; **p=0.0028). Posteriormente, en Metafases se encontró un aumento de intensidad de fluorescencia de 2.1 veces (n=15; ****p<0.0001), pero no se encontraron diferencias significativas en Espermatidas Redondas (n=20).

Una situación similar se encontró a las 120 horas post-hipertermia (**Figura 14C**), puesto que se halló un aumento de 2.5 veces en Paquiteno temprano (n=15; ****p<0.0001), 3.4 veces en Paquiteno medio (n=20; ****p<0.0001), 2.0 veces en Paquiteno Tardío (n=20; ****p<0.0001), 1.6 veces en Diploteno temprano (n=15; ****p<0.0001), 1.3 veces en Diploteno medio/tardío (n=20; **p<0.0019), 1.7 veces en Metafases (****p<0.0001), mientras que las Espermatidas Redondas (n=20) se mantuvieron inalteradas.

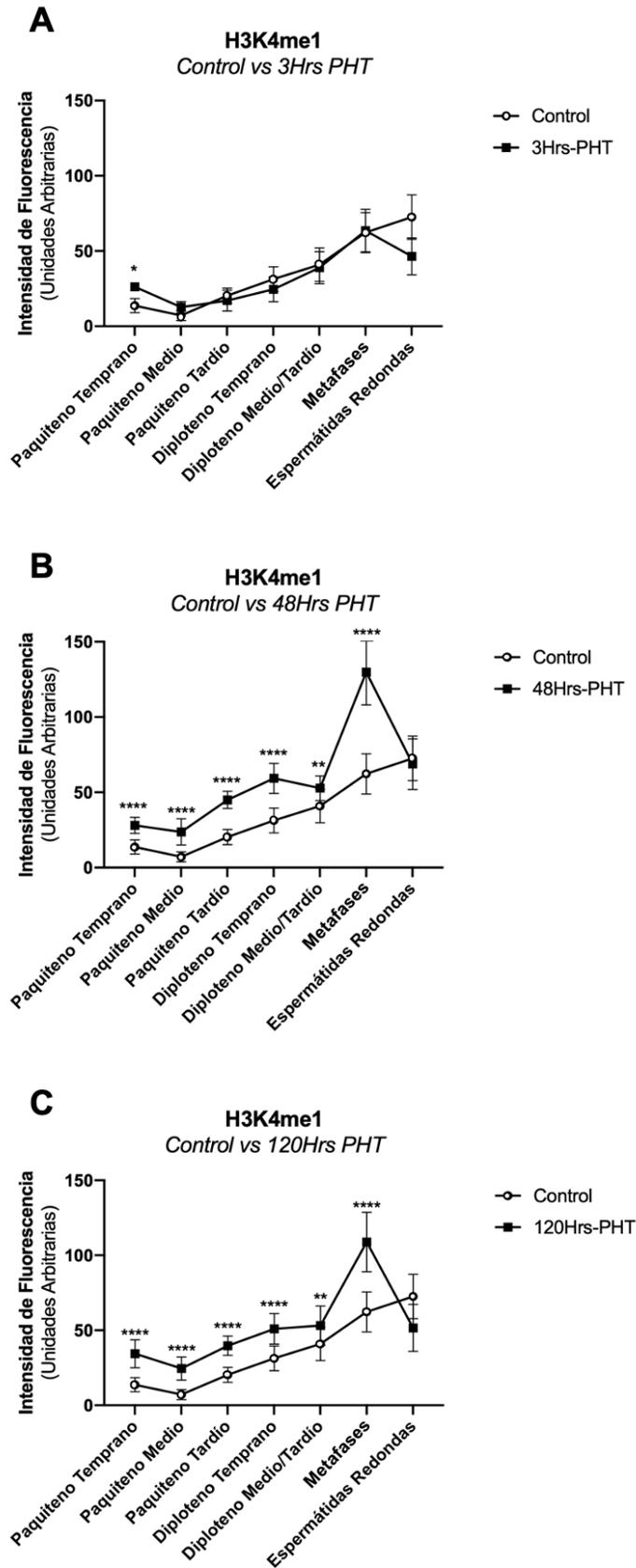


Figura 14: La hipertermia altera la intensidad de fluorescencia de H3K4me1 durante el MSCI.

Cuantificación de intensidad de fluorescencia en espermatocitos (Paquiteno y Diploteno) y células post-meióticas con presencia de H3K4me1 en la cromatina de los cromosomas X-Y a las (A) 3Hrs PHT ($*p=0.0190$), (B) 48Hrs PHT ($**p=0.0028$, $****p<0.0001$) y (C) 120Hrs PHT ($**p=0.0019$, $****p<0.0001$) vs. Control. Análisis de varianza de una vía con post test de Dunnett. Barras de error indican desviación estándar.

Estos resultados indican que la hipertermia aumenta la intensidad de marcación de H3K4me1 en los cromosomas sexuales durante el MSCI, particularmente a las 48 y 120 horas PHT.

II. Efecto de la hipertermia en la sinapsis de los cromosomas sexuales.

Durante el análisis de los patrones temporales y de localización de γ H2AX, H3K9me3, H2A K119ub y H3K4me1 en los cromosomas sexuales, se observó un alto porcentaje de cromosomas X e Y en completa asinapsis en la etapa de Paquiteno temprano a las 48 horas y a las 120 horas post-hipertermia respecto al control (**Figura 15A**). Este resultado sugiere que la hipertermia afecta la sinapsis de los cromosomas sexuales y podría estar alterando los mecanismos que mantienen la sinapsis del PAR, como el MSCI.

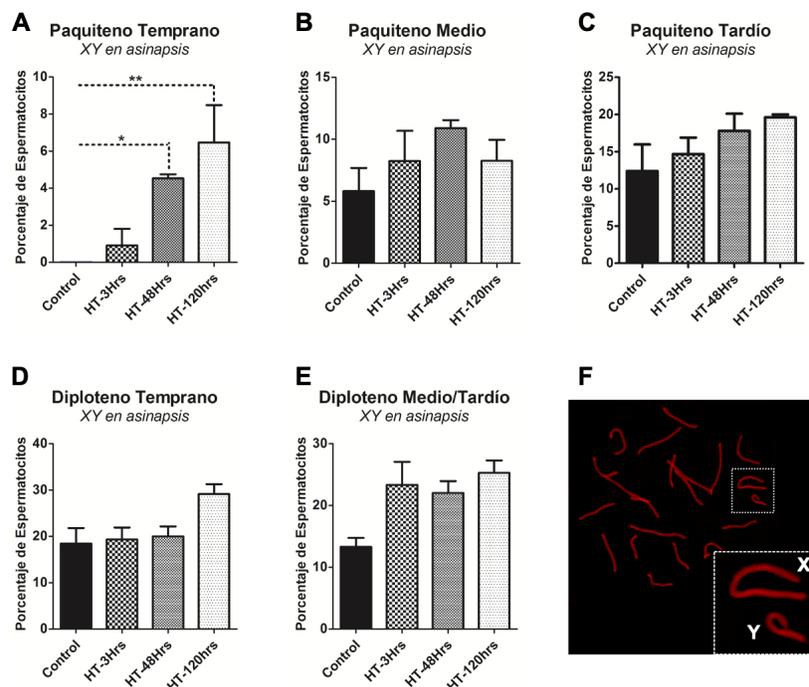


Figura 15. Cuantificación de espermatocitos con defectos sinápticos en el PAR de cromosomas sexuales. (A-E) Análisis de varianza de una vía con post test de Dunnett. En cada gráfico los grupos de estudio se ordenan de izquierda derecha

como: Control, 3Hrs PHT, 48Hrs PHT y 120Hrs PHT. Barras de error indican desviación estándar. * $p=0.0078$, ** $p<0.0001$. (F) Microfotografía de inmunofluorescencia contra SYCP3, de espermatozoides en etapa de Paquiteno temprano con XY en asinapsis.

III. Efectos de la hipertermia en la progresión de la Profase I

En las **Tablas 3, 4, 5 y 6** se indican los tamaños muestrales tanto de los grupos controles, como grupos experimentales, para cada una de las 4 modificaciones post-traduccionales de histonas analizadas. Estos fueron sometidos a test estadísticos para determinar si existen diferencias temporales en la progresión de las etapas tardías de la meiosis producto de la hipertermia, respecto al grupo control.

En la **Figura 16** se observa que los cambios más significativos se encontraron en la etapa de Paquiteno medio, específicamente a las 48 ($p=0.0006$) y 120Hrs PHT ($p=0.0002$), con una disminución de 31.2% y 36.1%, respectivamente. También se detectaron disminuciones significativas en el número de espermatozoides analizados en la etapa de Paquiteno tardío a las 120Hrs PHT ($p=0.01$), y en Diploteno temprano a las 48 ($p=0.0092$) y 120Hrs PHT ($p=0.01$).

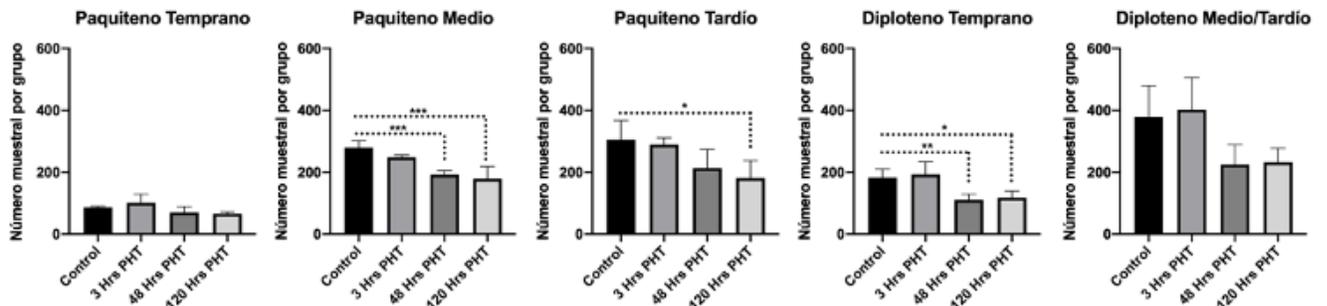


Figura 16: La hipertermia disminuye el número de espermatocitos. Análisis de varianza de una vía con post test de Dunnett. En cada gráfico los grupos de estudio se ordenan de izquierda a derecha como: Control, 3Hrs PHT, 48Hrs PHT y 120Hrs PHT. Barras de error indican desviación estándar. *** $p < 0.001$, ** $p = 0.0092$, * $p = 0.01$.

Estos resultados sugieren que podría existir un arresto de los espermatocitos, particularmente en la etapa de Paquiteno medio, pudiendo esta etapa ser más sensible a la hipertermia y dichos espermatocitos podrían experimentar apoptosis producto de la alta temperatura testicular.

DISCUSIÓN

El conocimiento de los efectos de la hipertermia testicular transitoria sobre las modificaciones epigenéticas que determinan el establecimiento del silenciamiento meiótico de los cromosomas sexuales, proceso fundamental para la producción de gametos funcionales, contribuye a caracterizar de mejor manera los mecanismos involucrados en la creciente infertilidad idiopática y la disminución sostenida en el recuento de espermatozoides durante los últimos 40 años (4-6, 10). El aumento de la temperatura testicular, causado por una diversidad de factores ambientales (77, 78), disminuye la producción y calidad de espermatozoides, afectando así la fertilidad masculina (14). Los espermatocitos y espermátidas redondas son vulnerables al estrés térmico y responden mediante la apoptosis celular (30, 42, 79), acumulación de daño en el DNA y modificación de la expresión génica, que podría perjudicar los procesos espermatogénicos normales (29, 33, 35). Sin embargo, los mecanismos involucrados que median estos defectos en las células germinales no se conocen por completo. Esto justifica más estudios genéticos y epigenéticos para dilucidar a cabalidad las vías que regulan las respuestas frente al estrés térmico de las células germinales masculinas. La comprensión de los mecanismos moleculares en respuesta al estrés térmico testicular podría contribuir a desarrollar terapias de infertilidad masculinas y nuevas opciones de anticoncepción.

El estudio de la epigenética ofrece una importante ventana para entender las interacciones del ambiente con el genoma, su contribución a la etiología de una diversidad de enfermedades y la potencial manipulación de dichas interacciones para

mejorar la salud humana. Asimismo, permite entender como las células germinales se adaptan a variaciones ambientales y como éstas posteriormente influyen en la evolución de la especie.

Bajo este contexto, en el presente estudio se evaluaron 4 marcadores de modificaciones post-traduccionales de histonas mediante inmunocitoquímica (γ H2AX, H3K9me3, UbiH2A y H3K4me1) permitiendo determinar los efectos del aumento de la temperatura transitoria en la reprogramación epigenética de los cromosomas sexuales durante la meiosis.

En ratones, se ha descrito que la apoptosis de espermatocitos comienza entre las 4-8 horas posteriores a la hipertermia testicular (29, 36, 42). Por esta razón, el primer tiempo de sacrificio, 3 horas PHT testicular, permitió evaluar cambios en las modificaciones post-traduccionales de histonas asociados a la reprogramación epigenética de los cromosomas sexuales inmediatamente posteriores a la hipertermia y previos al establecimiento de la respuesta apoptótica en espermatocitos. Diversos estudios han establecido que el *peak* de apoptosis luego de un estrés térmico a 42°C ocurre a las 24 horas post-hipertermia testicular (28, 29, 35), por lo que a las 48 horas PHT, las células presentes en el testículo corresponden a células sobrevivientes a la apoptosis masiva causada por el aumento transitorio de temperatura. Finalmente, el análisis luego de 120 horas (5 días) posterior al estrés térmico permite determinar las consecuencias de la hipertermia testicular en células que no experimentaron apoptosis y que progresaron a una etapa más avanzada de la profase I/espermatogénesis. El plan experimental utilizado

permitió evaluar la presencia y temporalidad de diferentes modificaciones post-traduccionales de histonas involucradas en MSCI durante Paquiteno y Diploteno. De esta manera, se determinó si estos marcadores epigenéticos son afectados por la hipertermia testicular y si los eventuales cambios en el epigenoma logran progresar a estados post-meióticos, pudiendo contribuir a la memoria epigenética de las células germinales maduras que posteriormente pueden ser transmitidas a la descendencia.

El tamaño muestral total de los tiempos 48 horas y 120 horas post hipertermia (**Tabla 3, 4, 5, 6 y Figura 16**) disminuyó entre el 31.2% al 41.3% respecto al control, siendo esta disminución particularmente significativa en la etapa de Paquiteno Medio, lo que está en concordancia con lo descrito en la literatura (13), puesto que se ha observado una disminución sostenida en el número de espermatozoides en el epidídimo comenzando a las 24 horas post hipertermia testicular (35°C), con una reducción más acentuada a los 14 días PHT.

Las causas de esta reducción en el número de espermatozoides motiles y, por ende, la disminución transitoria en la fertilidad en los 14 días posteriores a un episodio de estrés térmico (14), aún no son del todo claras. Sin embargo, se ha descrito que fallas en el apareamiento entre los cromosomas sexuales durante la etapa meiótica de la espermatogénesis, se asocian con infertilidad en ratones y en humanos, debido a que se gatilla la muerte celular por apoptosis de los espermatocitos (80). Así, la presencia de bivalentes X-Y disociados en espermatocitos producto de la hipertermia contribuiría a la infertilidad transitoria.

Los cromosomas sexuales permanecen sinaptados durante las etapas de Paquiteno y Diploteno de la profase I, sólo a través de la región PAR, que es el único sitio donde presentan homología y es donde se lleva a cabo el único *crossover* entre ambos cromosomas. En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas entre el control y el grupo de estudio 3 horas PHT de bivalentes X-Y asinápticos, pero sí se encontraron diferencias significativas en los grupos de 48 horas PHT y 120 horas PHT en la etapa de Paquiteno temprano (**Figura 15**). Al momento de la hipertermia, los espermatocitos analizados en los tiempos 48 y 120 horas PHT se encontraban en las etapas de Espermatogonias tardías y Lepto/Zigoteno, respectivamente, células que presentan menos susceptibilidad a la hipertermia (31). De este modo, la presencia de cromosomas sexuales asinápticos en etapas tempranas podría sugerir que existe un retraso en la formación del MSCI producto de la temperatura, pero que este no afecta la sobrevivencia de los espermatocitos. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir del análisis del número muestral (**Figura 16**) podrían indicar lo opuesto: entre las etapas de Paquiteno temprano y medio existe un checkpoint que previene la progresión de espermatocitos que no han completado la sinapsis y recombinación correctamente (81, 82), por lo que debido a la presencia de X-Y asinápticos en Paquiteno temprano a las 48 y 120Hrs PHT, podrían explicarse las disminuciones en el tamaño muestral en estos mismos grupos en la siguiente etapa de Paquiteno medio.

Lo anterior se condice con los resultados obtenidos a través del análisis del marcador de modificación post-traduccional γ H2AX, cuya persistencia en la cromatina de los cromosomas sexuales, gatilla su silenciamiento y la formación del cuerpo sexual (52) (**Figura 3**). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la

temporalidad y localización sub-celular de esta histona fosforilada en ningún grupo de estudio respecto al control (**Figura 6 y 16A**). No obstante, sí se encontraron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia de γ H2AX a las 48 y 120 horas PHT, durante Paquiteno tardío y Diploteno temprano (**Figura 6 y 16A**). Estos hallazgos indican que podría haber un cambio en la cantidad relativa de esta modificación post-traducciona, o bien, que la compactación de la cromatina en dichas sub-etapas y grupos de estudio, podría estar siendo alterada por la temperatura.

En el primer caso, a las 48hrs PHT, al momento de la hipertermia estas células se encontraban en estadios más tempranos, como Paquiteno temprano y medio (**Figura 4**), pudiendo implicar que procesos como la sinapsis de los cromosomas sexuales o la propia formación del MSCI podría ser afectada por el aumento de temperatura testicular transitoria. En tanto, a las 120hrs PHT, las células donde se hallaron aumentos significativos de fluorescencia, al momento de la hipertermia se encontraban en etapas de Lepto-Zigoteno y Paquiteno temprano (**Figura 4**), sugiriendo que procesos previos a la formación del MSCI, como la recombinación y la persistencia de DSBs, eventualmente podrían ser afectados por la temperatura e influir en las posteriores modificaciones post-traduccionales que posibilitan el silenciamiento de los cromosomas sexuales durante la meiosis.

Con respecto a los resultados obtenidos a partir del análisis del marcador H3K9me3 (**Figura 8 y 16B**), asociado a represión transcripcional y formación de heterocromatina, se encontraron cambios significativos en la temporalidad a las 48 y 120 horas PHT en estadios de Paquiteno tardío y Diploteno temprano, donde la

marca de esta modificación post-traducciona persiste en la cromatina del cromosoma Y, cuando debería estar presente únicamente en la heterocromatina pericentromérica del cromosoma X. Aunque el patrón de localización y temporalidad no se vio afectado a las 3 horas PHT, sí se hallaron diferencias de H3K9me3 al cuantificar la intensidad de fluorescencia, donde se encontraron resultados significativos en los 3 grupos de estudio, en las etapas de Paquiteno medio, Paquiteno tardío y Diploteno temprano (**Figura 9 y 16B**). Al analizar las 3hrs PHT, que por la brevedad del tiempo transcurrido luego del estímulo, las células analizadas no han progresado ninguna etapa en la profase I, se podría inferir, y similar a la persistencia y aumento de señal de γ H2AX en la cromatina sexual, como se discutió anteriormente, que eventualmente se establezca una respuesta inmediata frente al aumento de temperatura por parte de proteínas modificadoras de histonas y, en consecuencia, del epigenoma de espermatoцитos, que en este caso, permitía la heterocromatinización y compactación de la cromatina sexual por parte de H3K9me3.

Los resultados significativos obtenidos en el cambio del patrón de marcación de H3K9me3 en los espermatoцитos evaluados a las 48Hrs PHT en las etapas de Paquiteno tardío y Diploteno temprano (**Figura 8 y 16B**), dan cuenta de la importancia de la temporalidad de los mecanismos que participan en la formación del MSCI, que comienza en la etapa de Paquiteno temprano y se establece en la etapa de Paquiteno medio. Los espermatoцитos en etapas de Paquiteno tardío y Diploteno temprano se encontraban en las etapas de Paquiteno temprano y Paquiteno medio, respectivamente, mientras que los espermatoцитos en la etapa de Diploteno Medio/Tardío, que no presentaron alteraciones significativas, se encontraban en la

etapa de Paquiteno tardío. Mediante los resultados obtenidos, y en concordancia con la literatura (30, 42, 79), se puede inferir que la etapa de Paquiteno medio, etapa donde ocurre el *check point* meiótico (81, 82), es particularmente susceptible al aumento de temperatura, y que la hipertermia podría alterar el establecimiento del MSCI. En tanto, la etapa de Paquiteno tardío podría ser menos sensible a la temperatura, ya que el establecimiento del MSCI ocurrió en la etapa anterior, y esta podría ser la razón de la ausencia de cambios en el patrón de marcación de H3K9me3 obtenidos en la etapa de Diploteno tardío. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia arrojó un aumento en la cantidad de H3K9me3 en las etapas de Paquiteno medio, tardío y Diploteno temprano, dando cuenta que etapas previas como la sinapsis de los cromosomas sexuales y la formación del MSCI en Paquiteno medio son más sensibles a los cambios térmicos y generan una respuesta del epigenoma.

En tanto, a las 120hrs PHT los espermatoцитos que presentaron diferencias significativas en la temporalidad y aumentos en la intensidad de fluorescencia de H3K9me3, en etapas de Paquiteno tardío y Diploteno temprano, se encontraban en las etapas de Lepto-Zigoteno y Paquiteno temprano, respectivamente al momento del estrés térmico (**Figura 4**). Estos resultados podrían indicar que procesos propios de etapas meióticas tempranas, como reparación de DSBs programados del DNA, podría influir en la persistencia de H3K9me3 en el cromosoma Y, y en la posible anticipación de la condensación de los cromosomas sexuales a las 120hrs PHT.

Estos resultados podrían indicar que los posibles defectos ocurridos en etapas tempranas producto del incremento de la temperatura testicular transitoria, como aumentos de daño en el DNA (13, 31, 33) y/o disociación de bivalentes XY (20, 40), podría inducir un efecto de anticipación en la condensación de la cromatina de los cromosomas sexuales, lo cual eventualmente podría contribuir a la sobrevida de estos espermatocitos.

A continuación, se analizaron los posibles cambios encontrados en la mono-ubiquitinación H2A K119ub, cuya presencia es redundante a la acción represiva de la poli-ubiquitinación H2A, pero por otro lado su ausencia contribuye a regular la transcripción de genes que escapan al MSCI. RNF8 es la ubiquitin ligasa que media la ubiquitinación en cromosomas sexuales meióticos, pero en genes que escapan a la inactivación transcripcional y que son necesarios para la correcta diferenciación de espermatidas y maduración de espermatozoides, la proteína SCML2 reprime la acumulación de H2A K119ub en promotores y *enhancers* de dichos genes, permitiendo a su vez reclutar histona-metiltransferasas y acetilasas que durante la espermiogénesis permitirán nuevos cambios epigenéticos como H3K4me2, H3K4me3, H4K20me1 y H3K27ac en espermatidas redondas (83).

Respecto a los resultados obtenidos del análisis cualitativo de H2A K119ub, cuya presencia se asocia a daño en el DNA o silenciamiento transcripcional, mientras que su ausencia en promotores y/o *enhancers* de los cromosomas sexuales indica activación transcripcional, sólo se observaron disminuciones significativas en la localización de esta modificación en las etapas de Diploteno, tanto temprano como

medio/tardío, a las 48hrs y 120hrs post-hipertermia (**Figura 10 y 16C**). A las 48hrs PHT las células que presentaron variaciones en etapas de Diploteno temprano y Diploteno medio/tardío, se encontraban en los estadios de Paquiteno medio y Paquiteno tardío, respectivamente, al momento de la hipertermia; mientras que a las 120hrs PHT, donde también se halló una disminución significativa de esta modificación en los estadios de Diploteno temprano y medio/tardío, estos espermatoцитos se encontraban en etapa de Paquiteno temprano y Paquiteno medio, respectivamente. Además, el análisis de intensidad de fluorescencia arrojó diferencias significativas en todos los estadios analizados a las 48hrs PHT, pero sólo en las etapas de Paquiteno temprano, medio y tardío a las 120hrs PHT (**Figura 11 y 16C**).

Se ha descrito que a partir de Paquiteno medio, luego de que todos los DSBs programados necesarios para la recombinación genética hayan sido reparados, comienza nuevamente la actividad transcripcional global a partir de todos los autosomas y de los genes que escapan al MSCI en los cromosomas sexuales (74). Esta alta actividad transcripcional se mantiene hasta Diploteno y es donde se expresan los genes necesarios para la correcta progresión y conclusión de la meiosis, y de la espermiogénesis, con la diferenciación de espermátidas y maduración de espermatozoides (56, 65). Por lo tanto, una alteración en el epigenoma del MSCI podría desregular expresión de genes que escapan al silenciamiento meiótico de los cromosomas sexuales y que son fundamentales para el correcto desarrollo y maduración de las células post-meióticas.

Los resultados obtenidos a partir del marcador H2A K119ub, y de acuerdo con la función de esta, indican que los genes que escapan al MSCI no serían los afectados, sino los genes silenciados en este proceso debido a la ausencia de este marcador en etapas tardías a las 48hrs y 120hrs PHT, al igual que la disminución de intensidad relativa a las 48hrs PHT en todos los estadios de la Profase I analizados y en la etapa de Paquiteno a las 120hrs PHT.

A pesar de que los resultados obtenidos luego del análisis de H2A K119ub sugieren que la hipertermia afecta el silenciamiento transcripcional, esto al mismo tiempo indicaría que, al menos con este marcador, los genes que escapan al MSCI y que son necesarios para la correcta progresión de la espermatogénesis y espermiogénesis restantes, no se estarían viendo afectados, lo que podría actuar como un factor de sobrevivencia para las células germinales.

Por otro lado, respecto a los resultados significativos obtenidos en la temporalidad y localización de la marcación fluorescente de H3K4me1 en todos los tiempos (**Figura 14 y 16D**), destacan la importancia de la etapa de Paquiteno medio en la formación del MSCI, así como la sensibilidad que presenta dicha etapa frente a los cambios térmicos. Además, mediante la cuantificación de intensidad de fluorescencia se encontraron diferencias significativas en todos los tiempos. Particularmente los resultados de las etapas de Paquiteno temprano y medio, a las 3hrs, 48hrs y 120hrs PHT, se condicen con los datos encontrados respecto a la disociación de bivalentes X-Y en la etapa de Paquiteno temprano (**Figura 15**), de modo que este posible aumento de marcadores de compactación y represión transcripcional, como la

H3K9me3 y H3K4me1, podría responder a la disociación de bivalentes X-Y, con el fin de asegurar la sinapsis, condensación y silenciamiento de los cromosomas sexuales durante el MSCI. Del mismo modo, el aumento en la intensidad de fluorescencia en etapas más tardías, como Paquiteno tardío y Diploteno, luego de 48hrs y 120hrs del estrés térmico está en concordancia con lo encontrado a través de la cuantificación de fluorescencia de H3K9me3. Lo anterior puede apuntar a una cascada de respuestas de modificaciones post-traduccionales como consecuencia de la hipertermia, por ejemplo, al retrasarse o verse impedida la sinapsis de los cromosomas sexuales en etapas tempranas, el epigenoma de estos mismos cromosomas podría responder sobre-expresando marcas de silenciamiento transcripcional y de formación de heterocromatina como lo son H3K4me1 y H3K9me3, respectivamente, asegurando así la apropiada formación, establecimiento y mantención del MSCI, evitando la apoptosis de aquellos espermatoцитos expuestos a hipertermia y aumentando la sobrevivencia de las células germinales.

Se ha descrito que el epigenoma de los espermatoцитos es fundamental en etapas post-meióticas y en procesos cruciales para la correcta maduración de los espermatozoides, como el recambio de histonas por protaminas y la polaridad en espermátidas que dará origen a la correcta posición del acrosoma y la cola del espermatozoide maduro. Cambios en marcadores epigenéticos en espermatoцитos de ratones presentan espermátidas con morfologías aberrantes, desencadenando la apoptosis de estas células, o bien, la maduración de espermatozoides con alteraciones que disminuyen su capacidad de fertilización (84). De este modo, como la fertilidad masculina se evalúa no sólo por el número de espermatozoides, sino

también por su morfología y motilidad, estos resultados sugieren que la subfertilidad producto de la hipertermia testicular no sólo se debe a la disminución en el recuento de espermatozoides a causa de la apoptosis de espermatocitos, sino también producto de alteraciones en el epigenoma que tendrán un impacto en las etapas post-meióticas, que eventualmente puedan ser heredadas a las siguientes generaciones.

En este contexto, los resultados significativos hallados en las células post-meióticas con el marcador H3K4me1, particularmente en Metafases, indican que dichos mecanismos epigenéticos de adaptación ocurridos en etapas meióticas, pueden persistir y ser heredados a las células post-meióticas. Sin embargo, en la etapa de Metafase las células germinales se enfrentan al *checkpoint* propio de esta etapa (85), de modo que si los mecanismos que propician la correcta sinapsis entre los cromosomas sexuales a través de la región PAR y reforzados por los eventos ocurridos durante la formación y establecimiento del MSC1, se encuentran alterados producto de la hipertermia testicular, estas células podrían experimentar una segunda onda de apoptosis indirecta luego de la hipertermia. Esto podría explicar porqué no se detectaron variaciones en la intensidad de fluorescencia en Espermátidas redondas, inmediatamente posteriores a la etapa de Metafase: células con alteraciones en el epigenoma pueden estar experimentando apoptosis en la etapa de metafase y sólo las que no presentan cambios en el epigenoma asociado al MSC1 pueden progresar a Espermátidas y continuar la espermiogénesis.

CONCLUSIONES

En la presente investigación se exploraron las consecuencias del aumento de temperatura testicular transitorio en las modificaciones post-traduccionales de histonas que remodelan la cromatina de los cromosomas sexuales, contribuyendo a su silenciamiento durante la meiosis (MSCI), proceso crucial para la apropiada progresión de la meiosis masculina en mamíferos, a través de la caracterización cualitativa y semi-cuantitativa de la presencia de algunos de los principales marcadores involucrados en este proceso, como lo son γ H2AX, H3K9me3, H2A K119ub y H3K4me1.

Se pudo constatar que la hipertermia no incide en la dinámica temporal ni en la ubicación subcelular de γ H2AX durante la formación del MSCI, pero sí resulta en un aumento en la intensidad de fluorescencia a las 48 y 120 horas PHT, específicamente durante Paquiteno tardío y Diploteno temprano.

En lo que respecta H3K9me3, se verificó que la hipertermia cambia la dinámica temporal de H3K9me3 durante el MSCI en las etapas de Paquiteno tardío y Diploteno Temprano a las 48 y 120 horas post-estrés térmico, permaneciendo en la cromatina del cromosoma Y, cuando debería encontrarse ausente en dichas etapas. Además, se identificaron cambios en la intensidad de fluorescencia durante Paquiteno medio y tardío, y Diploteno temprano, en los tres grupos de estudio post-hipertermia.

Para H2A K119ub, la hipertermia disminuyó la presencia de H2A K119ub en todas las sub-etapas de Diploteno a las 48 y 120 horas post-hipertermia, reafirmado por una reducción en la intensidad de fluorescencia de H2A K119ub en la cromatina de los cromosomas sexuales, particularmente a las 48 horas PHT, en todos los estadios del MSCI y a las 120 horas PHT sólo en las tres sub-etapas de Paquiteno.

En tanto, y diferencialmente, la hipertermia aumentó la presencia de H3K4me1 en la etapa de Paquiteno medio a las 48 y 120 horas post-hipertermia, donde debería encontrarse ausente. Junto con ello, se halló un aumento la intensidad de fluorescencia de H3K4me1 a las 3 horas PHT únicamente en Paquiteno temprano, mientras que a las 48 y 120 horas aumenta la intensidad de fluorescencia en los cromosomas sexuales en todos los sub-estadios meióticos, junto a las metafases. Las espermátidas redondas no fueron afectadas por el aumento transitorio de temperatura en ninguno de los grupos de estudio.

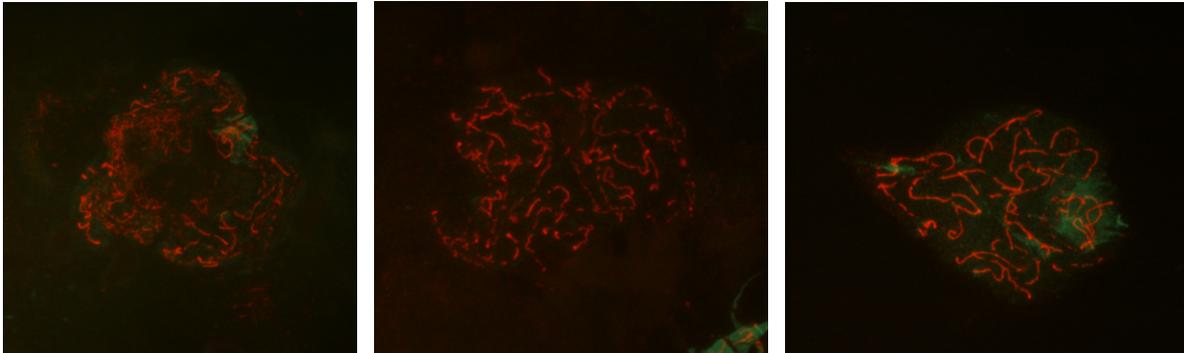
De esta forma, se concluye que la hipertermia transitoria incide en las modificaciones post-traduccionales de histonas que hacen posible la formación, establecimiento y mantención del MSCI durante la meiosis masculina, concentrándose los cambios observados a las 48 y 120 horas post-hipertermia, es decir, en espermátocitos que sobrevivieron al *peak* apoptótico.

Se requieren estudios complementarios para precisar si los cambios relativos en intensidad de fluorescencia son consecuencia de un cambio directo en la cantidad de modificaciones post-traduccionales de histonas, o bien, si son indicativos de

variaciones en la compactación de la cromatina. Del mismo modo, es necesario especificar desde qué punto se pueden ver afectadas cada una de las vías de señalización de las que son parte los marcadores analizados, y así estudiar en profundidad el impacto de los cambios en el epigenoma asociado al MSCI de espermatocitos en células post-meióticas y en su maduración durante la espermiogénesis.

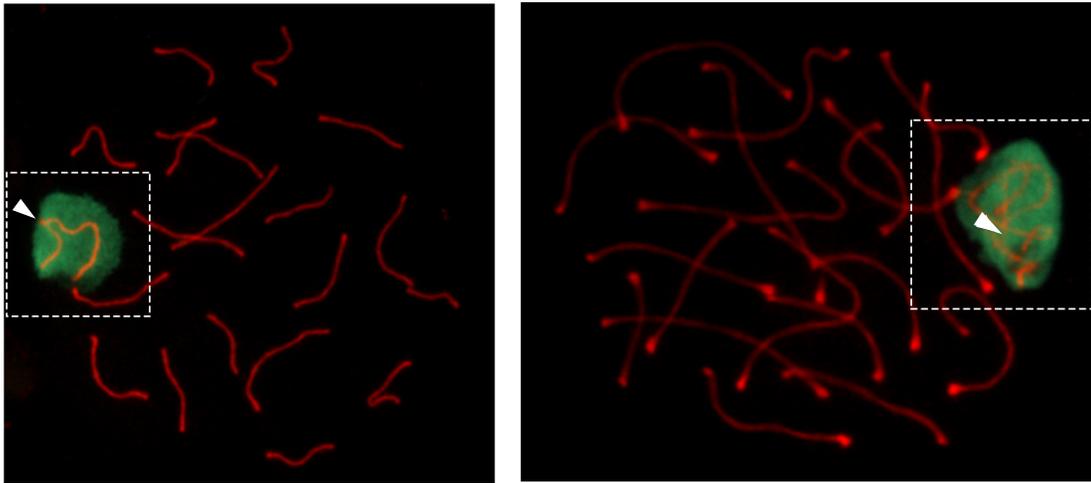
ANEXO 1: Imágenes referenciales.

- I. Microfotografía de espermatocitos con morfología apoptótica, descritos por Ayarza et al. 2016 (46), que no fueron considerados para el análisis:

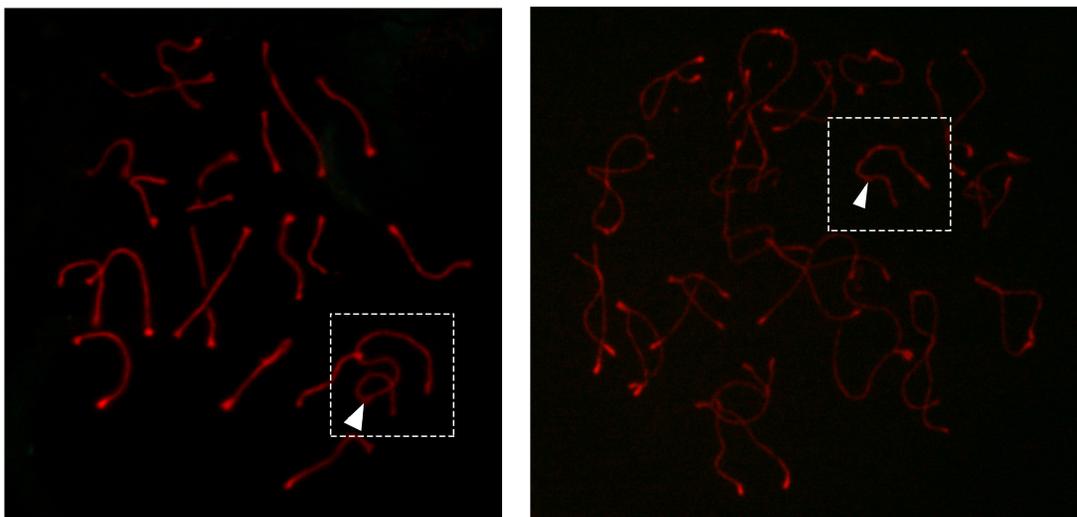


II. Ejemplos de clasificación de análisis cualitativo:

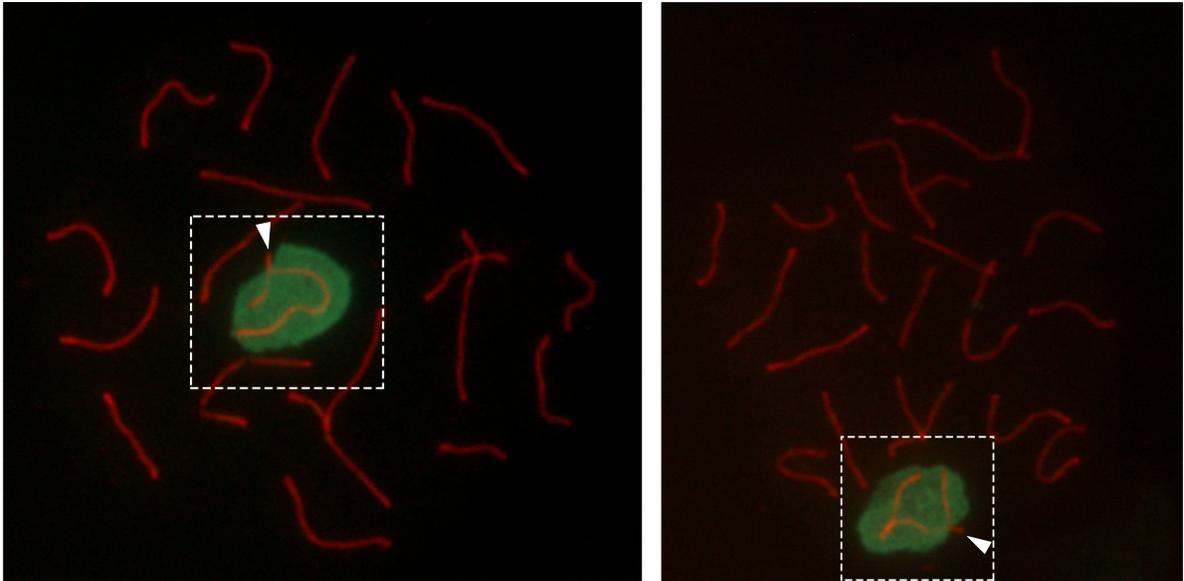
a) Espermatoцитos con presencia de modificación post-traducciona (γ H2AX) en X-Y (flechas blancas indican región PAR de XY):



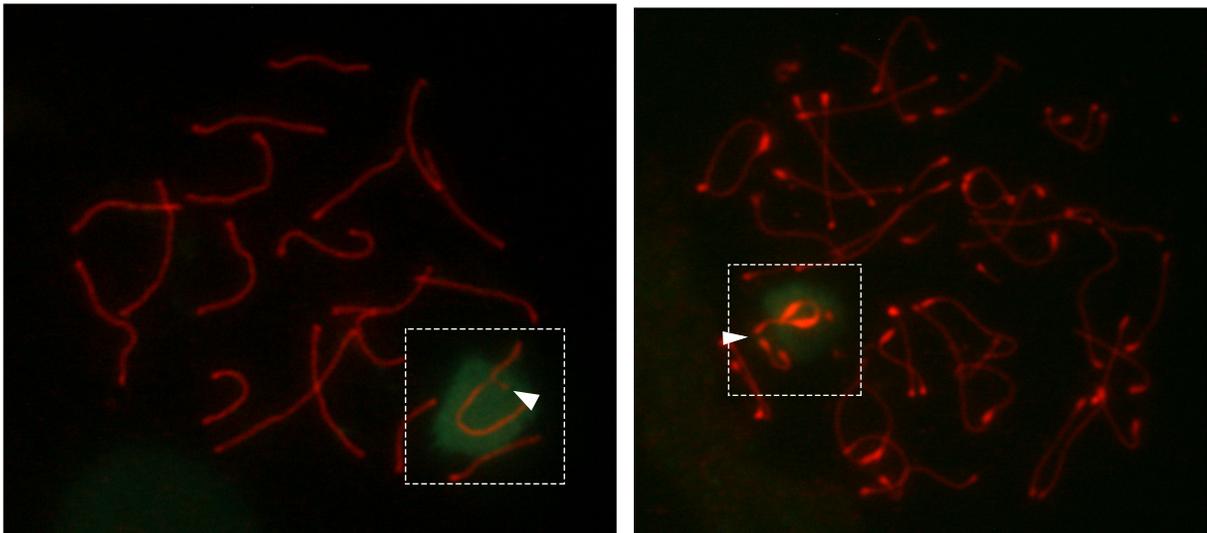
b) Espermatoцитos con señal ausente del marcador (γ H2AX) en X-Y (flechas blancas indican región PAR de XY):



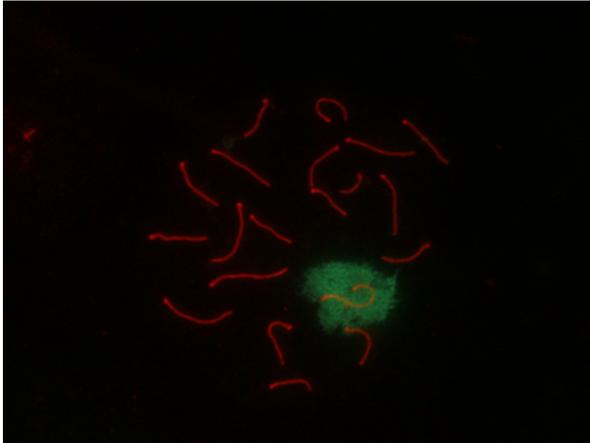
c) Espermatocitos con señal ausente del marcador (γ H2AX) en región PAR
(flechas blancas indican región PAR de XY):



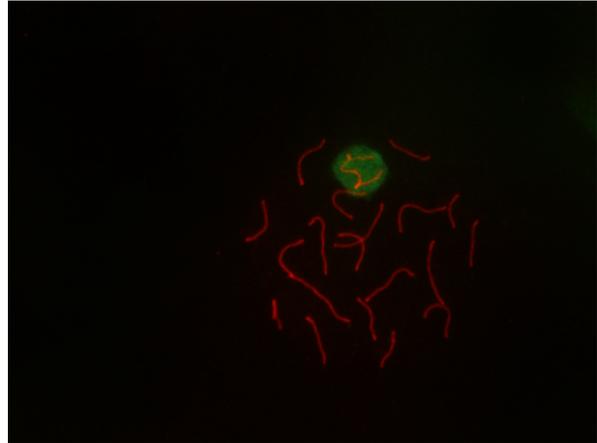
d) Espermatocitos con señal ausente del marcador (γ H2AX) en cromosoma Y
(flechas blancas indican región PAR de XY):



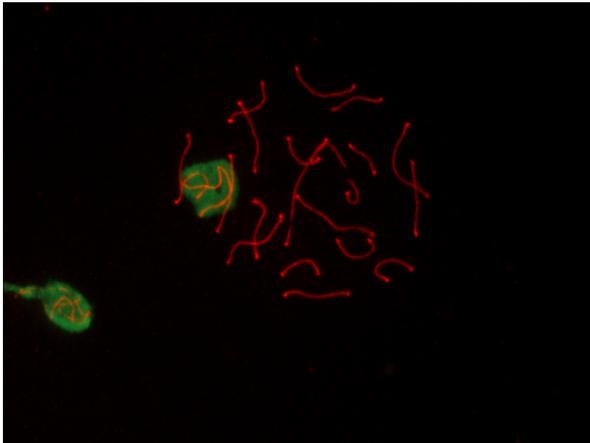
ANEXO 2: Microfotografías originales de figuras 5, 7, 9 y 11.



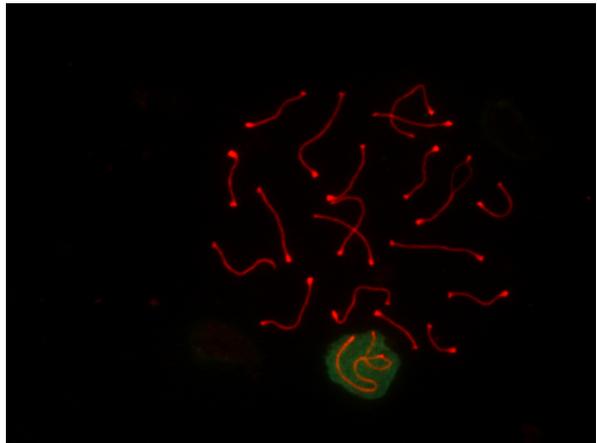
γ H2AX – Control – Paquiteno Temprano



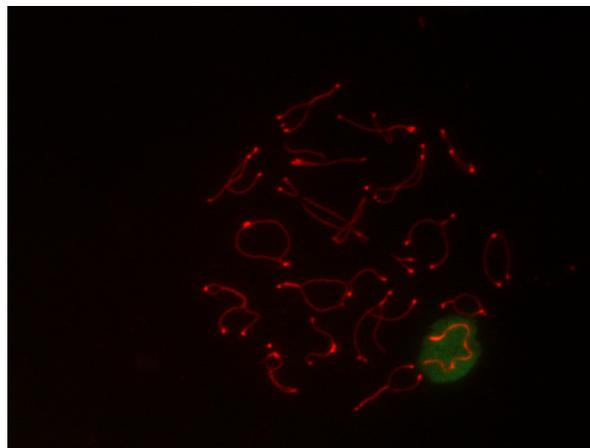
γ H2AX – Control – Paquiteno Medio



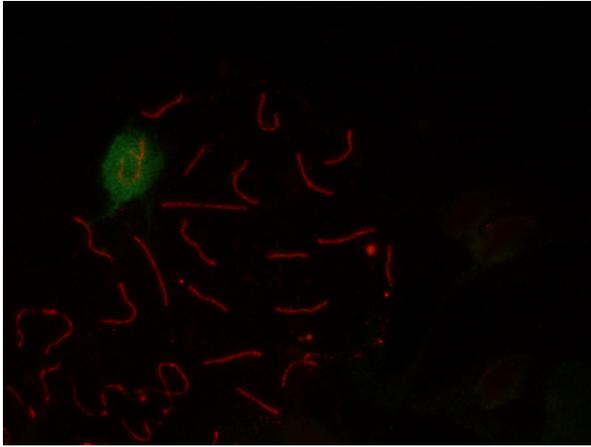
γ H2AX – Control – Paquiteno Tardío



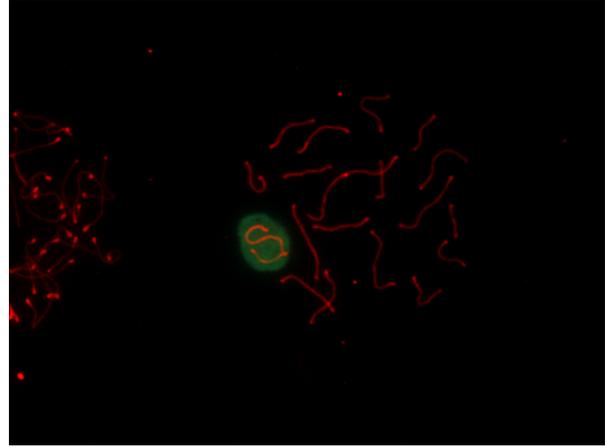
γ H2AX – Control – Diploteno Temprano



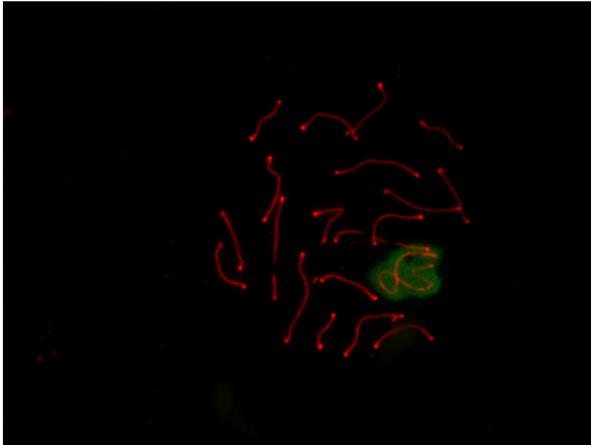
γ H2AX – Control – Diploteno Medio/Tardío



γ H2AX – 3H PHT – Paquiteno Temprano



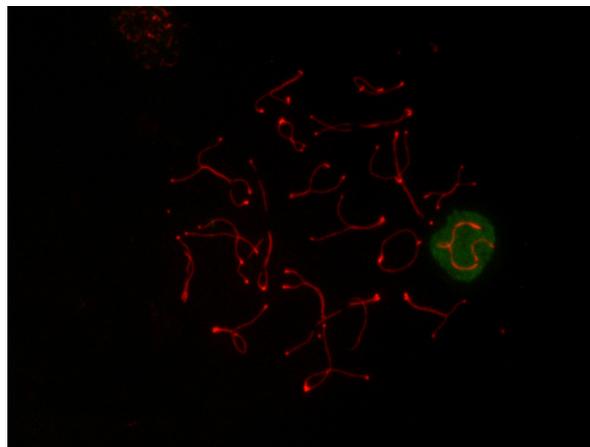
γ H2AX – 3H PHT – Paquiteno Medio



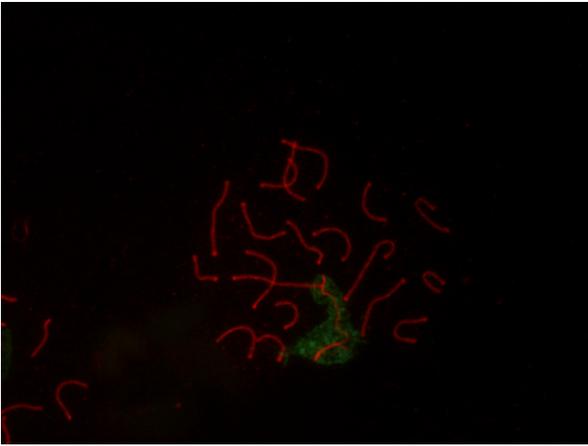
γ H2AX – 3H PHT – Paquiteno Tardío



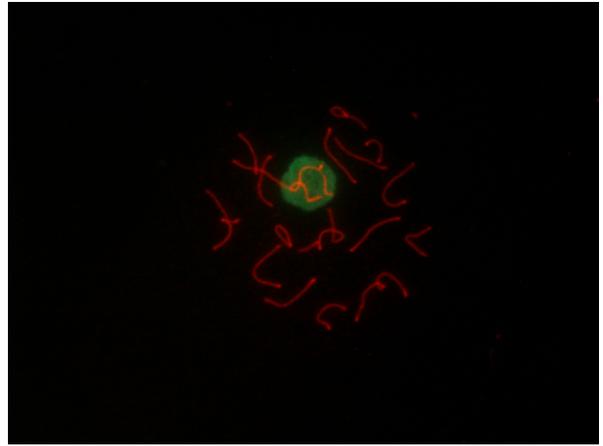
γ H2AX – 3H PHT – Diploteno Temprano



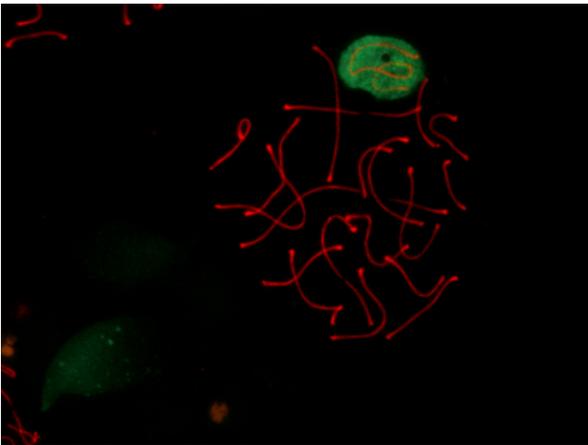
γ H2AX – 3H PHT – Diploteno Medio/Tardío



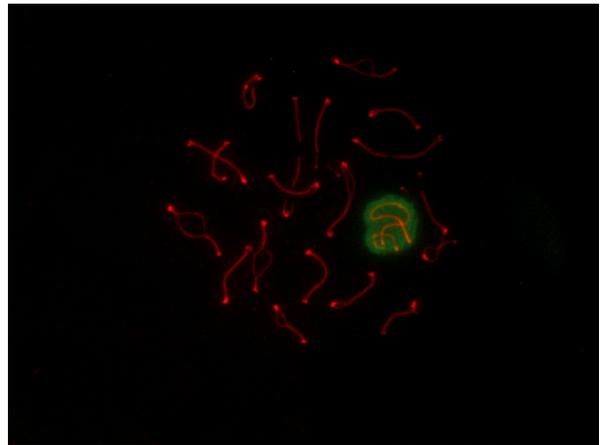
γ H2AX – 48H PHT – Paquiteno Temprano



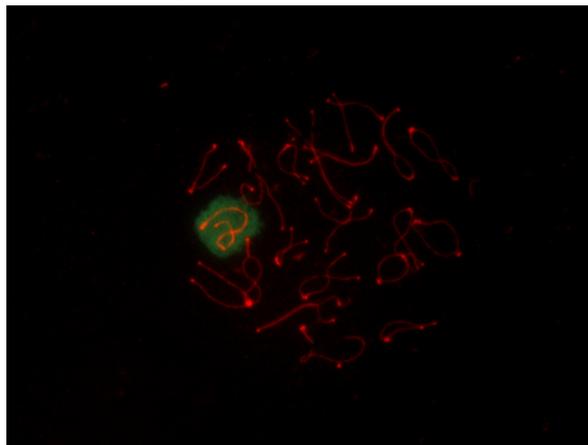
γ H2AX – 48H PHT – Paquiteno Medio



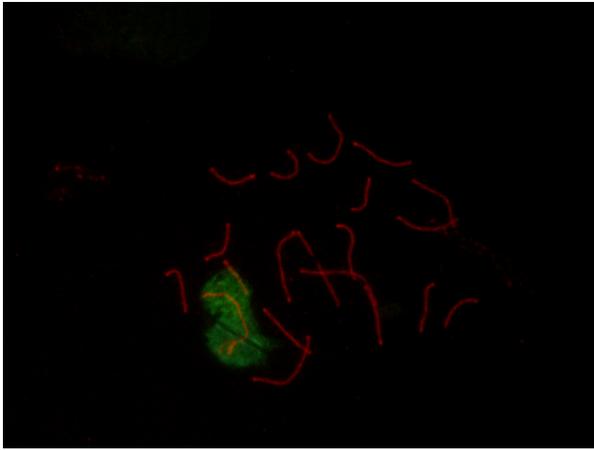
γ H2AX – 48H PHT – Paquiteno Tardío



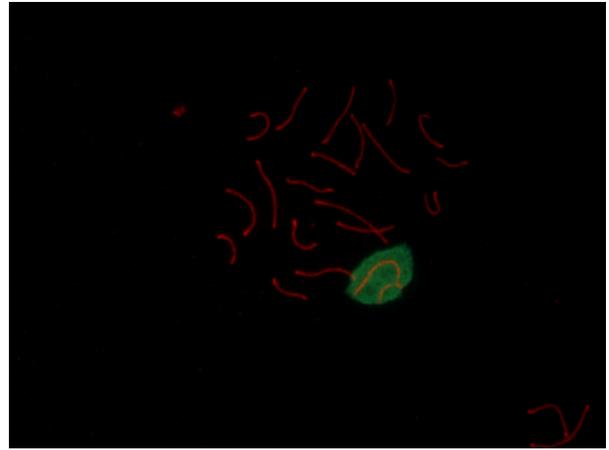
γ H2AX – 48H PHT – Diploteno Temprano



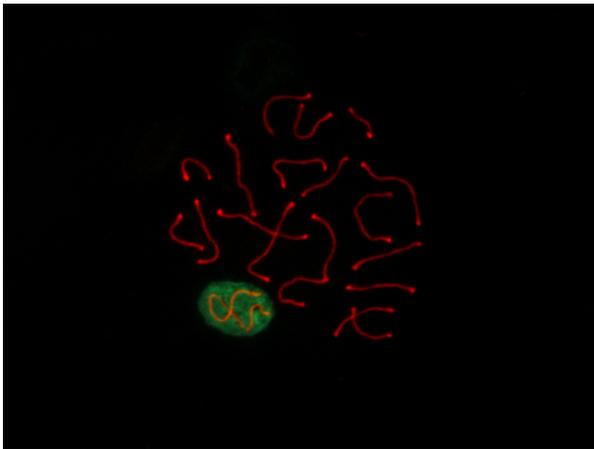
γ H2AX – 48H PHT – Diploteno Medio/Tardío



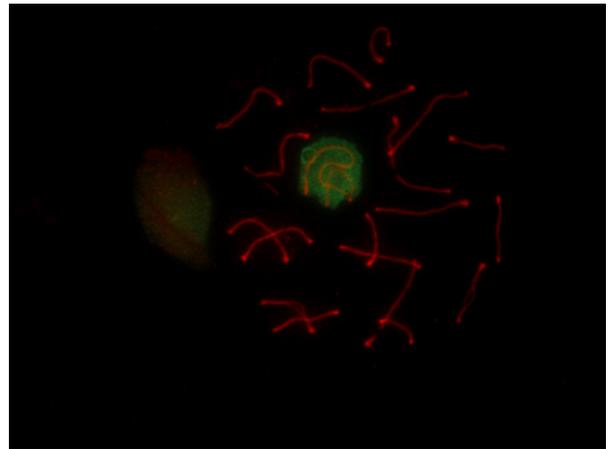
γ H2AX-120H PHT-Paquiteno Temprano



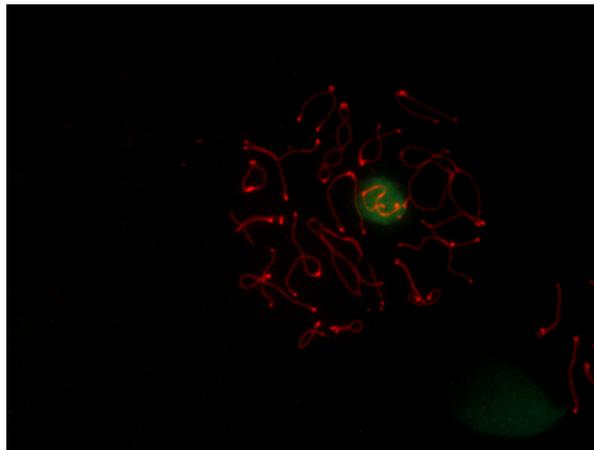
γ H2AX-120H PHT-Paquiteno Medio



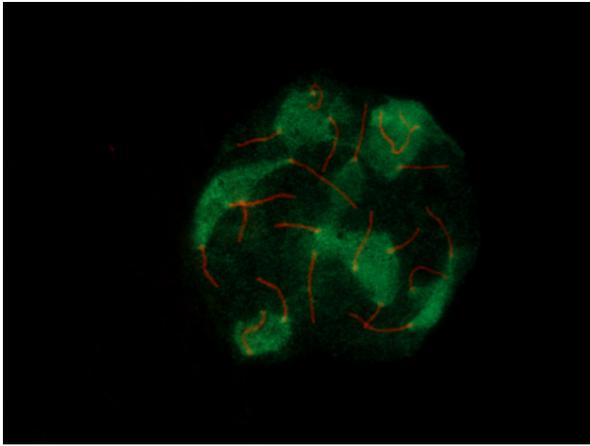
γ H2AX-120H PHT-Paquiteno Tardío



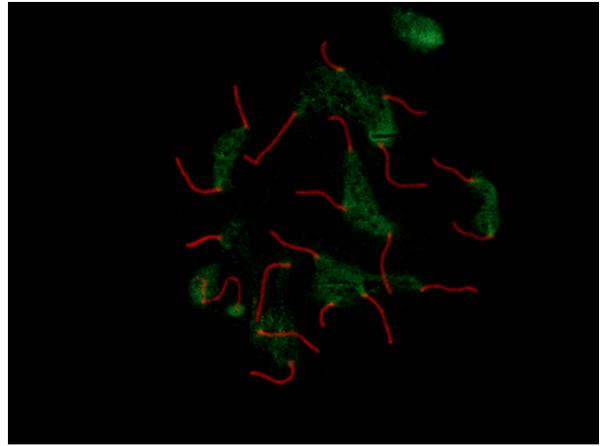
γ H2AX-120H PHT-Diploteno Temprano



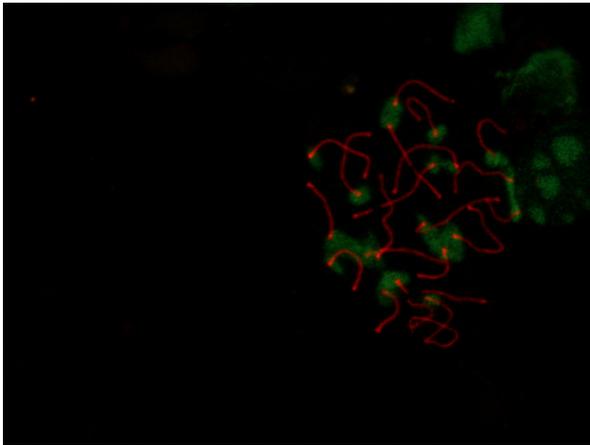
γ H2AX-120H PHT-Diploteno Medio/Tardío



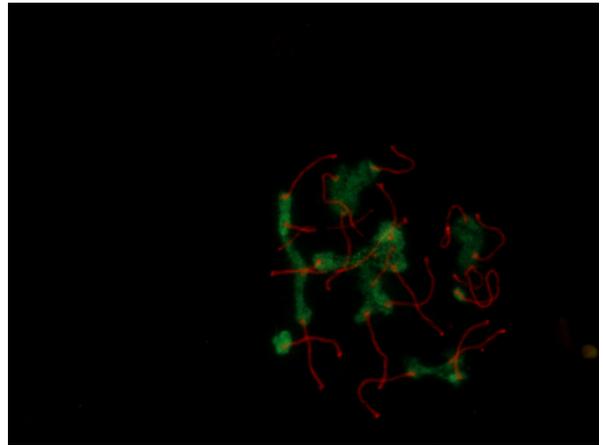
H3K9me3–Control–Paquiteno Temprano



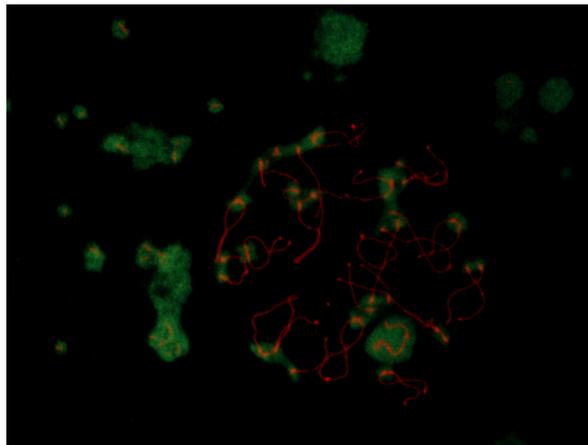
H3K9me3–Control–Paquiteno Medio



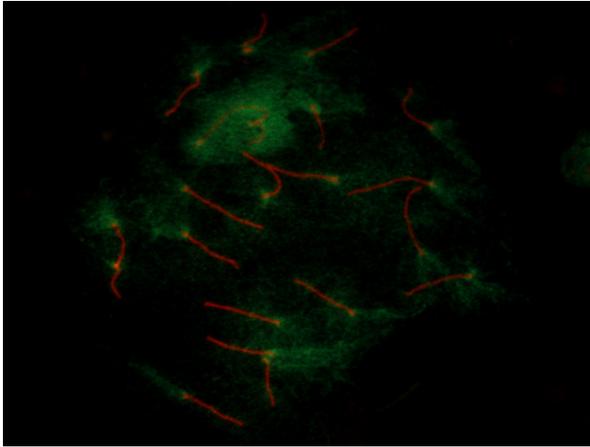
H3K9me3–Control–Paquiteno Tardío



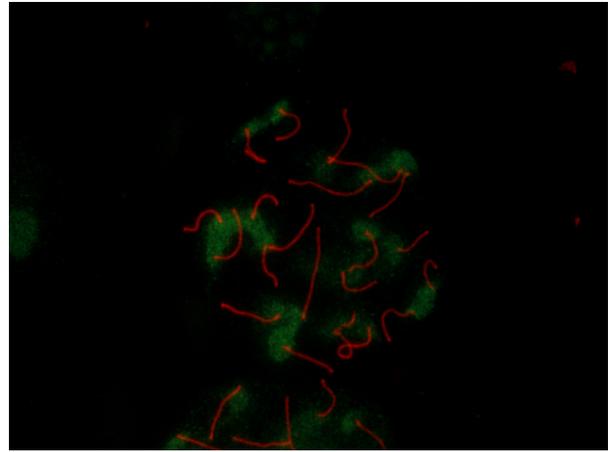
H3K9me3–Control–Diploteno Temprano



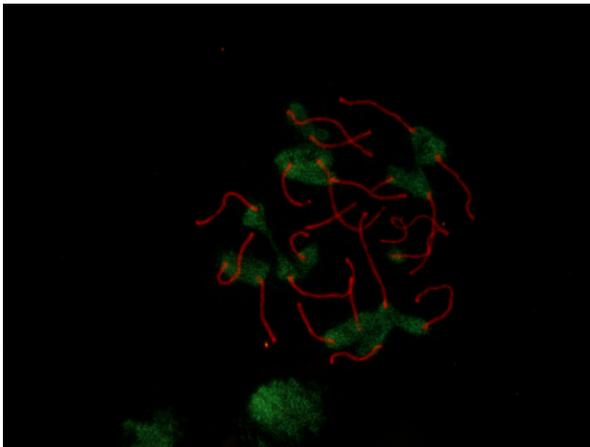
H3K9me3–Control–Diploteno Medio/Tardío



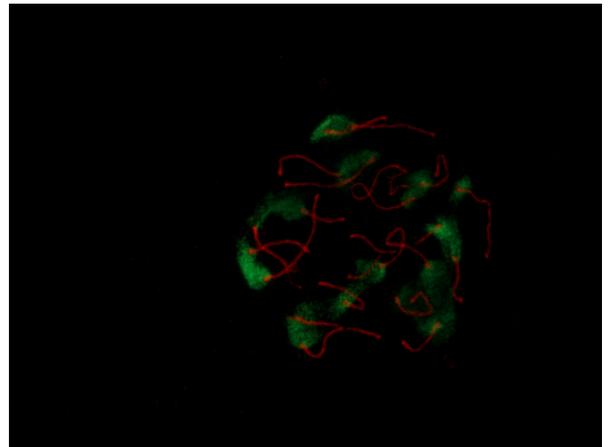
H3K9me3–3H PHT–Paquiteno Temprano



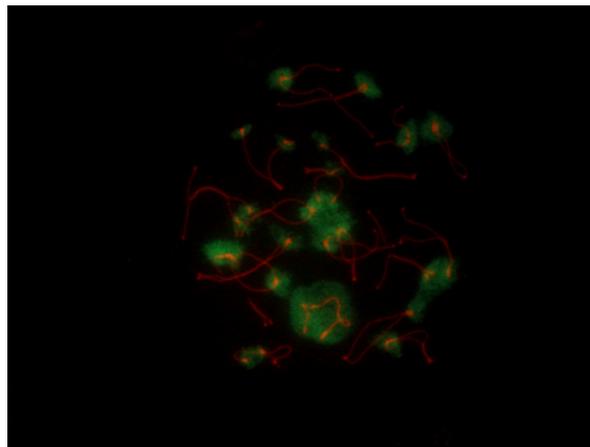
H3K9me3–3H PHT–Paquiteno Medio



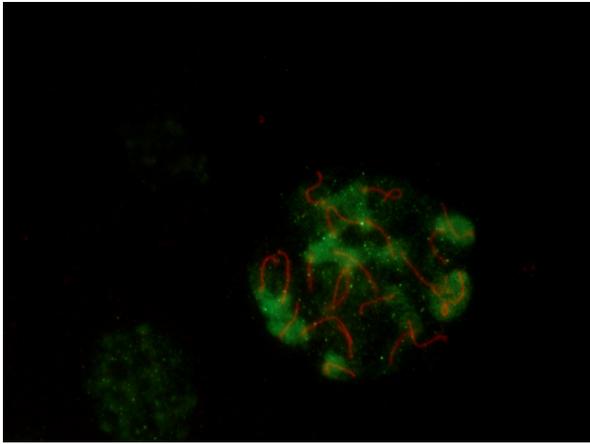
H3K9me3–3H PHT–Paquiteno Tardío



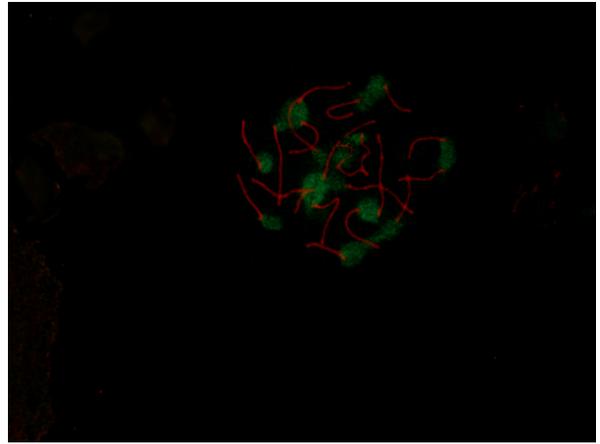
H3K9me3–3H PHT–Diploteno Temprano



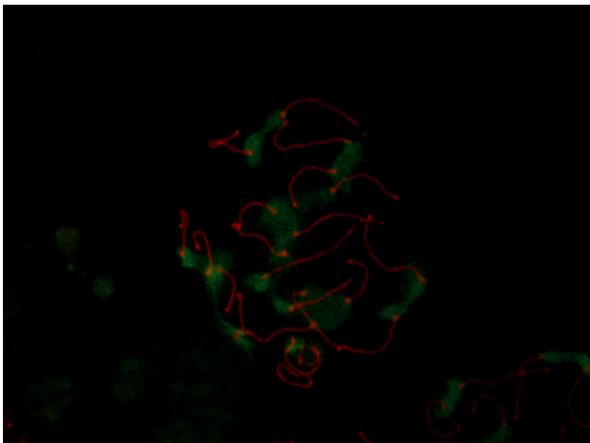
H3K9me3–3H PHT–Diploteno Medio/Tardío



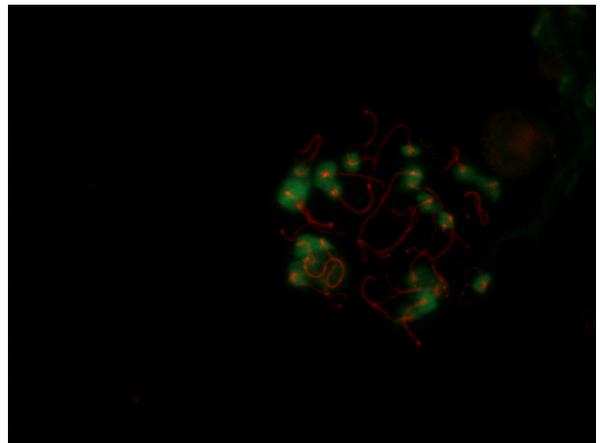
H3K9me3-48H PHT-Paquiteno Temprano



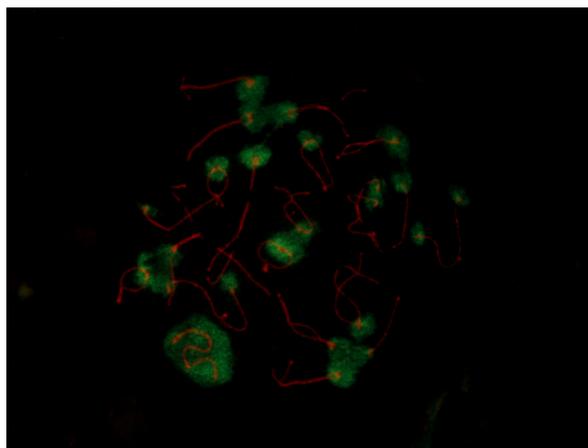
H3K9me3-48H PHT-Paquiteno Medio



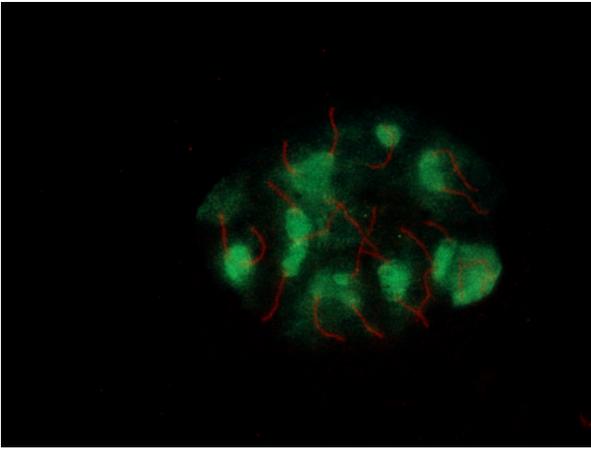
H3K9me3-48H PHT-Paquiteno Tardío



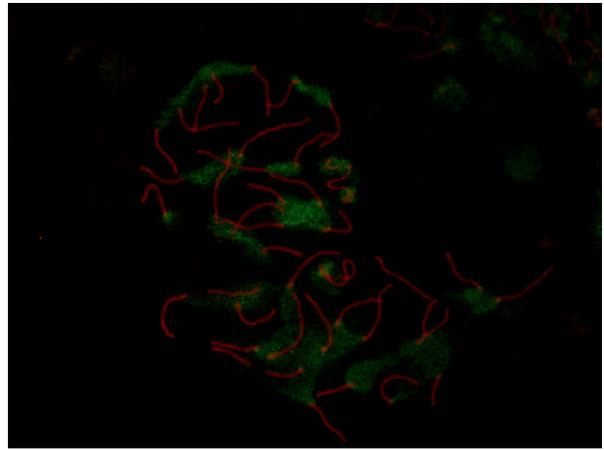
H3K9me3-48H PHT-Diploteno Temprano



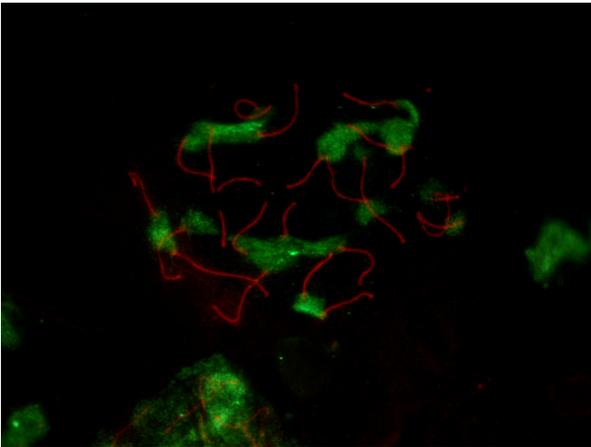
H3K9me3-48H PHT-Diploteno Medio/Tardío



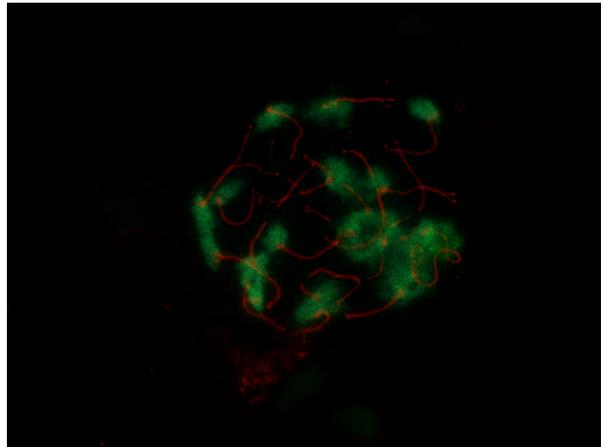
H3K9me3-120H PHT-Paquiteno Temprano



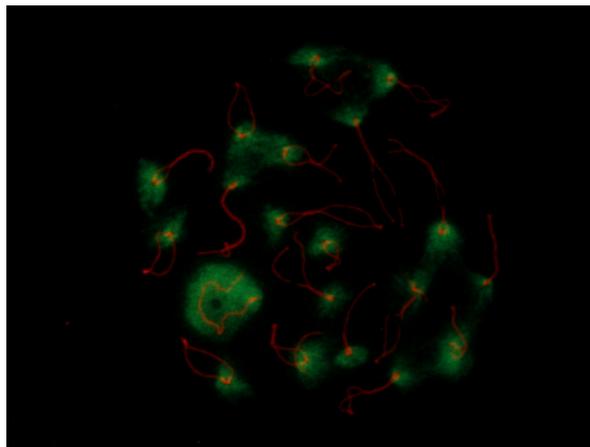
H3K9me3-120H PHT-Paquiteno Medio



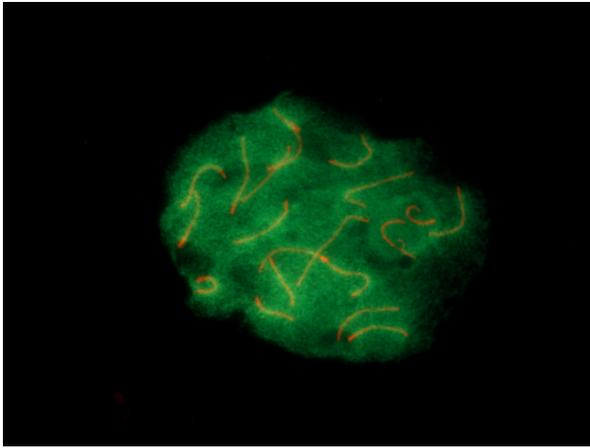
H3K9me3-120H PHT-Paquiteno Tardío



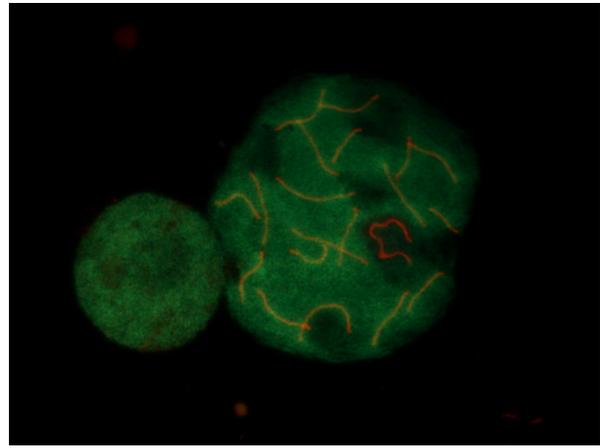
H3K9me3-120H PHT-Diploteno Temprano



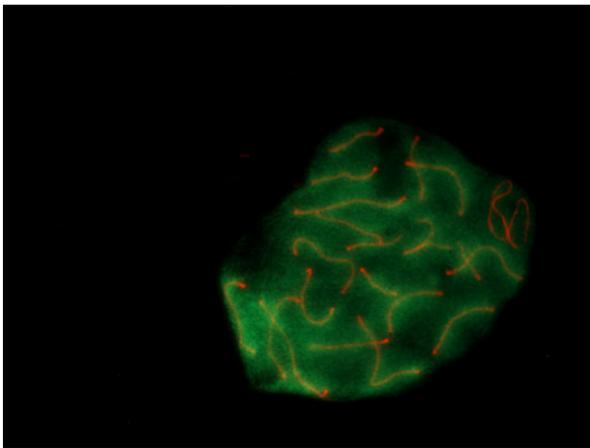
H3K9me3-120H PHT-Diploteno Medio/Tardío



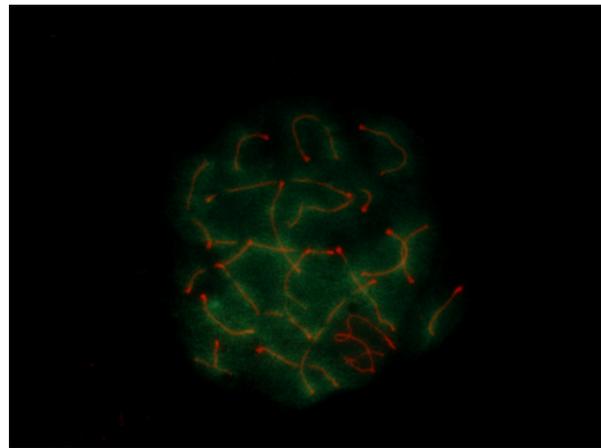
H2A K119ub–Control–Paquiteno Temprano



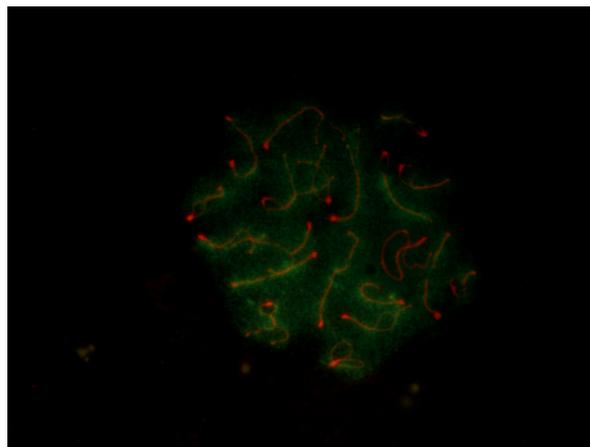
H2A K119ub–Control–Paquiteno Medio



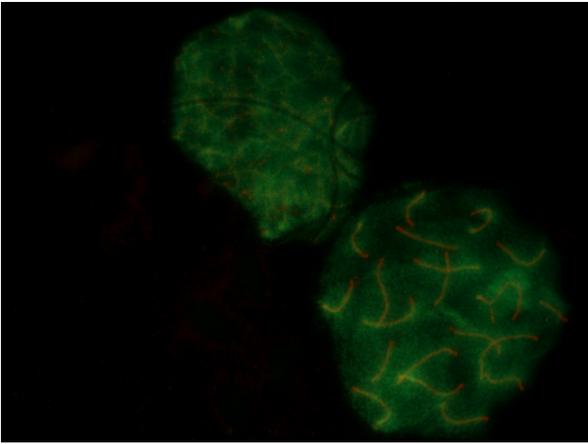
H2A K119ub–Control–Paquiteno Tardío



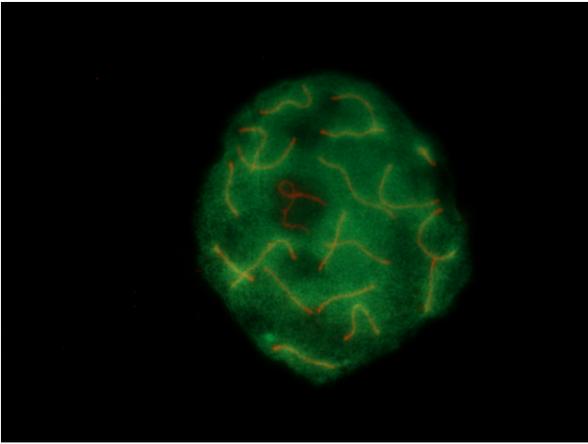
H2A K119ub–Control–Diploteno Temprano



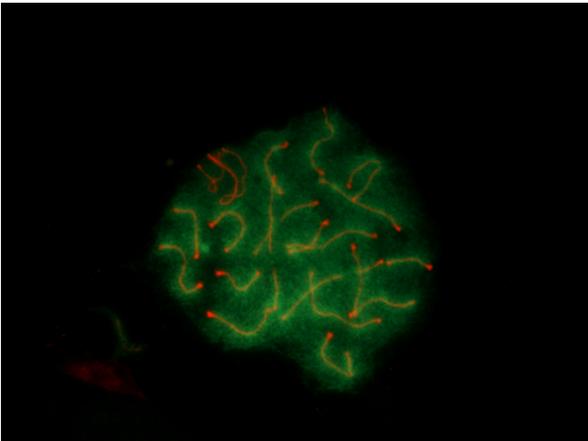
H2A K119ub–Control–Diploteno Medio/Tardío



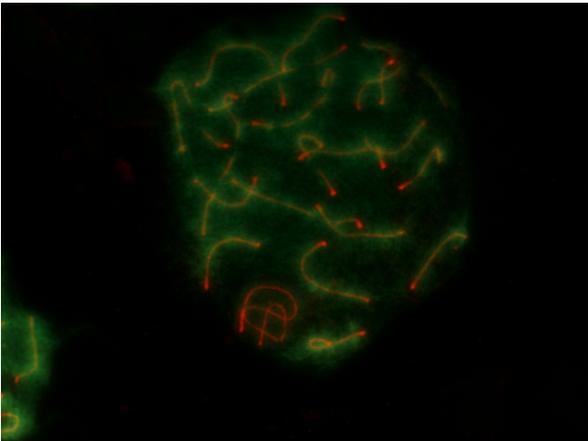
H2A K119ub-3H PHT-Paquiteno Temprano



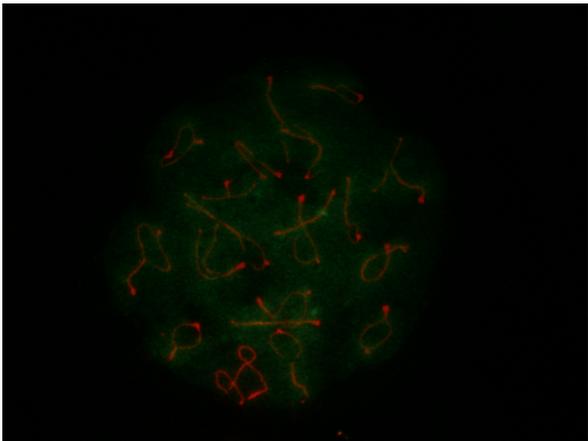
H2A K119ub-3H PHT-Paquiteno Medio



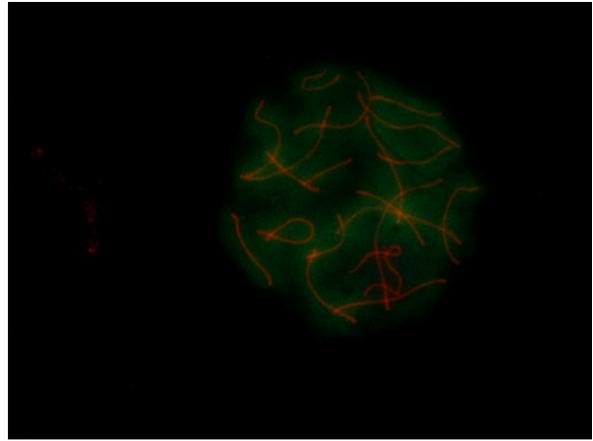
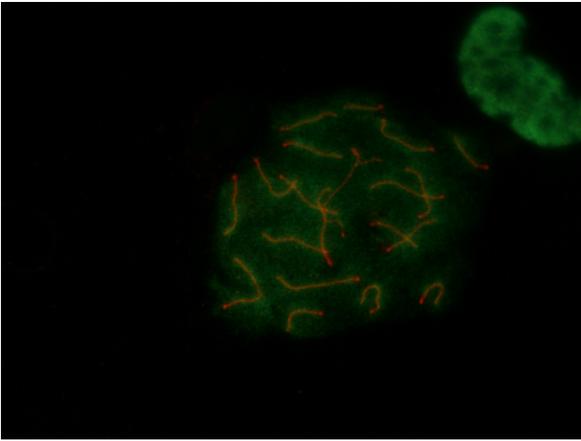
H2A K119ub-3H PHT-Paquiteno Tardío



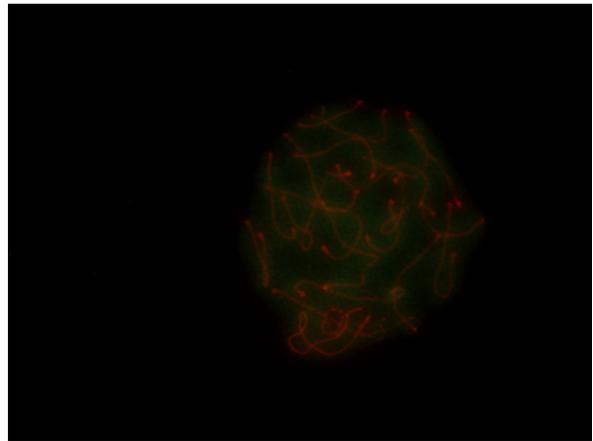
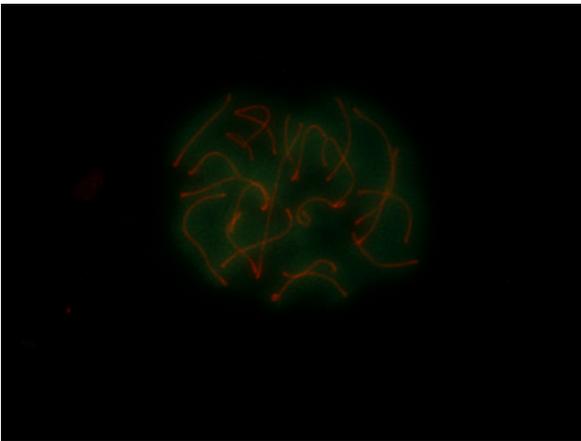
H2A K119ub-3H PHT-Diploteno Temprano



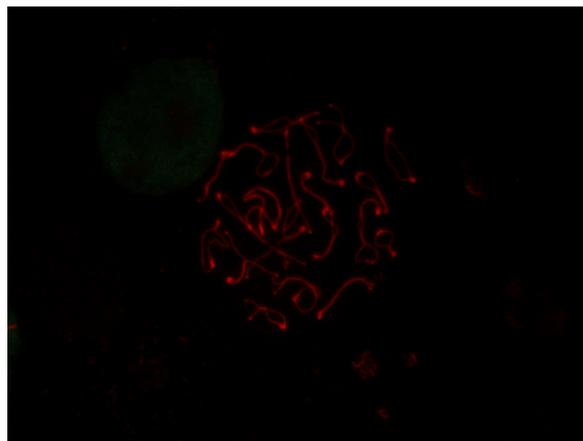
H2A K119ub-3H PHT-Diploteno Medio/Tardío



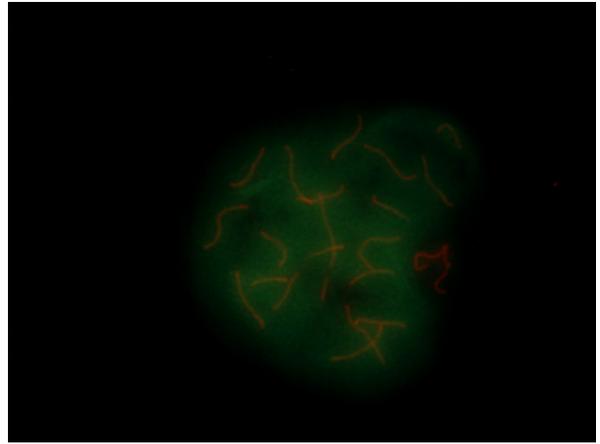
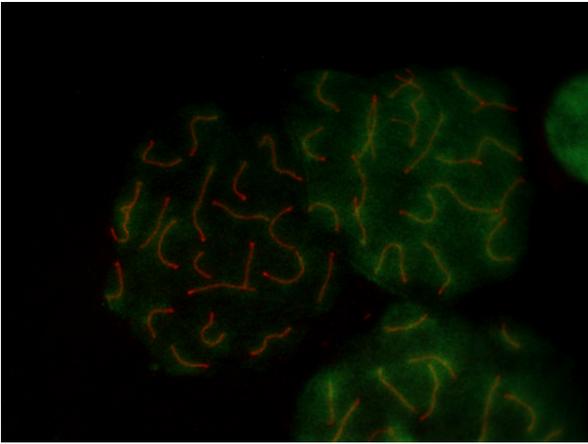
H2A K119ub-48H PHT-Paquiteno Temprano H2A K119ub-48H PHT-Paquiteno Medio



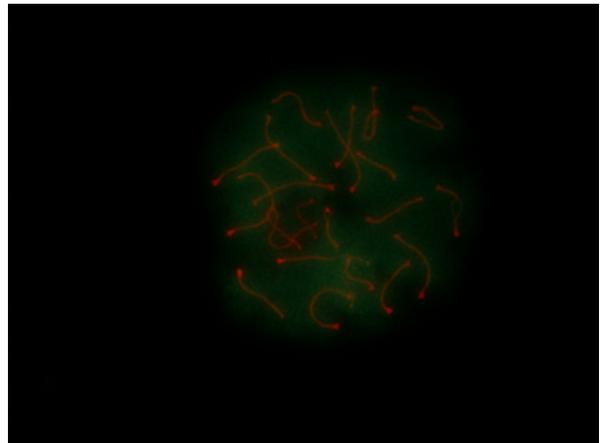
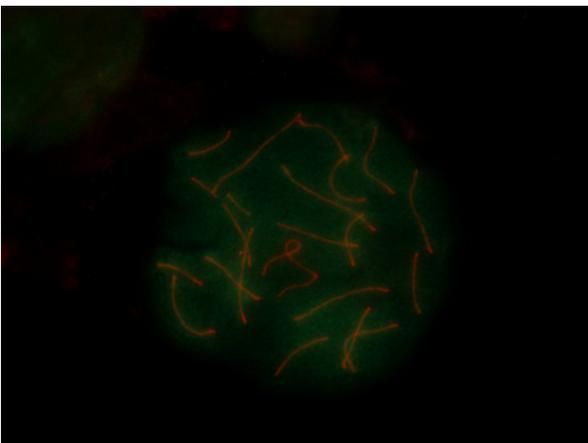
H2A K119ub-48H PHT-Paquiteno Tardío H2A K119ub-48H PHT-Diploteno Temprano



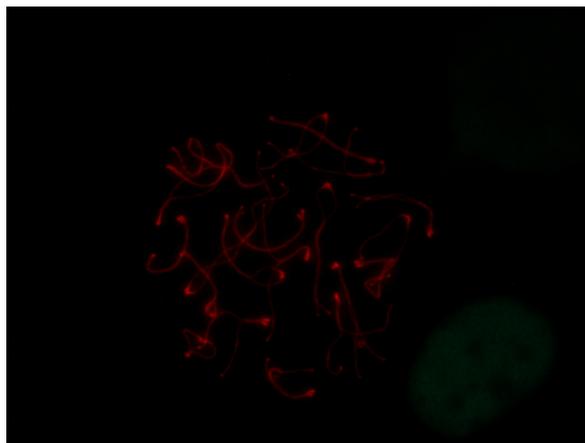
H2A K119ub-48H PHT-Diploteno Medio/Tardío



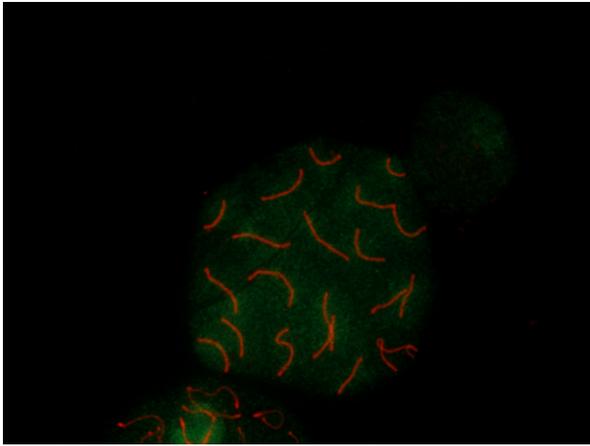
H2A K119ub-120H PHT-Paquiteno Temprano H2A K119ub-120H PHT-Paquiteno Medio



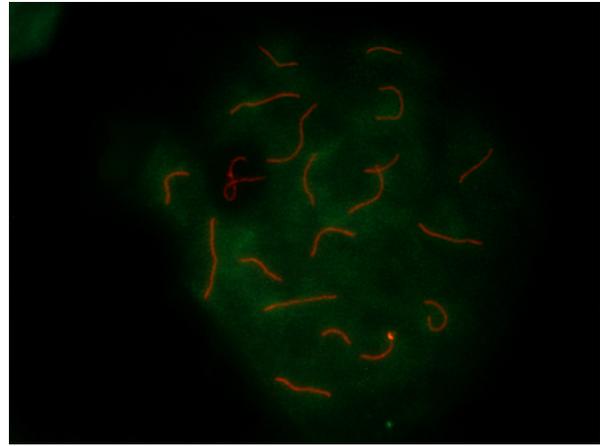
H2A K119ub-120H PHT-Paquiteno Tardío H2A K119ub-120H PHT-Diploteno Temprano



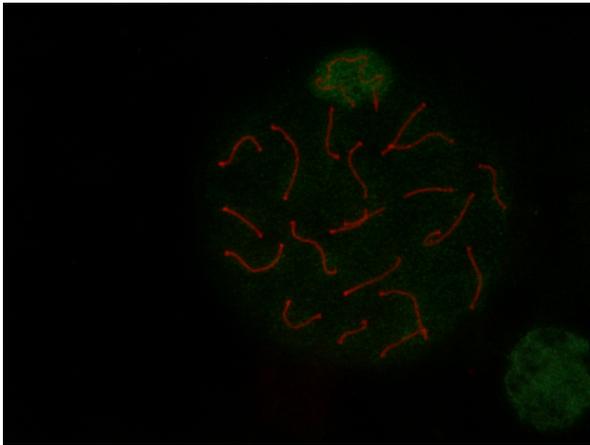
H2A K119ub-120H PHT-Diploteno Medio/Tardío



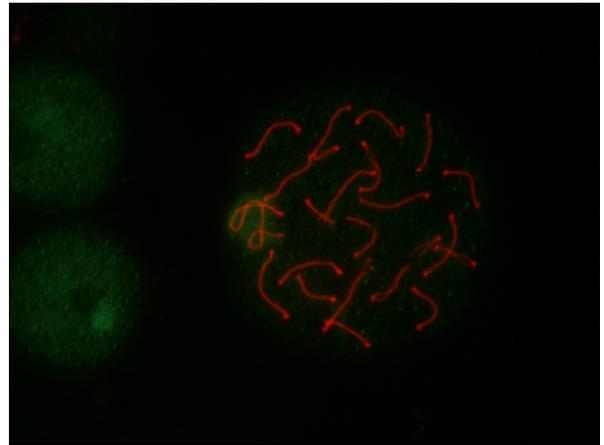
H3K4me1-Control-Paquiteno Temprano



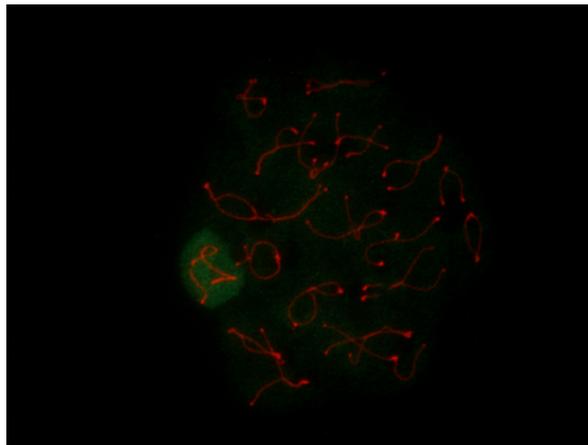
H3K4me1-Control-Paquiteno Medio



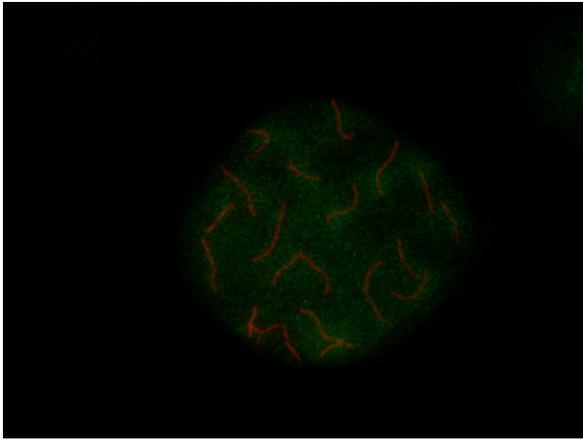
H3K4me1-Control-Paquiteno Tardío



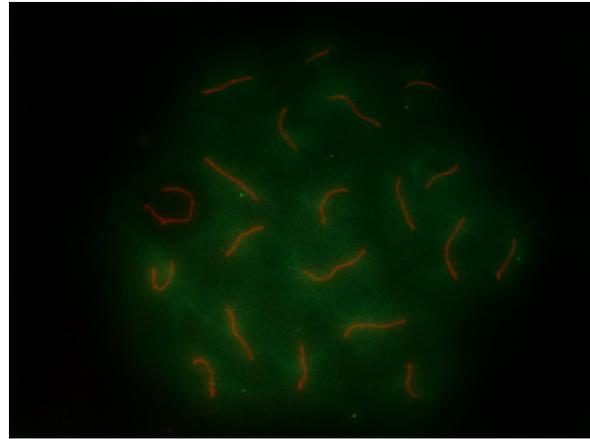
H3K4me1-Control-Diploteno Temprano



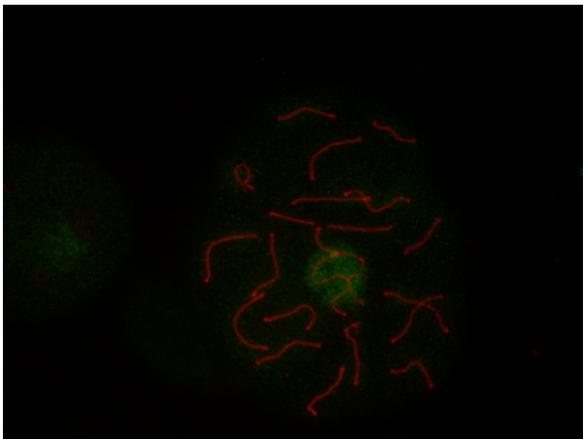
H3K4me1-Control-Diploteno Medio/Tardío



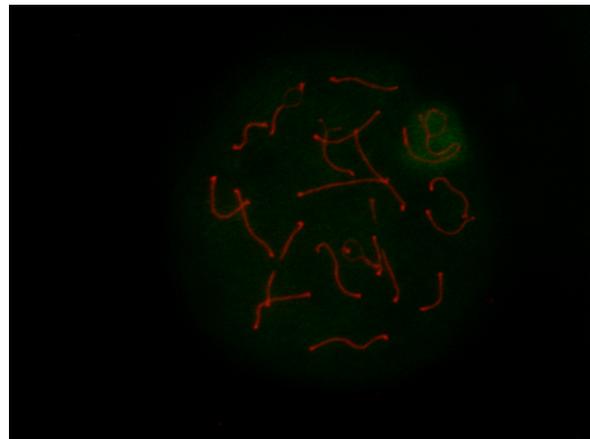
H3K4me1-3H-Paquiteno Temprano



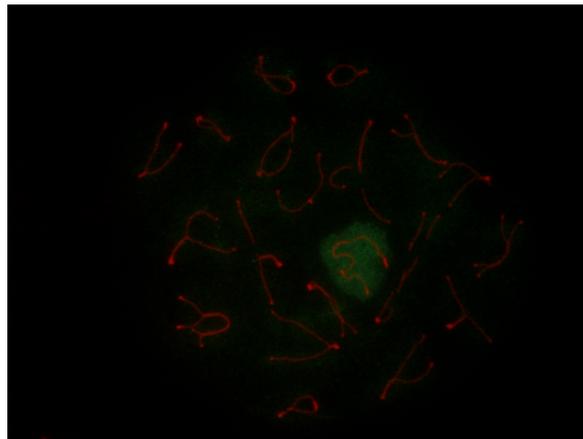
H3K4me1-3H-Paquiteno Medio



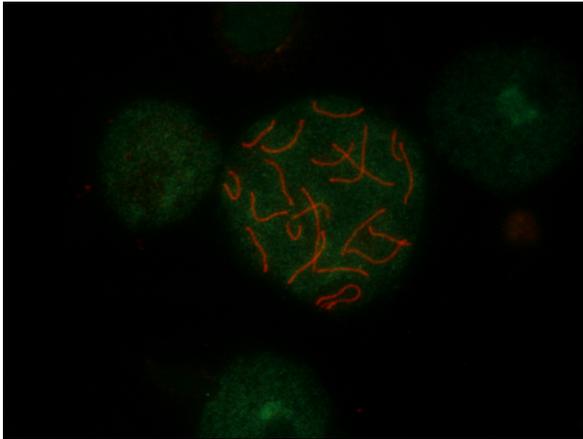
H3K4me1-3H-Paquiteno Tardío



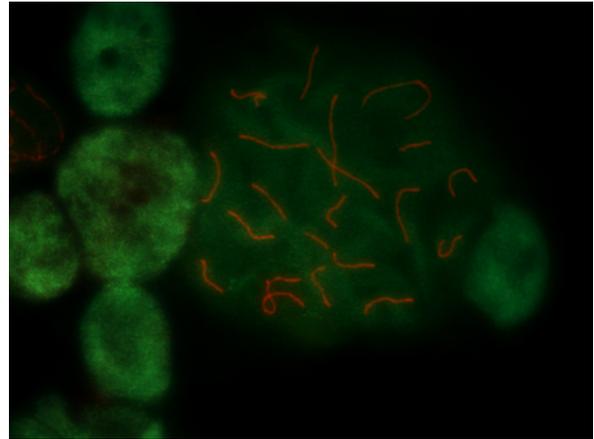
H3K4me1-3H-Diploteno Temprano



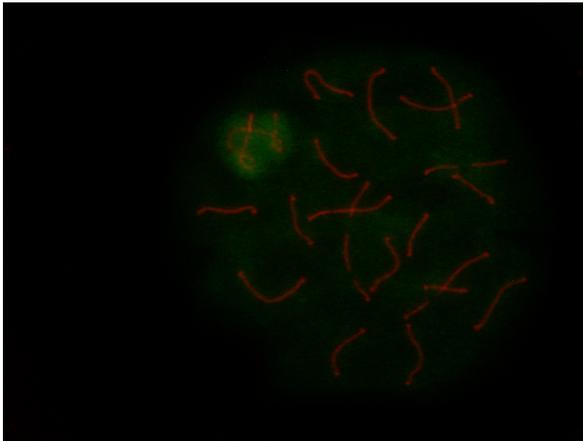
H3K4me1-3H-Diploteno Medio/Tardío



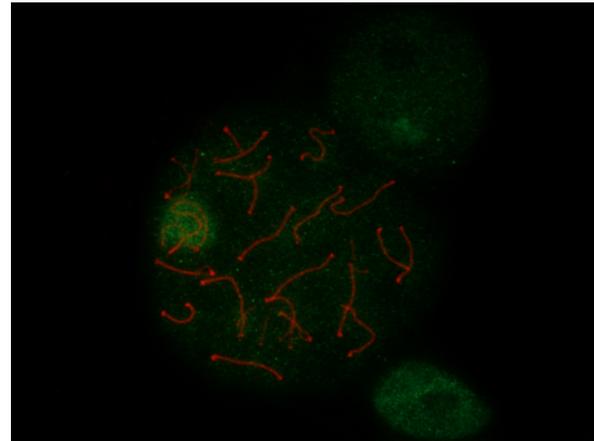
H3K4me1-48H-Paquiteno Temprano



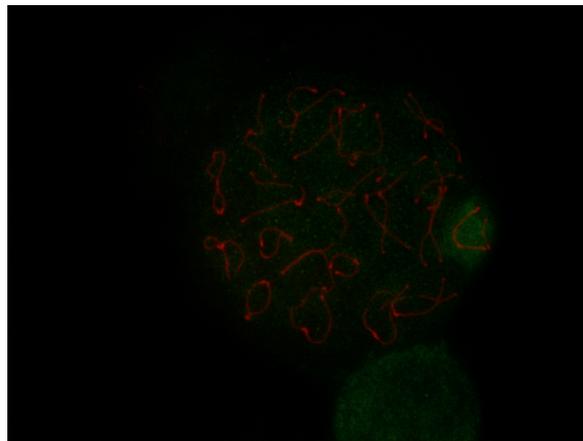
H3K4me1-48H-Paquiteno Medio



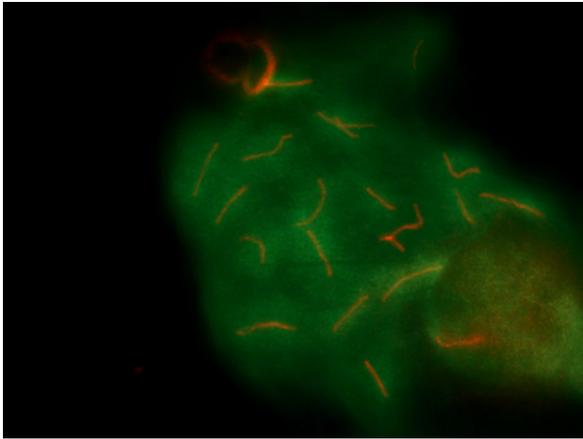
H3K4me1-48H-Paquiteno Tardío



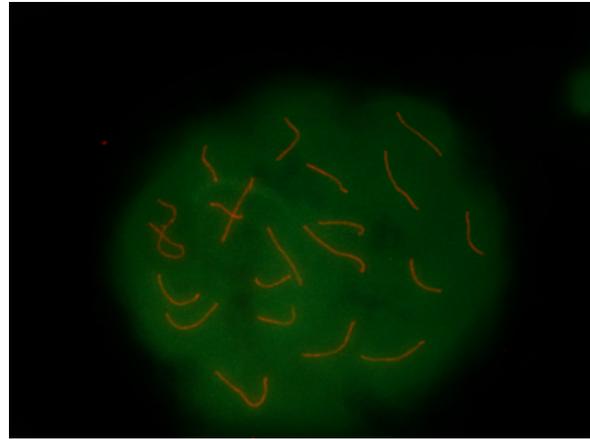
H3K4me1-48H-Diploteno Temprano



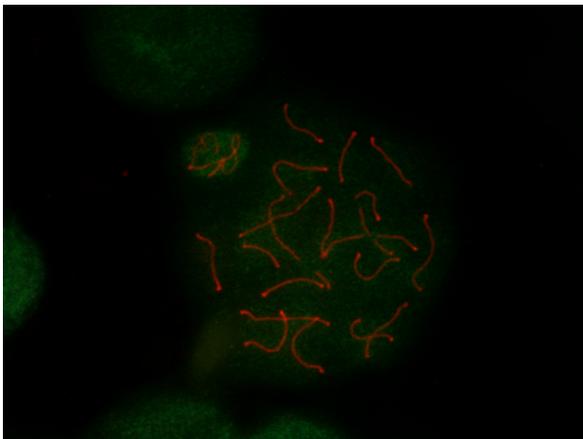
H3K4me1-48H-Diploteno Medio/Tardío



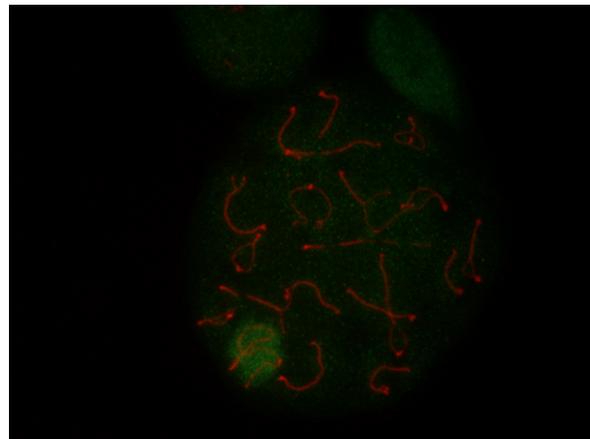
H3K4me1-120H-Paquiteno Temprano



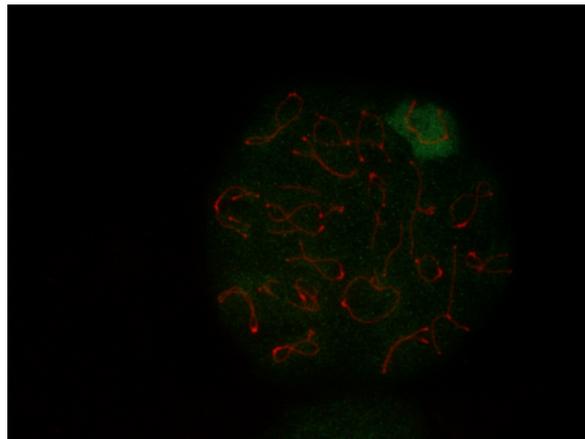
H3K4me1-120H-Paquiteno Medio



H3K4me1-120H-Paquiteno Tardío



H3K4me1-120H-Diploteno Temprano



H3K4me1-120H-Diploteno Medio/Tardío

REFERENCIAS

1. Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci.* 2015;8(4):191-6.
2. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum Reprod.* 2009;24(11):2683-7.
3. Lotti F, Maggi M. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. *Hum Reprod Update.* 2015;21(1):56-83.
4. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod.* 2007;22(6):1506-12.
5. Levine H, Jorgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I, et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update.* 2017;23(6):646-59.
6. Merzenich H, Zeeb H, Blettner M. Decreasing sperm quality: a global problem? *BMC Public Health.* 2010;10:24.
7. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update.* 2010;16(3):231-45.
8. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet.* 1998;352(9135):1172-7.
9. Aston KI. Genetic susceptibility to male infertility: news from genome-wide association studies. *Andrology.* 2014;2(3):315-21.
10. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Buck Louis GM, Toppari J, Andersson AM, Eisenberg ML, et al. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol Rev.* 2016;96(1):55-97.
11. Hand JW, Walker H, Hornsey S, Field SB. Effects of hyperthermia on the mouse testis and its response to X-rays, as assayed by weight loss. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1979;35(6):521-8.
12. Martenies SE, Perry MJ. Environmental and occupational pesticide exposure and human sperm parameters: a systematic review. *Toxicology.* 2013;307:66-73.

13. Perez-Crespo M, Pintado B, Gutierrez-Adan A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Mol Reprod Dev.* 2008;75(1):40-7.
14. Yaeram J, Setchell BP, Maddocks S. Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. *Reprod Fertil Dev.* 2006;18(6):647-53.
15. Bomblies K, Higgins JD, Yant L. Meiosis evolves: adaptation to external and internal environments. *New Phytol.* 2015;208(2):306-23.
16. Das L, Parbin S, Pradhan N, Kausar C, Patra SK. Epigenetics of reproductive infertility. *Front Biosci (Schol Ed).* 2017;9:509-35.
17. Jung A, Leonhardt F, Schill WB, Schuppe HC. Influence of the type of undertrousers and physical activity on scrotal temperature. *Hum Reprod.* 2005;20(4):1022-7.
18. Nordkap L, Joensen UN, Blomberg Jensen M, Jorgensen N. Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;355(2):221-30.
19. Sharpe RM. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010;365(1546):1697-712.
20. Meistrich ML, Eng VW, Loir M. Temperature effects on the kinetics of spermatogenesis in the mouse. *Cell Tissue Kinet.* 1973;6(4):379-93.
21. Ivell R. Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007;5:15.
22. Hjollund NH, Storgaard L, Ernst E, Bonde JP, Olsen J. Impact of diurnal scrotal temperature on semen quality. *Reprod Toxicol.* 2002;16(3):215-21.
23. Stoy J, Hjollund NH, Mortensen JT, Burr H, Bonde JP. Semen quality and sedentary work position. *Int J Androl.* 2004;27(1):5-11.
24. Garolla A, Torino M, Sartini B, Cosci I, Patassini C, Carraro U, et al. Seminal and molecular evidence that sauna exposure affects human spermatogenesis. *Hum Reprod.* 2013;28(4):877-85.
25. Mieusset R, Bengoudifa B, Bujan L. Effect of posture and clothing on scrotal temperature in fertile men. *J Androl.* 2007;28(1):170-5.
26. Mortazavi SA, Taeb S, Mortazavi SM, Zarei S, Haghani M, Habibzadeh P, et al. The Fundamental Reasons Why Laptop Computers should not be Used on Your Lap. *J Biomed Phys Eng.* 2016;6(4):279-84.

27. Sheynkin Y, Jung M, Yoo P, Schulsinger D, Komaroff E. Increase in scrotal temperature in laptop computer users. *Hum Reprod.* 2005;20(2):452-5.
28. Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, Im P, Taing KS, Bui T, et al. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology.* 1999;140(4):1709-17.
29. Rockett JC, Mapp FL, Garges JB, Luft JC, Mori C, Dix DJ. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biol Reprod.* 2001;65(1):229-39.
30. Yin Y, Hawkins KL, DeWolf WC, Morgentaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl.* 1997;18(2):159-65.
31. Houston BJ, Nixon B, Martin JH, Iuliis G, Bromfield EG, McEwen KE, et al. Heat exposure induces oxidative stress and DNA damage in the male germ line. *Biol Reprod.* 2018.
32. Wolgemuth DJ, Manterola M, Vasileva A. Role of cyclins in controlling progression of mammalian spermatogenesis. *Int J Dev Biol.* 2013;57(2-4):159-68.
33. Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction.* 2005;129(4):505-14.
34. Kanter M, Aktas C, Erbogaa M. Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Toxicol Ind Health.* 2013;29(2):99-113.
35. Paul C, Murray AA, Spears N, Saunders PT. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction.* 2008;136(1):73-84.
36. Kim B, Park K, Rhee K. Heat stress response of male germ cells. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(15):2623-36.
37. Zhang W, Shao Y, Qin Y, Wu Y. Expression pattern of HSFY in the mouse testis and epididymis with and without heat stress. *Cell Tissue Res.* 2016;366(3):763-70.
38. Korfanty J, Stokowy T, Widlak P, Gogler-Pigłowska A, Handschuh L, Podkowinski J, et al. Crosstalk between HSF1 and HSF2 during the heat shock response in mouse testes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;57:76-83.
39. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1997;17(9):5317-27.

40. Nebel BR, Hackett EM. Synaptonemal complexes (cores) in primary spermatocytes of mouse under elevated temperature. *Nature*. 1961;190:467-8.
41. Cataldo L, Mastrangelo MA, Kleene KC. Differential effects of heat shock on translation of normal mRNAs in primary spermatocytes, elongated spermatids, and Sertoli cells in seminiferous tubule culture. *Exp Cell Res*. 1997;231(1):206-13.
42. Ayarza E, Gonzalez M, Lopez F, Fernandez-Donoso R, Page J, Berrios S. Alterations in chromosomal synapses and DNA repair in apoptotic spermatocytes of *Mus m. domesticus*. *Eur J Histochem*. 2016;60(2):2677.
43. Chen Y, Muller F, Rieu I, Winter P. Epigenetic events in plant male germ cell heat stress responses. *Plant Reprod*. 2016;29(1-2):21-9.
44. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell*. 2007;128(4):669-81.
45. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
46. Holoch D, Moazed D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet*. 2015;16(2):71-84.
47. Bokszczanin KL, Solanaceae Pollen Thermotolerance Initial Training Network C, Fragkostefanakis S. Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. *Front Plant Sci*. 2013;4:315.
48. Xie C, Shen H, Zhang H, Yan J, Liu Y, Yao F, et al. Quantitative proteomics analysis reveals alterations of lysine acetylation in mouse testis in response to heat shock and X-ray exposure. *Biochim Biophys Acta*. 2018;1866(3):464-72.
49. Khalil AM, Wahlestedt C. Epigenetic mechanisms of gene regulation during mammalian spermatogenesis. *Epigenetics*. 2008;3(1):21-8.
50. Yan W, McCarrey JR. Sex chromosome inactivation in the male. *Epigenetics*. 2009;4(7):452-6.
51. Baudat F, Imai Y, de Massy B. Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nat Rev Genet*. 2013;14(11):794-806.
52. Turner JM, Aprelikova O, Xu X, Wang R, Kim S, Chandramouli GV, et al. BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol*. 2004;14(23):2135-42.
53. Manterola M, Brown TM, Oh MY, Garyn C, Gonzalez BJ, Wolgemuth DJ. BRDT is an essential epigenetic regulator for proper chromatin organization, silencing

of sex chromosomes and crossover formation in male meiosis. *PLoS Genet.* 2018;14(3):e1007209.

54. Shilo S, Melamed-Bessudo C, Dorone Y, Barkai N, Levy AA. DNA Crossover Motifs Associated with Epigenetic Modifications Delineate Open Chromatin Regions in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2015;27(9):2427-36.

55. Turner JM. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development.* 2007;134(10):1823-31.

56. Namekawa SH, Park PJ, Zhang LF, Shima JE, McCarrey JR, Griswold MD, et al. Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice. *Curr Biol.* 2006;16(7):660-7.

57. Kohda T, Ishino F. Embryo manipulation via assisted reproductive technology and epigenetic asymmetry in mammalian early development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013;368(1609):20120353.

58. Kato Y, Alavattam KG, Sin HS, Meetei AR, Pang Q, Andreassen PR, et al. FANCB is essential in the male germline and regulates H3K9 methylation on the sex chromosomes during meiosis. *Hum Mol Genet.* 2015;24(18):5234-49.

59. Hasegawa K, Sin HS, Maezawa S, Broering TJ, Kartashov AV, Alavattam KG, et al. SCML2 establishes the male germline epigenome through regulation of histone H2A ubiquitination. *Dev Cell.* 2015;32(5):574-88.

60. Ichijima Y, Sin HS, Namekawa SH. Sex chromosome inactivation in germ cells: emerging roles of DNA damage response pathways. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(15):2559-72.

61. Lu LY, Yu X. Double-strand break repair on sex chromosomes: challenges during male meiotic prophase. *Cell Cycle.* 2015;14(4):516-25.

62. Kauppi L, Barchi M, Baudat F, Romanienko PJ, Keeney S, Jasin M. Distinct properties of the XY pseudoautosomal region crucial for male meiosis. *Science.* 2011;331(6019):916-20.

63. Broering TJ, Alavattam KG, Sadreyev RI, Ichijima Y, Kato Y, Hasegawa K, et al. BRCA1 establishes DNA damage signaling and pericentric heterochromatin of the X chromosome in male meiosis. *J Cell Biol.* 2014;205(5):663-75.

64. Lu LY, Xiong Y, Kuang H, Korakavi G, Yu X. Regulation of the DNA damage response on male meiotic sex chromosomes. *Nat Commun.* 2013;4:2105.

65. Page J, de la Fuente R, Manterola M, Parra MT, Viera A, Berrios S, et al. Inactivation or non-reactivation: what accounts better for the silence of sex chromosomes during mammalian male meiosis? *Chromosoma.* 2012;121(3):307-26.

66. van der Heijden GW, Derijck AA, Posfai E, Giele M, Pelczar P, Ramos L, et al. Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet.* 2007;39(2):251-8.
67. Luo M, Zhou J, Leu NA, Abreu CM, Wang J, Anguera MC, et al. Polycomb protein SCML2 associates with USP7 and counteracts histone H2A ubiquitination in the XY chromatin during male meiosis. *PLoS Genet.* 2015;11(1):e1004954.
68. Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol.* 1977;74(1):68-85.
69. Clermont Y, Trott M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H-thymidine and radioautography. *Fertil Steril.* 1969;20(5):805-17.
70. Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat.* 1956;99(3):507-16.
71. Manterola M, Page J, Vasco C, Berrios S, Parra MT, Viera A, et al. A high incidence of meiotic silencing of unsynapsed chromatin is not associated with substantial pachytene loss in heterozygous male mice carrying multiple simple robertsonian translocations. *PLoS Genet.* 2009;5(8):e1000625.
72. Turner JM, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A, Xu X, Deng CX, et al. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet.* 2005;37(1):41-7.
73. Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, et al. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature.* 2004;431(7010):873-8.
74. Adams SR, Maezawa S, Alavattam KG, Abe H, Sakashita A, Shroder M, et al. RNF8 and SCML2 cooperate to regulate ubiquitination and H3K27 acetylation for escape gene activation on the sex chromosomes. *PLoS Genet.* 2018;14(2):e1007233.
75. Godmann M, Auger V, Ferraroni-Aguiar V, Di Sauro A, Sette C, Behr R, et al. Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2007;77(5):754-64.
76. Rathke C, Baarends WM, Awe S, Renkawitz-Pohl R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1839(3):155-68.
77. Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reprod Biomed Online.* 2015;30(1):14-27.

78. Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev.* 2016;96(1):1-17.
79. De Vita R, Calugi A, Chiarantano C, Forte D, Mauro F, Uccelli R. Effects of heat on mouse spermatogenesis monitored by flow cytometry. *Int J Hyperthermia.* 1990;6(3):543-51.
80. Garriott ML, Chrisman CL. Hyperthermia induced dissociation of the X-Y bivalent in mice. *Environ Mutagen.* 1980;2(4):465-71.
81. Roeder GS, Bailis JM. The pachytene checkpoint. *Trends Genet.* 2000;16(9):395-403.
82. Tung KS, Hong EJ, Roeder GS. The pachytene checkpoint prevents accumulation and phosphorylation of the meiosis-specific transcription factor Ndt80. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(22):12187-92.
83. Sin HS, Barski A, Zhang F, Kartashov AV, Nussenzweig A, Chen J, et al. RNF8 regulates active epigenetic modifications and escape gene activation from inactive sex chromosomes in post-meiotic spermatids. *Genes Dev.* 2012;26(24):2737-48.
84. Berkovits BD, Wolgemuth DJ. The role of the double bromodomain-containing BET genes during mammalian spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 2013;102:293-326.
85. Gorbsky GJ. The spindle checkpoint and chromosome segregation in meiosis. *FEBS J.* 2015;282(13):2471-87.