



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE
MAGISTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR MÉDICA

*Silenciamiento transcripcional en el trivalente sexual
meiótico de murciélagos pertenecientes al género
Artibeus, familia Phyllostomidae.*

AUTORA: Lic. Angie Barajas Ruiz

DIRECTOR: Profesor Emérito, Dr. Alberto Juan Solari.

DIRECTORA ADJUNTA: Dra. Roberta B. Sciarano.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Emérito Dr. Alberto J. Solari, por dirigirme en la elaboración de esta tesina, por sus grandes enseñanzas y su respeto.

A la Dra. Roberta Sciurano, mi directora adjunta, por perfeccionarme en la elaboración de esta tesina y por su inmensa amabilidad.

A la licenciada Mónica Rahn, por su colaboración en las técnicas inmunocitoquímicas, microscópicas, sus consejos profesionales y su excelente disposición.

A la licenciada Cristina Deparci, por su generosa colaboración con las técnicas de microscopía electrónica.

A los Dres. Julio Pieczarka, Renata Rodrigues Noronha y su equipo de trabajo en la Universidad federal de Pará, estado de Pará-Brasil, por el aporte del material testicular de los murciélagos estudiados en esta tesina.

A la Universidad de Buenos Aires, por proporcionarme un ambiente físico y científico para la realización de esta maestría.

A los Señores del Jurado.

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. La meiosis en mamíferos.	1
2. La sinapsis y el complejo sinaptonémico.	2
3. Nódulos de recombinación.	4
4. Segregación de los cromosomas homólogos: rol de las cohesinas.	5
5. El cuerpo XY.	6
5.1. Silenciamiento y remodelación de la cromatina en el cuerpo XY.	7
6. Sistema cromosómico sexual XY ₁ Y ₂ .	9
7. Patrón de bandeo C, G y NORs de <i>Artibeus lituratus</i> y <i>Artibeus planirostris</i> .	11
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
HIPÓTESIS DE TRABAJO	21
RESULTADOS	21
1. Cariotipo de Complejos Sinaptonémicos en <i>Artibeus lituratus</i> y <i>Artibeus planirostris</i> .	21
2. Comportamiento sináptico del trivalente sexual XY ₁ Y ₂ en <i>Artibeus lituratus</i> y <i>Artibeus planirostris</i> a lo largo del paquinema.	25

3. Inmunolocalización fluorescente de proteínas meióticas en <i>Artibeus lituratus</i> y <i>Artibeus planirostris</i> .	28
4. Nódulos de recombinación.	29
5. Remodelación de la cromatina y silenciamiento transcripcional en el trivalente sexual XY ₁ Y ₂ .	30
DISCUSIÓN	33
1. El Sistema sexual múltiple XY ₁ Y ₂ en <i>Artibeus lituratus</i> y <i>Artibeus planirostris</i> .	33
2. La presencia de RAD51, γ -H2AX y BRCA1 en la cromatina asináptica y su relación con el cuerpo XY ₁ Y ₂ .	35
3. Sinapsis y remodelación de la cromatina en el cuerpo XY ₁ Y ₂ en <i>Artibeus lituratus</i> y <i>Artibeus planirostris</i> .	37
CONCLUSIONES	39
RESUMEN	41
BIBLIOGRAFÍA	42

INTRODUCCIÓN

1. La meiosis en mamíferos.

La meiosis masculina en los mamíferos comienza en la pubertad, luego de la diferenciación espermatogonial y la duplicación del ADN (Fase S) en el núcleo de los espermatocitos primarios. Básicamente, la meiosis consta de dos divisiones meióticas sucesivas con un único periodo de síntesis del ADN; dando lugar a cuatro espermátidas con un contenido de ADN que disminuye a la mitad respecto de la célula madre que les dio origen. La profase de la primera división meiótica, presenta cinco etapas sucesivas: leptonema, cigonema, paquinema, diplonema y diacinesis. En todas las células del macho, somáticas y germinales, el único cromosoma X permanece isopicnótico hasta el comienzo de la meiosis en la pubertad. Al entrar las células en el periodo leptonema, el X e Y sufren cambios, se aparean en el cigonema y se hacen heteropicnóticos formando el cuerpo XY (ver más detalles: “cuerpo XY”) (Solari, 1974; Solari, 1994) en el paquinema. En las hembras, la meiosis se inicia en el periodo embrionario, y luego de progresar queda suspendida en el periodo diplonema (en roedores este periodo recibe el nombre de dictiotene). La profase meiótica se reanuda sólo durante la edad fértil, en los folículos ováricos en maduración; durante toda la meiosis de la hembra, los cromosomas X se comportan como los demás cromosomas (autosomas), apareándose, formando quiasmas y siendo siempre isopicnóticos (Handel MA. and Hunt. PA, 1992).

La meiosis comprende una serie de procesos básicos que incluyen: 1) *la recombinación*, 2) *el apareamiento* (sinapsis) de los cromosomas homólogos,

provenientes de los progenitores, con la consecuente formación del complejo sinaptonémico y 3) *la segregación* de estos cromosomas homólogos hacia los polos opuestos de la célula en la anafase I. Los estudios ultraestructurales por microscopía electrónica permiten caracterizar los distintos estadios del desarrollo del complejo sinaptonémico (complejo proteínico implicado en la sinapsis de los cromosomas homólogos) (Solari, 1994), de una forma muy definida.

2. La sinapsis y el complejo sinaptonémico.

La sinapsis cromosómica es un fenómeno celular que ocurre en las células germinales durante la meiosis. Este fenómeno consiste en el apareamiento de los dos miembros de cada pareja de cromosomas homólogos, exceptuando los cromosomas sexuales que sólo se sinapsan parcialmente. El mecanismo básico de esta sinapsis es la formación de una estructura proteínica: *el complejo sinaptonémico* (Moses, 1968).

El complejo sinaptonémico tiene en general una estructura muy conservada en diferentes organismos, consistente en: 1) dos elementos laterales asociados cada uno de ellos al intersticio en el que las dos cromátides de un homólogo se asocian (antes de abrirse) en amplios lazos de cromatina, y están constituidos principalmente por la proteína 3 de complejo sinaptonémico (SYCP3) y por la proteína SYCP2 en menor grado (Figura 1); 2) la región central del complejo sinaptonémico que está formada por dos tipos de estructuras: elementos fibrilares, llamados *filamentos transversales* y *un elemento central*. Los filamentos transversales atraviesan el espacio entre el elemento central y el lateral. El componente proteínico mayoritario

de los filamentos transversales es la proteína SYCP1, que se une a los elementos laterales por su extremo C-terminal y al elemento central por su extremo N-terminal.

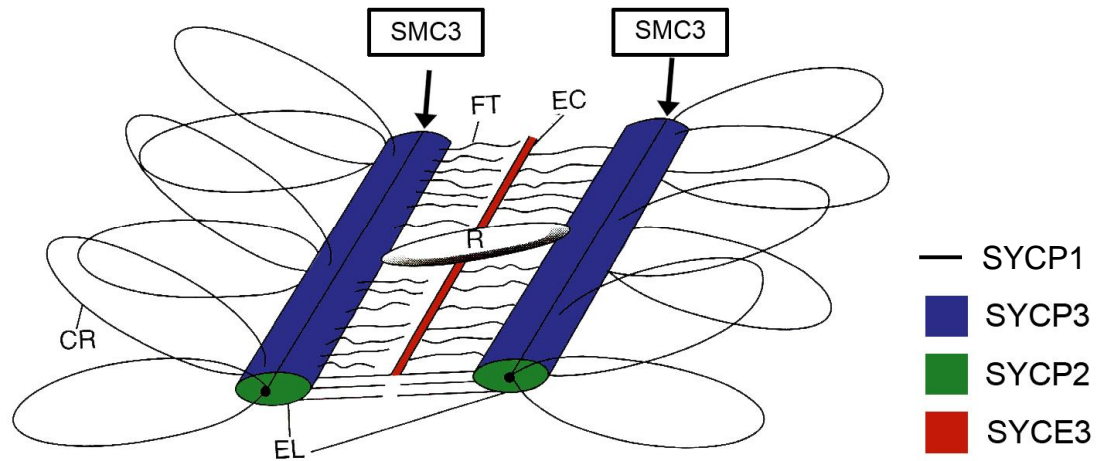


Figura 1. Esquema bidimensional de la estructura proteínica del complejo sinaptonémico. CR: cromatina; EL, EC: elementos laterales y elemento central; FT: filamentos transversales; R: nódulo de recombinación.

El estudio de los complejos sinaptonémicos mediante el análisis ultraestructural (Solari, 1998) e inmunocitoquímico de proteínas meióticas (Sciurano RB. and Solari AJ., 2014), permite interpretar los fenómenos básicos de la meiosis, como la sinapsis, la recombinación y la segregación, las alteraciones genéticas (cromosómicas y génicas) derivadas de los reordenamientos cromosómicos y sus puntos de ruptura, y los cambios en la estructura nuclear. De esta forma, también se han demostrado las configuraciones de los cromosomas multivalentes en mamíferos (ver más abajo) y las provenientes de alteraciones cromosómicas en humanos (Sciurano R.B *et al.*, 2007; 2012).

3. Nódulos de recombinación.

Los nódulos de recombinación están compuestos por complejos de proteínas, algunas de las cuales están implicadas en el sistema de reparación del ADN por mal apareamiento y en el control del ciclo celular, y son esenciales para la recombinación meiótica. Baker y colaboradores (1996) sugirieron que la proteína MLH1 -que es una proteína necesaria para la reparación del ADN por mal apareamiento-, en los complejos sinaptonémicos participa en el proceso de recombinación homóloga y, podría ser un componente de los nódulos de recombinación tardíos, ya que aparece dispuesta en focos a lo largo de los complejos sinaptonémicos en los núcleos paquiténicos de ratón (Marcon and Moens, 2003). Las técnicas de inmunolocalización han permitido demostrar que otra proteína, la RAD51, actúa más precozmente como heterodímero sobre el ADN junto a la proteína DMC1 (Masson *et al.*, 1999). Durante el cigonema, la proteína RAD51 se distribuye en focos en los puntos donde se produjeron las fracturas de doble cadena del ADN originadas por el complejo SPO11 al inicio del proceso de recombinación. En cambio, en el paquinema la localización de los focos se restringe a los segmentos autosómicos no sinapsados y a las regiones diferenciales de los cromosomas sexuales. El complejo RAD51/DMC1 se asocia con la aparición de nódulos tempranos visibles por inmunolocalización durante el leptonema. Moens y colaboradores (2007) presentaron un modelo para explicar el inicio y la resolución final de los eventos de la recombinación en el ratón en el que se propone que en el leptonema, los nódulos tempranos, identificados por la presencia de las recombinasas RAD51/DMC1, estarían asociados con dominios de γ -H2AX y de pequeños segmentos de ejes

simples o elementos laterales de complejo sinaptonémico. Estos nódulos tempranos se convierten en nódulos transitorios, definidos por la presencia de la proteína RPA (proteína de unión a cadena simple de ADN, que forma parte de un complejo de varias proteínas tales como la helicasa BLM, las proteinasas MSH4 y MSH5 y topoisomerasas). A medida que los nódulos tempranos se transforman durante el paquinema temprano-medio, las recombinasas RAD51/DMC1 y la γ -H2AX desaparecen. La presencia simultánea de las proteínas RPA y MLH1 determina la aparición de nódulos de recombinación tardía recién formados, desarrollados a partir de los nódulos transitorios.

4. Segregación de los cromosomas homólogos: rol de las cohesinas.

La segregación y la recombinación de material genético deben estar correctamente reguladas para evitar errores que puedan modificar el complemento cromosómico, dando lugar a las aneuploidías. En la meiosis, la formación y el mantenimiento de los complejos multiproteínicos de cohesinas y los de recombinación son esenciales para cumplir estos requisitos. La asociación entre las cromátides hermanas a lo largo de todo el cromosoma se origina mediante la formación de un complejo multiproteínico de cohesinas que constituye el eje estructural básico de los cromosomas y juega un papel muy importante en la segregación de los cromosomas, tanto en la meiosis como en la mitosis. El complejo de cohesinas establece la cohesión entre las moléculas de ADN duplicadas durante la mitosis y en la recombinación de los cromosomas homólogos durante la meiosis. Las cohesinas mitóticas contienen cuatro subunidades: dos proteínas SMC (proteínas de mantenimiento estructural de

los cromosomas), SMC1 α y SMC3, y dos proteínas no estructurales, RAD21/SCC1 y SCC3. Este complejo multiproteínico asegura la cohesión entre cromátides hermanas hasta la metafase mitótica, donde la cohesión entre los brazos cromosómicos se pierde. El proceso continúa con la separación de los cinetocoros hacia los polos opuestos de la célula (revisión en Cohen *et al.*, 2006).

5. El cuerpo XY.

El cuerpo XY es la manifestación citológica de los cromosomas X e Y cuya cromatina presenta una remodelación estructural diferencial y está transcripcionalmente silenciada. El cuerpo XY es un indicador muy útil para detectar anomalías en la profase meiótica masculina, ya sea por su desaparición (en caso de ciertas mutaciones) o su modificación (en caso de reordenamientos cromosómicos) (Sciurano and Solari, 2014). La ausencia de la cromatina condensada en el par XY durante la meiosis es un evento raro que sólo se da en espermatoцитos anormales de mamíferos infértiles (Solari, 1994). En humanos portadores de reordenamientos cromosómicos se ha comprobado que la inactivación de la cromatina no solo se restringe al cuerpo XY sino también a las regiones no sinapsadas de los cromosomas reordenados y se relacionaron estas observaciones con una falla en la espermatogénesis (Sciurano *et al.*, 2007, 2012) en la que frecuentemente se muestra un bloqueo de la meiosis en la primera profase. La presencia de una variante de la histona H2A, la γ -H2AX, en el silenciamiento transcripcional del cuerpo XY, así como el papel de la proteína BRCA1 en la formación del cuerpo XY en ratones ha permitido determinar las características de cuerpos XY normales y anormales en

pacientes infértiles portadores de reordenamientos cromosómicos numéricos y estructurales (Sciurano *et al.*, 2007; 2012).

5.1. Silenciamiento y remodelación de la cromatina en el cuerpo XY.

La condensación cromosómica diferencial del cuerpo XY está asociada a la Inactivación meiótica de cromosomas sexuales IMCS (MSCI, por sus siglas en inglés). Esta inactivación ha surgido como un paradigma en el estudio de la regulación epigenética de los genes que se expresan en los cromosomas sexuales meióticos (Turner, 2004). La formación de un cuerpo XY heteropicnótico como una manifestación citológica de la inactivación transcripcional de los cromosomas sexuales se descubrió hace varias décadas (Solari, 1974). En el cigonema y en los estadios tempranos del paquinema, el grado de condensación de la cromatina del cuerpo XY es menor al de los autosomas, mientras que, en el paquinema medio el grado de empaquetamiento y su regularidad se hace mayor en el par XY. En el paquinema más avanzado y en el diplonema temprano, la cromatina autosómica comienza a descondensarse. Después del diplonema temprano, tanto la cromatina del cuerpo XY como la autosómica, está completamente empaquetada hasta alcanzar la metafase I, donde se hace imposible diferenciarlas (Solari, 1974).

Turner (2002) y otros autores propusieron que las proteínas involucradas en la IMCS eran diferentes de aquellas involucradas en la inactivación del gen XIST. Esta remodelación de la cromatina sexual para formar el cuerpo XY está mediada por la asociación de proteínas específicas de la cromatina y por modificaciones químicas de las histonas, tales como la fosforilación, la ubiquitinización y la metilación o

acetilación. Una de las modificaciones más relevantes es la presencia de la variante histónica γ -H2AX desde el inicio del paquinema, inducida por la fosforilación de la histona nucleosomal H2AX mediante la quinasa ATR (ATM-and RAD3 related) y posteriores modificaciones tales como la trimetilación de la lisina 9 en la histona H3 (Franco *et al.* 2007, Sciurano *et.al.*, 2007). La fosforilación de esta histona puede ser un fenómeno esencial para la condensación y el silenciamiento de los cromosomas sexuales X e Y. A su vez, se ha propuesto que la proteína BRCA1 participa en el reclutamiento de la ATR hacia la cromatina de tipo sexual (Turner *et al.*, 2004). Estas proteínas (BRCA1 y γ -H2AX) también se encuentran en las regiones no sinapsadas de los autosomas de los espermatoцитos de ratón (Turner *et al.*, 2004; 2005).

En los pacientes portadores de translocaciones cromosómicas, la mayoría de los multivalentes formados se asocian al cuerpo XY por sus extremos libres asinápticos y la cromatina de tales segmentos asinápticos está marcada por la variante histónica γ -H2AX que se incrementa gradualmente cuando el multivalente de la translocación se asocia al cuerpo XY (Sciurano *et al.*, 2007).

En la meiosis de los murciélagos portadores de sistemas sexuales múltiples, se observan dos regiones, separando al trivalente XY_1Y_2 en dos partes independientes, una que involucra al $X-Y_2$ autosómico que presenta actividad transcripcional, y otra que corresponde al $X-Y$ original (Noronha *et al.*, 2001; 2004; 2009); de este modo, se presume que el cromosoma X, en las regiones asinápticas del mismo, podría inducir un proceso de “extensión de la inactivación de la cromatina”, en donde sería posible que esta inactivación conlleve a una falta de transcripción génica en las regiones autosómicas translocadas al cromosoma X y en donde la inactivación de los cromosomas sexuales ocurra también en la región autosómica (Solari, 1971; 1994).

Estudios en otros murciélagos del género *Carollia*, que poseen este tipo de translocaciones X-autosoma, muestran que el X original está separado del autosoma por un bloque de heterocromatina (Kasahara and Dutrillaux, 1983; Noronha *et al.*, 2001; 2004) y se considera a éste como el responsable de impedir la extensión de la inactivación del X al segmento autosómico durante la meiosis (Solari and Pigozzi, 1994; Noronha *et al.* 2001; 2004; 2009). También se ha evidenciado la presencia de metafases II con diferencias respecto al número haploide, lo que permite determinar la segregación de los dos cromosomas Y, el original y el de naturaleza autosómica, moviéndose a uno de los dos polos y el X a otro polo, asegurando así la producción de gametas balanceadas (Pigozzi and Solari, 1994; Noronha *et al.*, 2009). Los autosomas translocados al X, presumiblemente mantienen la actividad génica original sin interferir con la determinación sexual (Noronha *et.al.*, 2009).

6. Sistema cromosómico sexual XY_1Y_2 .

La clase mamíferos, con la excepción de la subclase Monotremas (5 especies), posee un sistema cromosómico sexual XX en hembras y XY en machos, el cual está presente en la enorme mayoría de las cinco mil especies vivientes de mamíferos. Sin embargo, entre este grupo existen excepciones a dicho patrón, como los sistemas sexuales múltiples en marsupiales (Sharp, 1982), en lemmings (Akhverdyan and Fredga, 2001), y primates (Rahn *et al.*, 1996; Mudry *et al.*, 1998). Asimismo, el sistema múltiple XX/XY_1Y_2 (producto de la translocación X-autosoma) presente en algunos murciélagos del género *Artibeus* pertenecientes a la familia Phyllostomidae, ha sido reportado como un patrón predominante en la determinación sexual (Backer

and Hsu, 1970; Noronha *et al.*, 2009; Solari, 1994; Yonenaga *et al.*, 1969; Fredga K., 1970; Hsu *et al.*, 1978; Baker *et al.*, 1979; Tucker and Bickham, 1986).

En 1994, Solari y Pigozzi estudiaron la conducta de apareamiento y la respectiva segregación del trivalente sexual XY_1Y_2 en la especie *Artibeus lituratus*, demostrando que los cromosomas originales del trivalente ($Xp-Y_1$) mantienen la asociación término-terminal típica de los mamíferos euterios durante la meiosis (Solari, 1971; 1994), más una región de apareamiento adicional entre las regiones neosexuales $Xq-Y_2$ (Noronha *et al.*, 2001), formando así un cuerpo XY_1Y_2 . En la zona diferencial, la condensación típica de la cromatina del XY no se extiende hacia las regiones autosómicas, sino por el contrario, en estas regiones la cromatina autosómica presenta una condensación similar a la de los autosomas bivalentes (Solari and Pigozzi, 1994). Esta característica puede interpretarse como una estrategia para evitar el silenciamiento de genes necesarios para el desarrollo de la meiosis, la formación de gametas aneuploides y la consecuente infertilidad (Tucker and Bickham, 1986). De esta manera, se ha determinado que en *A. lituratus* el trivalente sexual está formado en parte por los cromosomas sexuales originales y en otra por un autosoma reordenado, similar al que se forma en la translocación de Searle en los espermatoцитos de ratón (Solari, 1971). Estos sistemas de determinación sexual abren el interrogante sobre el establecimiento de dichas características en una población, ya que el origen de este sistema cromosómico, así como la presencia de un sistema XY_1Y_2 (Noronha *et al.*, 2009) en otras 23 especies de las 141 reportadas (Muñoz-Arango, 2001) de esta familia está asociado a un mecanismo de fijación evolutiva de translocaciones entre gonosomas y autosomas (Tucker and Bickham, 1986).

7. Patrón de bandeo C, G y NORs de *Artibeus lituratus* y *Artibeus planirostris*.

La distribución de NORs (regiones organizadoras nucleolares) en la familia Phyllostomidae es frecuentemente autosómica, con excepciones de *Carollia perspicilata* y *C. castanea*, en donde las NORs están presentes en los sistemas múltiples sexuales. Así como *Artibeus*, *Carollia perspicilata* porta una translocación X-autosoma y presenta un número variable de NORs por metafase, cuya localización se observa en los rearrreglos del cromosoma X (Hsu *et al.*, 1968; Yonenaga *et al.*, 1969; Baker, 1979; Kasahara and Dutrillaux, 1982; Noronha *et al.*, 2001; 2004; 2009).

El género *Artibeus*, objeto de esta Tesina, es ampliamente conocido como el grupo de murciélagos que exhibe una baja tasa de evolución de su cariotipo dado que: 1) muchas especies pertenecientes a esta familia tienen el mismo número diploide ($2n=30/31$), y 2) el patrón de bandeo G es esencialmente idéntico (Baker and Bickham, 1980; Baker *et al.*, 2003, Lemos-Pinto *et al.*, 2012). Los datos obtenidos mediante las técnicas de FISH y tinciones con plata (Ag-NOR) en *A. lituratus*, *A. planirostris* y *A. obscurus*, muestran tres pares de NORs en la región terminal de los brazos cortos de los cromosomas 5, 6 y 7 (Kasahara and Dutrillaux, 1983) en las regiones correspondientes a las constricciones secundarias de los brazos cortos. Estos autosomas subtelocéntricos, presentan una notoria variación en la expresión y en su actividad según sea la especie. Además, se ha podido distinguir 2 sitios patrones de rDNA: 1) en las regiones distales del brazo corto de los pares 5, 6 y 7 en *A. lituratus*, *A. jamaicensis*, *A. fimbriatus*, y 2) en la región intersticial de los brazos largos de los pares 9, 10 y 13 (Santos *et al.*, 2002).

El bandeo G y C, así como la localización de las NORs, contribuyen a una mejor definición de la evolución del cariotipo de la familia Phyllostomidae. Por eso, la distribución de heterocromatina constitutiva ha sido evaluada y comparada en varios individuos del género *Artibeus* con otros filostómidos, demostrando una extensa similitud en el patrón de localización, ya que se encuentra localizada en la región pericentromérica de todos los autosomas del género, y como un bloque pequeño de heterocromatina en la región terminal de los pares 5, 6 y 7 (Rodríguez *et al.*, 2000; Barros *et al.*, 2009; Sbragia *et al.*, 2010). Por otro lado, existe un conjunto particular de bloques de heterocromatina constitutiva en *A.liturgatus*, *A. planirostris*, *A.obscurus*, y en *A. fimbriatus*, mostrando una individualización y diferenciación de cada especie en este tipo de comparaciones cariotípicas. Adicionalmente, se evidencia la presencia de bloques de heterocromatina en la región terminal de los pares 5, 6 y 7 (Lemos-Pinto, 2012), considerando esto como una característica compartida de la subfamilia Stenordematinae a la que pertenecen las dos especies de interés para esta tesina: *Artibeus liturgatus* y *Artibeus planirostris*.

A.planirostris tiene bloques intersticiales de heterocromatina en el brazo largo de los pares 1, 2, 5 y 6 y en la región terminal del brazo corto del par 9. En *A.liturgatus* el cromosoma Y_2 muestra un bloque C-positivo en la región centromérica (Solari and Pigozzi, 1994; Tucker, 1986).El patrón de Y_1 no ha podido ser determinado con precisión debido a su tamaño puntiforme (Lemos-Pinto, 2012).

En las dos especies, los complementos autosómicos son morfológicamente similares a otros, excepto por el tamaño de los cromosomas sexuales Y_1 e Y_2 , los cuales varían desde un elemento puntiforme a un cromosoma acrocéntrico bien definido como fue descrito por Hsu y colaboradores (1968).

OBJETIVOS

1. Analizar el comportamiento sináptico de los ejes cromosómicos en murciélagos del género *Artibeus* (*Artibeus lituratus* y *Artibeus planirostris*), utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas del complejo sinaptonémico (C.S) y cohesinas en los cromosomas sexuales múltiples mediante inmunolocalización fluorescente.
2. Describir la organización ultraestructural de la cromatina gono-autosómica por microscopía electrónica asociando los diferentes grados de compactación de ésta en el cuerpo XY_1Y_2 con diferentes modificaciones de histonas.
3. Proponer un mecanismo molecular básico que explique por qué no hay extensión de la inactivación de la cromatina hacia la región autosómica en los sistemas múltiples de las especies analizadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toda la metodología de esta tesina está elaborada según el protocolo para el estudio del cuerpo XY como biomarcador, de Sciurano y Solari (2014).

Material de estudio.

Tejido testicular de machos adultos de las especies *Artibeus lituratus* (n=3) y *Artibeus planirostris* (n=1) de la familia Phyllostomidae, recolectados de poblaciones naturales en la región Amazónica Este (Autorización IBAMA 13248 del Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis para la captura permanente), estado do Pará-Brasil (ver agradecimientos al equipo del Dr. Julio Pieczarka, laboratorio de citogenética, Universidade Federal do Pará-Brasil), proveniente de necropsias bilaterales frescas, y depositado en frascos estériles con medio isotónico (solución salina balanceada de Hanks). El tejido testicular es trasladado a temperatura ambiente al laboratorio, en donde es dividido en pequeños trozos sobre una placa de cera dental, usando una navajita nueva y limpia. Estas pequeñas secciones serán luego destinadas a diferentes tipos de análisis: a) diagnóstico histológico con métodos de rutina (fijación en solución de Bouin sobre parafina y coloreada con hematoxilina-eosina) y secciones inmunohistoquímicas en parafina; b) análisis histológico de cortes semi-finos con microscopía de luz (fijación en glutaraldehído, postfijación en tetróxido de osmio, y coloración con azul de toluidina); c) análisis ultraestructural del cuerpo XY₁Y₂ por microscopía electrónica; d)

inmunolocalización de las proteínas del cuerpo XY₁Y₂ en extendidos de espermatocitos.

Extendidos de Complejos Sinaptonémicos de espermatocitos.

El tejido testicular, sin túnica albugínea, se corta en pequeños pedazos que se sumergen durante 30-40 minutos en una solución hipotónica de extracción que contiene: 30mM de Tris, 50mM de sacarosa, 17mM de citrato de sodio, 5mM de EDTA, 0.5mM de DTT y 0.5mM de PMSF. Luego de este tiempo se coloca el tejido en una solución de sacarosa 100mM, pH 8.2, y se maceran los tubos seminíferos aplastándolos suavemente contra dos portaobjetos esmerilados con una gota de la solución de sacarosa. La suspensión celular se aspira con un microcapilar y se coloca una gota de la misma sobre un portaobjetos con 80µl de solución fijadora: 2% de paraformaldehído y 0.15% de detergente tritón X100, pH 8.5-9, para inmunolocalización de proteínas y, 4% de paraformaldehído y 0.15% de tritón X100, pH 8.5-9, para microscopía electrónica de complejos sinaptonémicos. Los preparados se dejan secar durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Finalmente se lavan con 0.4% del detergente Photoflo 200 durante 5 minutos, y se secan al aire. Estos preparados se conservan a -70°C para luego ser utilizados con las técnicas de microscopía electrónica y para inmunolocalización de proteínas meióticas.

Inmunolocalización fluorescente de proteínas meióticas.

Los preparados de complejos sinaptonémicos conservados en el congelador a -70°C se descongelan y se dejan secar a temperatura ambiente para poder evaluar, bajo el microscopio de contraste de fase, el estado de la cromatina, el contraste de los complejos sinaptonémicos y la distribución del material celular. Los preparados se deben pre-tratar con una solución de bloqueo, con una recuperación antigénica o con una digestión enzimática usando la enzima DNAsa I (ver Sciurano and Solari, 2014) antes de incubar con los anticuerpos primarios específicos de sinapsis (SYCP3, SYCE3, SMC3), de nódulos tempranos de recombinación (RAD51) y de silenciamiento transcripcional (BRCA1, γ -H2AX). En todas las etapas de la inmunodetección, los portaobjetos se mantienen dentro de una cámara húmeda cubierta de la luz y los anticuerpos primarios se incuban durante toda la noche (15-18 horas), a la temperatura y concentración adecuadas (Ver Tabla 1). Posterior al tiempo de incubación, los preparados deben ser lavados con PBS 0.1M, pH 7.4, y se incuban con el anticuerpo secundario que corresponda según el huésped en el que está generado el anticuerpo primario utilizado. El fluorocromo conjugado al anticuerpo secundario (isotiocianato de fluoresceína, FITC ó de tetramil-rodamina, TRICT) se elige teniendo en cuenta la distribución y el tamaño de la proteína, y la superposición de colores que implica una inmunodetección doble o triple. Estos anticuerpos secundarios deben ser incubados por un periodo de 2 horas, tiempo en el cual se vuelven a lavar con PBS y agua bidestilada. Se realiza una contratinción con DAPI (Cf: $0,1\mu\text{g/ml}$) por 5 minutos y se dejan secar a temperatura ambiente en

cámara seca y oscura. Finalmente, se utiliza un medio de montaje (DABCO) para evitar el desvanecimiento de la fluorescencia (antifading). Los núcleos celulares se observan con un microscopio de epifluorescencia Leica DM y se fotografían con cámara digital Leica DFC300 FX. Posteriormente, las imágenes se superponen usando el programa Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Inc., San José, CA., Usa).

Microscopía electrónica de complejos sinaptonémicos.

Se realiza una tinción con nitrato de plata (Howel and Black, 1980), después de examinar los preparados de complejos sinaptonémicos con el microscopio de contraste de fase, seleccionando aquellos de mejor calidad para microscopía electrónica. Se colocan 20 µl de una solución de gelatina al 1% con 0,5% de ácido fórmico puro, y 30µl de solución de nitrato de plata al 50%. Ambas soluciones se mezclan balanceando suavemente el portaobjetos y se coloca un cubreobjetos sobre el mismo. El preparado se incuba a 40-60°C monitoreándose el progreso de la coloración en el microscopio de luz. Una vez coloreado, se retira el cubreobjetos sumergiéndolo en agua destilada; finalmente, se deja secar a temperatura ambiente. Posterior al secado, el portaobjetos se sumerge en una solución de 0.5g de poliestireno (BD Falcon Optilux) en 100ml de cloroformo y se deja secar en estufa a 50-60°C para formar una membrana plástica que permitirá transferir el material celular a grillas de cobre para microscopía electrónica. Las grillas de cobre se pre-tratan con una solución adhesiva de fotocola (Kolux) en benceno, y luego se colocan sobre la capa plástica. Finalmente, el material es

examinado en un microscopio electrónico Zeiss EM 109T equipado con una cámara digital Gatan Es 1000W (Servicio LANAIS- CONICET).

Cortes semifinos coloreados con azul de toluidina.

Se toma una pequeña porción del tejido testicular sin la túnica albugínea y se sumerge en una solución fijadora de 2.5% de glutaraldehído en 0.1M de buffer cacodilato de sodio por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lava con buffer de cacodilato 0.1M (pH 7.3) y se postfija en 2% de tetróxido de osmio en 0.1M de buffer de cacodilato por 1 hora. Después de la fijación y el lavado, las piezas se deshidratan usando alcohol etílico de graduación creciente (40°, 70°, 96° y 100°), se sumergen 10 minutos en óxido de propileno y se dejan hasta el día siguiente a 4°C en una mezcla de partes iguales de óxido de propileno y resina. Se dejan evaporar el óxido de propileno a temperatura ambiente y se incluyen en resina epoxi que se polimeriza en estufa a 60-70°C durante 24 horas. Los cortes finos y semifinos se realizan con un ultramicrotomo Porter-Blum (I. Sorvall, USA).

Para observar con mayor detalle la estructura histológica del tejido testicular con el microscopio de luz, los cortes se colorean con 1% de azul de toluidina a pH básico y a 60-80°C durante 20-30 segundos en una plancha calefactora. Luego se lavan con agua destilada, se dejan secar y se examinan en el microscopio de luz Leica DM. Las estructuras histológicas observadas se fotografían con la cámara digital Leica DFC300 FX.

Cortes de parafina coloreados con hematoxilina-eosina.

Una porción del tejido testicular se fija en líquido de Bouin durante 24 horas, se deshidrata usando alcohol etílico de graduación creciente (70°, 96° y 100°) y se impregna con benceno. Luego se sumerge en *paraplast* (parafina purificada más polímeros sintéticos) a 56-58°C y, finalmente se realiza la inclusión definitiva en moldes de metal. Esta pieza se corta en secciones de 3-5µl de espesor con un micrótopo de deslizamiento. Los cortes se montan en un portaobjetos con albúmina de Mayer, se desparafinan con xilol y se rehidratan mediante pasajes sucesivos de alcohol etílico de graduación decreciente (100°, 96° y 70°) y agua. Los cortes se colorean con hematoxilina–eosina, se montan y se observan en el microscopio de luz.

Microscopía electrónica de cortes finos de tejido testicular.

Los cortes finos, montados en grillas de agujero único oval, recubierto con membrana de Formvar, se tiñen con una solución saturada de acetato de uranilo en alcohol metílico puro durante 10 minutos. Luego se tiñen con una gota de colorante de Reynolds (solución de nitrato de plomo, más citrato de sodio en hidróxido de sodio 1N) por 10 minutos colocados en una caja de Petri con parafina. Se lavan en agua destilada, se dejan secar y se observan con el microscopio electrónico.

Análisis estadístico.

Se realizan mediciones de diversos parámetros longitudinales de los complejos sinaptonémicos: el largo absoluto de los ejes simples y sinapsados del trivalente XY_1Y_2 y de los bivalentes autosómicos, y el índice centromérico utilizando el software Micromasure versión 3.3 (Reeves, 2001).

Los promedios y desvíos estándar correspondientes a dichas mediciones se calculan utilizando el programa Microsoft Excel 2010.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. Las regiones asinápticas del cuerpo XY_1Y_2 están silenciadas transcripcionalmente y presentan γ H2AX.
2. La presencia de bloques de heterocromatina y organizadores nucleolares impiden que haya una extensión de la inactivación transcripcional hacia segmentos autosómicos donde residen genes esenciales para el progreso de la meiosis.
3. Los porcentajes de heterosinapsis (sinapsis no homóloga) en el cuerpo XY_1Y_2 son elevados, y esta heterosinapsis constituiría una vía de escape a la muerte del espermatocito.
4. El cuerpo XY_1Y_2 tiene dos regiones de recombinación: la región de recombinación original entre los dos cromosomas sexuales X e Y (PAR: pseudoautosomal región) y la nueva región de recombinación (neo-PAR) que incluye los segmentos autosómicos del cuerpo XY_1Y_2 .

RESULTADOS

1. **Cariotipo de Complejos Sinaptonémicos en *Artibeus lituratus* y *Artibeus planirostris*.**

En el desarrollo de esta tesina, se observaron cientos de espermatoцитos primarios obtenidos del tejido testicular de dos especies de murciélagos pertenecientes a la familia Phyllostomidae: *Artibeus lituratus* y *Artibeus planirostris*. Para el análisis del cariotipo de complejos sinaptonémicos (CS) se realizó el recuento de 20 núcleos de espermatoцитos primarios en *A. lituratus* y 21 en *A. planirostris*. Los parámetros de evaluación del complemento cromosómico que permitieron elaborar el idiograma para cada una de las especies (Figuras 1 y 2) están basados en la longitud relativa y el índice centromérico de cada CS (Tablas 2 y 3).

S.C	Longitud Absoluta	DS	Longitud relativa	DS	Índice centromérico	DS
1	36,3	5,7	9,7	0,9	0,45	0,02
2	32	5,2	8,5	0,5	0,42	0,42
3	30,2	3,9	8	0,3	0,39	0,11
4	28,6	4,1	7,6	0,4	0,33	0,09
5	27,6	3,9	7,3	0,3	0,31	0,09
6	26,1	3,8	6,9	0,3	0,35	0,1
7	24,4	3,7	6,5	0,3	0,36	0,08
8	22,8	3,9	6	0,3	0,36	0,1
9	21,4	2,8	5,7	0,2	0,43	0,06
10	20	3,7	5,3	0,6	0,42	0,06
11	15,9	2,8	4,2	0,5	0,45	0,04
12	13,1	2	3,5	0,3	0,45	0,03
13	11,4	2,1	3	0,3	0,44	0,03
14	9,9	2	2,6	0,4	0,45	0,03
X	39,3	7,9	10,5	1,9	0,19	0,06
Y2	9,7	2,1	2,6	0,6	0,25	0,09
Y1	5	1,1	1,3	0,3	0,4	0,07

Tabla 2. Valores promedio de las mediciones absolutas y relativas de complejos sinaptonémicos en 20 núcleos de espermatoцитos de *Artibeus lituratus*.

S.C	Longitud Absoluta	DS	Longitud relativa	DS	Índice centromérico	DS
1	32,6	3,3	9,7	0,7	0,42	0,05
2	28,4	2,4	8,4	0,5	0,44	0,06
3	27,1	2,5	8	0,4	0,42	0,08
4	26,1	2,7	7,7	0,4	0,38	0,09
5	25,3	2,4	7,5	0,4	0,3	0,09
6	23,7	2	7	0,4	0,29	0,07
7	21,8	2,3	6,4	0,3	0,35	0,1
8	20,3	1,9	6	0,3	0,4	0,07
9	19,5	1,9	5,8	0,2	0,38	0,08
10	17,9	2,2	5,3	0,4	0,4	0,09
11	15,3	1,7	4,5	0,4	0,44	0,05
12	12,5	1,2	3,7	0,3	0,45	0,03
13	11,2	1	3,3	0,2	0,45	0,02
14	9,8	1,4	2,9	0,3	0,45	0,04
X	32,8	8,6	9,7	2,4	0,24	0,08
Y2	7,3	1,7	2,1	0,4	0,19	0,09
Y1	3,7	1,7	1	0,5	0,3	0,12

Tabla 3. Valores promedio de las mediciones absolutas y relativas de complejos sinaptonémicos en 21 núcleos de espermatozoides de *Artibeus planirostris*.

Cada uno de los cariotipos de CS está compuesto por catorce cromosomas bivalentes y un trivalente sexual XY₁Y₂. Este cariotipo coincide con el descrito en la literatura citada: 2n=30/31 (Yonenaga *et al.*, 1969; Backer and Hsu, 1970; Fredga K, 1970; Hsu *et al.*, 1978; Baker *et al.*, 1979; Tucker and Bickham, 1986; Solari, 1994; Noronha *et al.*, 2009;). La localización de los centrómeros (cinetocoros) fue observada mediante la técnica de inmunofluorescencia, con el suero CREST, y los CS fueron localizados mediante la presencia de la cohesina SMC3 de los elementos laterales. Como parte de esta tesis se hace una descripción del trivalente sexual, tanto a nivel ultraestructural como de inmunolocalización fluorescente de proteínas específicas, en donde se determina la presencia de un cromosoma X acrocéntrico en *A. lituratus*, y un X submetacéntrico en *A. planirostris*, siendo éstos los de mayor

longitud del juego cromosómico para las dos especies; un pequeño cromosoma Y_1 metacéntrico en *A. lituratus* y acrocéntrico en *A. planirostris*, así cómo un cromosoma Y_2 acrocéntrico en las dos especies(Fig. 1 A-B).

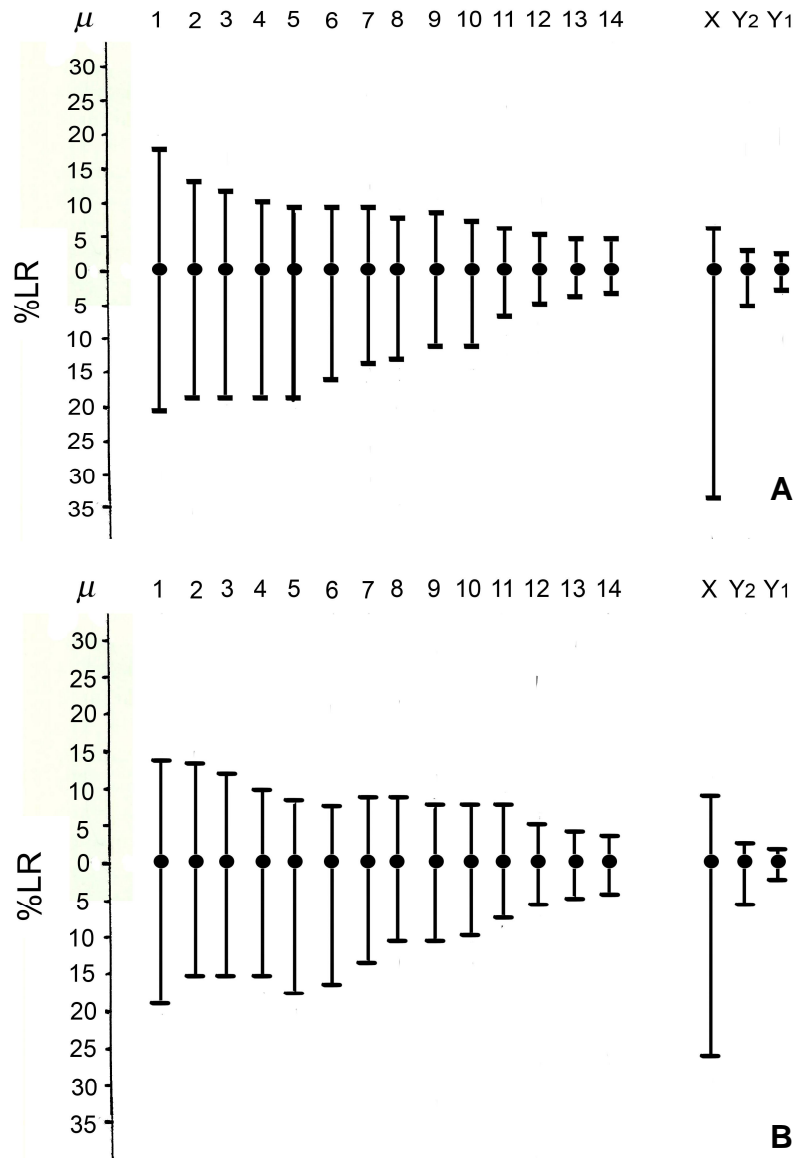


Figura 1. Idiogramas de complejos sinaptonémicos procesados a partir de inmunolocalización fluorescente de proteínas asociadas a los elementos laterales (SMC3) y a los centrómeros (CREST). (A) Idiograma para *A. lituratus* basado en los valores promedio de 20 espermatocitos en paquinema. (B) Idiograma para *A. planirostris* basado en los valores promedio de 21 espermatocitos en paquinema.

2. Comportamiento sináptico del trivalente sexual XY_1Y_2 en *Artibeus lituratus* y *Artibeus planirostris* a lo largo del paquinema.

Los individuos analizados presentan el patrón típico de sinapsis en los cromosomas sexuales, formando un trivalente XY_1Y_2 . El análisis de espermatocitos en paquinema permitió determinar la estructura y longitudes de los segmentos sinapsados y no sinapsados del trivalente sexual, que fueron representados en diagramas (Figura 2) teniendo en cuenta la longitud relativa de los complejos sinaptonémicos entre $X-Y_1$ y $X-Y_2$, y de los ejes simples no sinapsados en los multivalentes de espermatocitos paquiténicos. La apariencia general del trivalente sexual XY_1Y_2 es similar en las dos especies y concuerda con la descripción hecha por Solari y Pigozzi (1994) para *A. lituratus*.

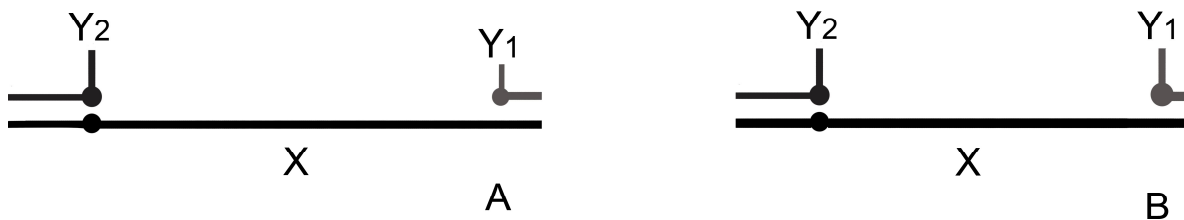


Figura 2. Estructura del trivalente sexual XY_1Y_2 en *A. lituratus* (A) y en *A. Planirostris* (B). En las dos especies la región larga del cromosoma X se aparea con el cromosoma original Y_1 manteniendo la típica asociación término-terminal de los mamíferos euterios; mientras que, Y_2 se aparea con la región corta (rearreglo) del cromosoma X.

El análisis de microextendidos de espermatocitos primarios mediante microscopía electrónica muestra las particularidades del trivalente sexual XY_1Y_2 en murciélagos del género *Artibeus* (Figura 3). En las dos especies se pudo observar una asociación

gradual de los tres componentes del trivalente sexual: 1) al inicio del paquinema, una sinapsis parcial entre los cromosomas X-Y₁ y X-Y₂; 2) desde el paquinema medio hasta el final del mismo estadio, una sinapsis completa de los cromosomas Y₁ e Y₂ con el X. Posteriormente, se observó el ovillamiento característico de los cromosomas sexuales en mamíferos euterios (Figura 3E). En *A. planirostris* se observó un leve retraso de la sinapsis entre el cromosoma Y₁ y el X al inicio del paquinema (Figura 3 A), que lentamente van uniéndose a medida que avanza el estadio, hasta llegar a una sinapsis total al final del paquinema (Figura 3C); además el cromosoma X muestra fibrilaciones de su eje diferencial durante todo el paquinema. En *A. lituratus* no se observó el retraso de la sinapsis que involucra al cromosoma Y₁, observada en *A. planirostris*; en este individuo se muestra un engrosamiento del eje del X en la región diferencial, además de excrecencias proteínicas a lo largo del mismo (Figura 3D).

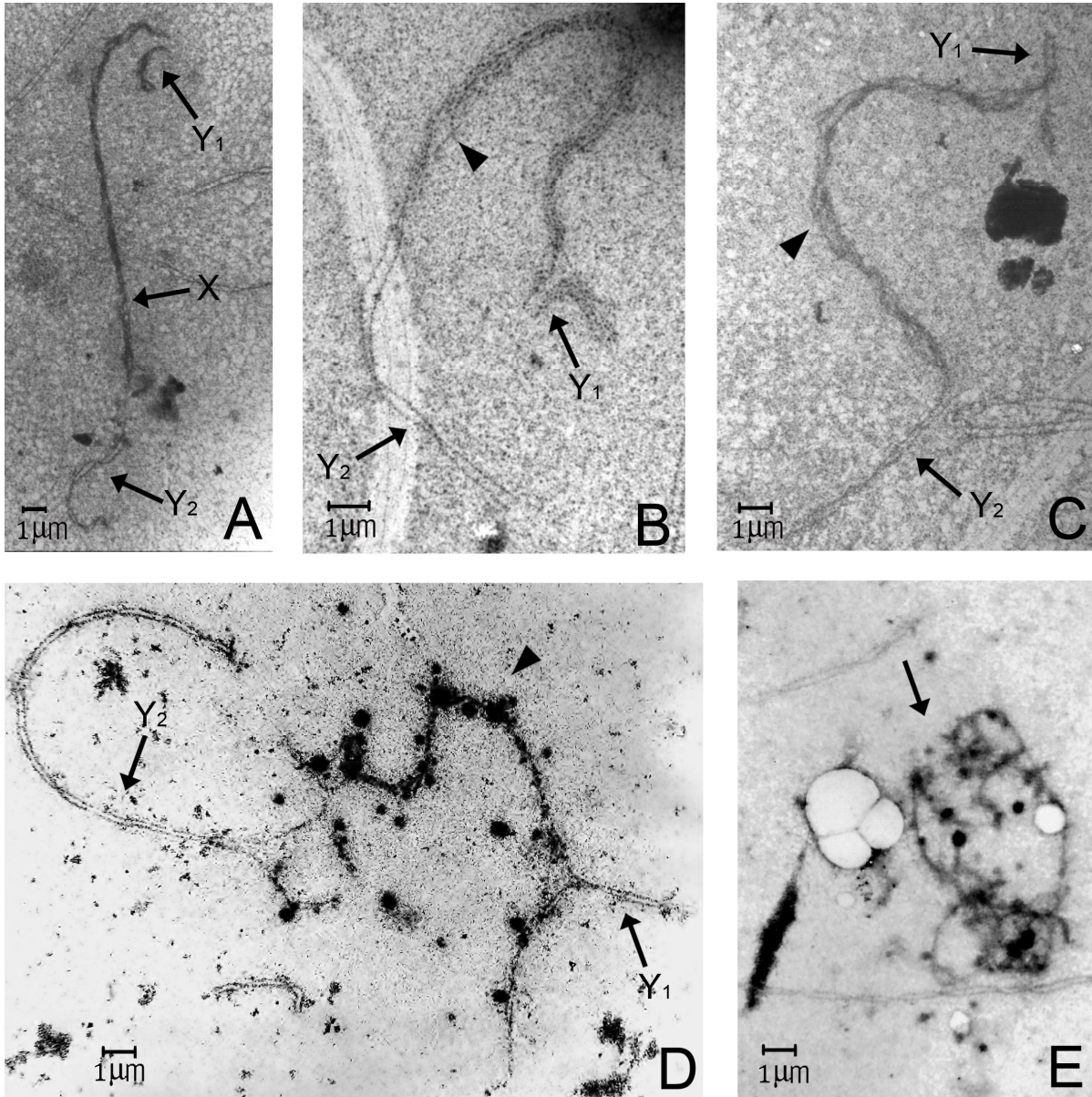


Figura 3. Micrografía electrónica del comportamiento del trivalente sexual XY_1Y_2 de espermatocitos en paquinema de *Artibeus*. (A) Paquinema temprano en *A. planirostris* que muestra los cromosomas X-Y₂ completamente sinapsados y el Y₁ en vía de sinapsis. (B) Paquinema medio en *A. planirostris*, donde se ve la pequeña región de sinapsis entre Xq-Y₁, y fibrilaciones de los ejes no sinapsados del cromosoma X en la zona diferencial (cabeza de flecha) y del Y₁. (C) Sinapsis completa entre Xq-Y₁ y Xp-Y₂ en *A. planirostris*. La cabeza de flecha muestra fibrilaciones de la zona diferencial (no sinapsado) del cromosoma X. (D) Trivalente sexual XY_1Y_2 de *A. lituratus* en un paquinema temprano-medio, que muestra dos complejos sinaptonémicos (flechas) y la región diferencial engrosada con algunas excrecencias proteínicas (cabeza de flecha). (E) Paquinema tardío en *A. lituratus* mostrando al trivalente sexual como un ovillamiento, característica típica de este estadio en euterios (flecha).

3. Inmunolocalización fluorescente de proteínas meióticas en *Artibeus lituratus* y *Artibeus planirostris*.

La inmunolocalización fluorescente de proteínas meióticas permitió definir los sitios de sinapsis entre los cromosomas que conforman el trivalente sexual XY_1Y_2 de las dos especies. A partir de la observación de espermatoцитos por microscopía óptica de epifluorescencia, se evidenció la presencia de la proteína principal del complejo sinaptonémico SYCP3, que se extiende a lo largo de los ejes cromosómicos simples (Figura 4C), en forma similar a la cohesina de los elementos laterales SMC3 (Figura 4 A, B, D). En *A. planirostris* (Figura 4B) se puede observar al cromosoma Y_2 completamente sinapsado. La proteína principal de elemento central del complejo sinaptonémico SYCE3 fue localizada a lo largo de las regiones de sinapsis entre el cromosoma $X-Y_1$ y entre $X-Y_2$ (Figura 4D). Los cinetocoros fueron localizados mediante el suero CREST.

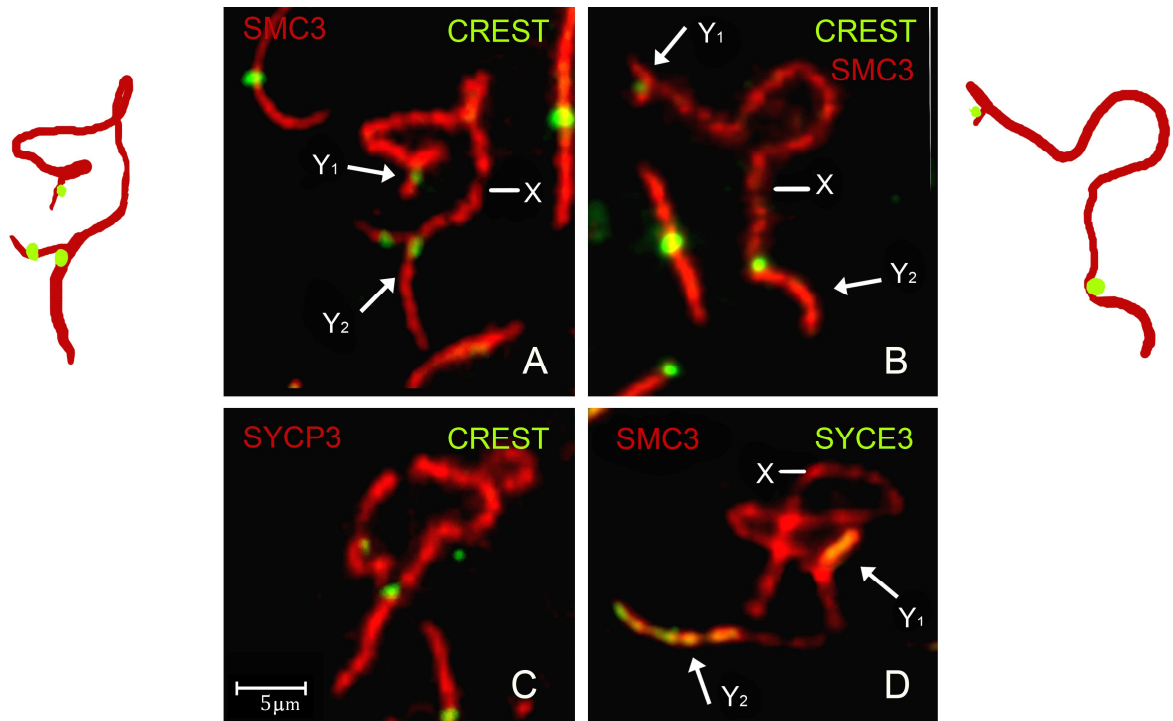


Figura 4. Inmunolocalización fluorescente de proteínas meióticas en *A. lituratus* y *A. planirostris*. La inmunolocalización de los elementos laterales con la cohesina SMC3, el anticuerpo SYCP3 y de los cinetocoros con suero CREST, permite identificar las regiones de sinapsis (flechas) y las regiones asinápticas del trivalente sexual XY_1Y_2 en *A. lituratus* (A) y *A. planirostris* (B-C). (D) Inmunolocalización de los elementos laterales con la cohesina SMC3, y del elemento central con SYCE3 permite diferenciar las regiones de sinapsis (ejes verde-amarillos, flechas) de las regiones no sinapsadas (ejes rojos) en *A. lituratus*. En A y B se distingue claramente que las regiones sinapsadas son más uniformes y un poco más anchas que las no sinapsadas.

4. Nódulos de recombinación.

La búsqueda del complejo de recombinasas RAD51/DMC1, a través de la inmunolocalización con anticuerpo anti-RAD51, permitió demostrar la presencia de focos tempranos de recombinación en los CS desde el leptonema hasta el paquinema medio. Durante el paquinema, se pueden observar nódulos de recombinación tempranos en el trivalente sexual XY_1Y_2 , localizándose principalmente

a lo largo de las regiones no sinapsadas (Figura 5B), los cuales desaparecen gradualmente al final del paquinema. La microscopía electrónica mediante tinción con ácido fosfotúngstico (PTA) permite visualizar un nódulo de recombinación tardía entre los ejes sinapsados de los cromosomas X-Y₂ (Figura 5 A).

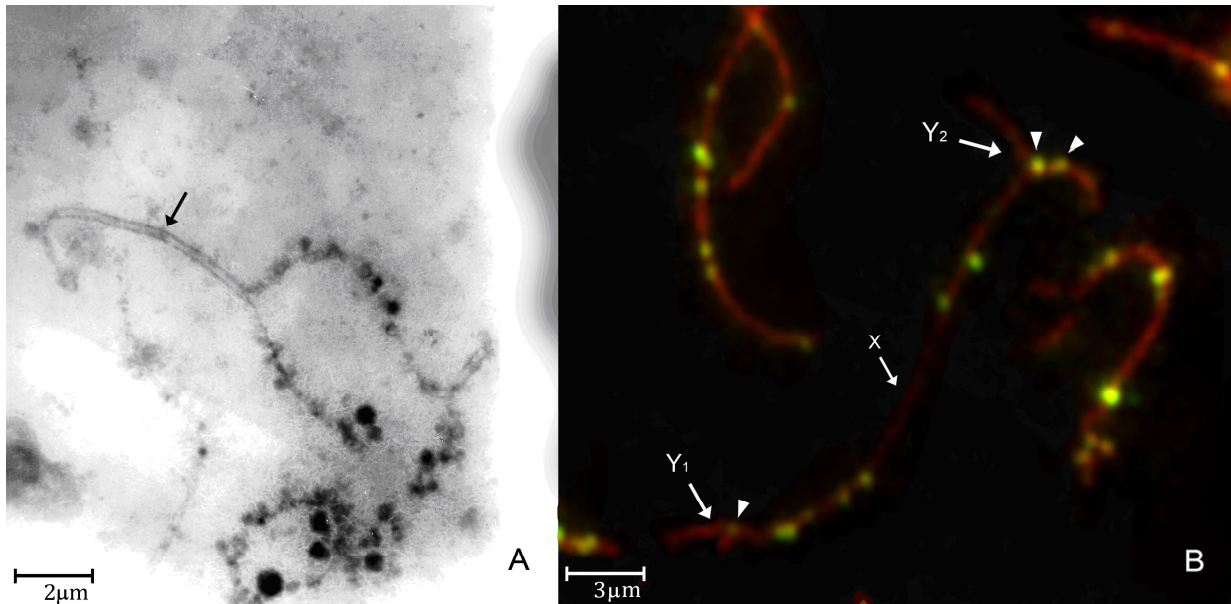


Figura 5. Inmunolocalización fluorescente de los focos de recombinación tempranos y microscopía electrónica de nódulos de recombinación tardíos en el trivalente sexual XY₁Y₂. (A) Tinción con PTA en *A. lituratus* muestra la presencia de un único foco de recombinación tardío entre la sinapsis de los cromosomas X-Y₂ (flecha). (B) Inmunolocalización fluorescente con el anticuerpo RAD51 (cabezas de flechas) en *A. lituratus*, mostrando los focos de recombinación tempranos (focos verde-amarillos), localizados principalmente en las regiones asinápticas del trivalente XY₁Y₂.

5. Remodelación de la cromatina y silenciamiento transcripcional en el trivalente sexual XY₁Y₂.

El análisis de cortes finos de núcleos de espermatoцитos mediante microscopía electrónica, muestra al cuerpo XY₁Y₂, unido a la envoltura nuclear, en el que se

distinguen dos diferentes regiones: una interna, correspondiente a la región diferencial del cromosoma X que está fuertemente compactada, y una más periférica y más esparcida que corresponde a la región de sinapsis entre los cromosomas X-Y₁ y X-Y₂, haciendo evidente una remodelación de la cromatina de tipo sexual en el cuerpo XY₁Y₂ (Figura 6 A y E).

Mediante inmunolocalización fluorescente se encontró a la histona variante γ -H2AX presente en la cromatina de la región asináptica de todos los multivalentes analizados de *A. lituratus* (Figura 6C y D) y de *A. planirostris* (Figura 6 G e I). Asimismo, la inmunodetección con BRCA1 mostró la presencia de dicha proteína en los segmentos asinápticos del trivalente sexual XY₁Y₂ para las dos especies (Figura 6B, F, H).

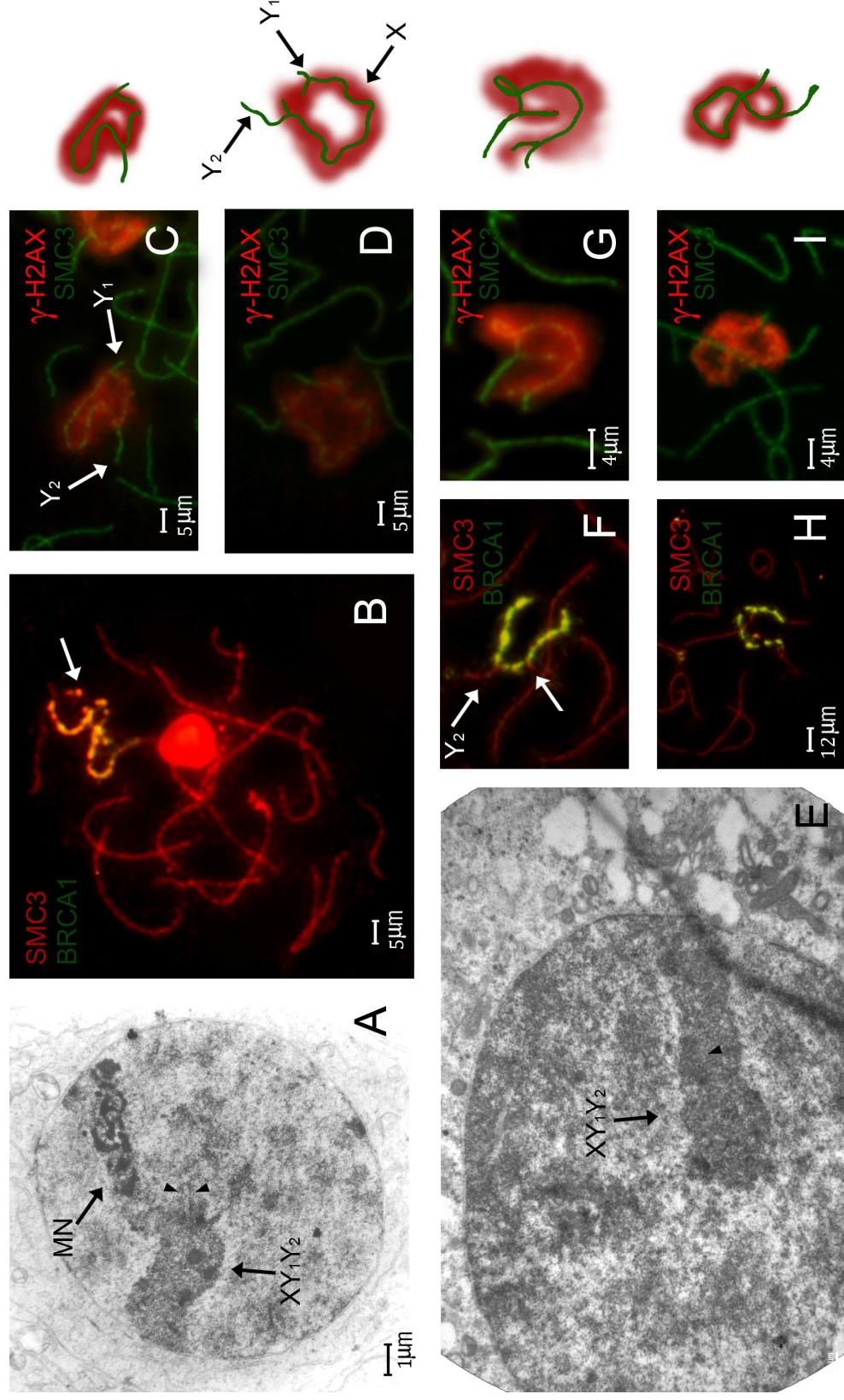


Figura 6. Silenciamiento y remodelación diferencial de la cromatina en el cuerpo sexual XY₁Y₂ de *Artibeus lituratus* (A-D) y *Artibeus planirostris* (E-I). Micrografía electrónica de cortes finos de espermatocitos primarios de *A. lituratus* (A) en donde se observa el cuerpo XY₁Y₂ (flecha), dos ejes sinapsados del trivalente sexual (cabezas de flechas) y parte del material nucleolar (MN); y en *A. planirostris* (E) en donde se hace evidente una mayor compactación (cabeza de flecha) de la cromatina de tipo sexual en el cuerpo XY₁Y₂. Inmunolocalización con BRCA1 en paquinema tardío, presente en la región diferencial del trivalente sexual XY₁Y₂ de *A. lituratus* (B) y *A. planirostris* (F, H). Las flechas indican el largo sitio de sinapsis entre los cromosomas X-Y₂ y el pequeño sitio de sinapsis entre X-Y₁. La variante histónica γ -H2AX está presente sobre la cromatina no sinapsada del cuerpo XY₁Y₂ en las dos especies (C, D, G, I).

DISCUSIÓN

1. El sistema sexual múltiple XY_1Y_2 en *Artibeus lituratus* y *Artibeus planirostris*.

Los datos obtenidos en la elaboración de esta tesina concuerdan con los descritos en la literatura en cuanto al número diploide, morfología cromosómica y determinación del trivalente sexual XY_1Y_2 en *Artibeus lituratus* y *Artibeus planirostris* (Baker and Hsu, 1970; Solari and Pigozzi, 1994; Backer *et al.*, 2003; Lemos-Pinto, 2012). Los complementos autosómicos presentan morfología similar entre ellos, variando desde un cromosoma X acrocéntrico en *A. lituratus* y un X submetacéntrico en *A. planirostris*, y dos pequeños cromosomas Y que varían de tamaño: desde un cromosoma Y_1 acrocéntrico y poco definido en *A. planirostris*, hasta un cromosoma Y_1 metacéntrico bien definido en *A. lituratus*, y un Y_2 acrocéntrico para las dos especies. El sistema de determinación sexual múltiple XY_1Y_2 ha sido reportado dentro del género *Artibeus* (Solari and Pigozzi, 1994) y para otras 23 especies de la familia Phyllostomidae, como el tipo predominante de la determinación sexual en este grupo (Baker and Hsu, 1970; Solari, 1994; Baker *et al.*, 2003; Noronha *et al.*, 2009; Lemos-Pinto *et al.*, 2012). En mamíferos, este sistema ha sido ampliamente reportado (Solari, 1994; Gruetzner *et al.*, 2006) y se cree originado a partir de una translocación gonosoma-autosoma, que en la meiosis se convierte en una estructura trivalente sexual con dos regiones de apareamiento independientes: una región de apareamiento del Y_1 original con Xq llamada región pseudoautosómica, donde los cromosomas se encuentran de forma término-terminal, y otra región de

apareamiento entre el segmento translocado del cromosoma Xp y su homólogo autosómico Y₂ (Solari and Pigozzi, 1994; Rodriguez *et al.*, 2003; Noronha *et al.*, 2001; 2004). Por lo tanto, el apareamiento de la región pseudoautosómica en los cromosomas sexuales de estas dos especies es similar al que presentan la mayoría de mamíferos euterios (Solari, 1994), mientras que el apareamiento autosómico entre los cromosomas translocados mantienen actividad génica, con formaciones de quiasmas de la misma forma que los autosomas bivalentes (Noronha *et al.*, 2001). La preservación de la región pseudoautosómica en los cromosomas sexuales translocados podría actuar como un mecanismo para evitar la formación de gametas aneuploides (Pigozzi and Solari, 1994).

Mediante la inmunolocalización de proteínas del CS y mediante microscopía electrónica realizadas en el transcurso de esta tesina, se observó que al final del paquinema, los cromosomas Y₁ e Y₂ presentan un apareamiento completo o casi completo con el X, involucrando aun, aquellos ejes que se creían asinápticos (Noronha, 2001) (ver resultados). Por otra parte, en la literatura citada se ha planteado que existe un bloque de heterocromatina que permite la independencia en el comportamiento entre el XY original (X-Y₁) y el XqY₂, considerándose como el mecanismo que separa los ejes de los cromosomas XY (X-Y₁) originales de los segmentos autosómicos en el trivalente sexual XY₁Y₂ de *A. lituratus*, impidiendo así la extensión de la inactivación génica de la región autosómica (Kasahara and Dutrillaux, 1983; Delobel *et al.*, 1998; Noronha *et al.*, 2001; 2004), y de la misma manera esta hipótesis se aplica para las NORs de *C. perspicilata*, pues esta especie presenta NORs en los cromosomas del sistema sexual XY₁Y₂ (Noronha, 2004). Según Solari (1994) y Lemos-Pinto (2011) en *A. lituratus* y *A. planirostris*, estas

NORs sólo están presentes en los cromosomas 5, 6, 7 y 9, y no en los cromosomas sexuales X, Y₂ e Y₁, como ocurre en *C. perspicilata* (Noronha, 2001; 2004); por lo tanto, no podría ser éste, el mecanismo de inactivación de la extensión de la heterocromatina en las dos especies analizadas en esta tesina.

2. La presencia de RAD51, γ -H2AX y BRCA1 en la cromatina asináptica y su relación con el cuerpo XY₁Y₂.

γ -H2AX es una forma fosforilada de la histona H2AX y un buen marcador de la remodelación de la cromatina alrededor de los sitios donde se produjeron las fracturas de doble cadena del ADN (FDCs) en células somáticas, además de ser un componente esencial en el desarrollo de la meiosis masculina. γ -H2AX es formada inmediatamente después de ocurrir las FDCs, originadas por el complejo SPO11 durante el leptonema, y desaparece de los autosomas sinápticos al final del cigonema. Asimismo, γ -H2AX es formada y mantenida en el cuerpo XY₁Y₂, desde el principio del paquinema hasta el final de este estadio. El primer proceso mencionado depende principalmente de la quinasa ATM (Ataxia telangiectasia-mutated), mientras el segundo, depende de la quinasa ATR (Turner *et al.*, 2004) y al parecer se produce independientemente de las FDCs inducidas por SPO11.

Las observaciones en ratones portadores de rearrreglos cromosómicos han mostrado que los segmentos autosómicos que permanecen asinápticos en paquinema tienen γ -H2AX en su cromatina. Esto ocurre tanto en los bucles heterosinápticos en paquinemas tardíos (Mahadevaiah *et al.*, 2001), y en ratones portadores de la

translocación de Searle (Turner *et al.*, 2004). En ambos casos, los ejes de los segmentos asinápticos muestran la presencia de la proteína BRCA1.

Dentro de los mamíferos euterios la regla (con algunas excepciones) es que haya un par cromosómico XY, que forma un cuerpo XY en espermatoцитos con un solo nódulo de recombinación (crossover) que se encuentre cerca de la carioteca (Solari, 1994). El número y posición del complejo RAD51-DMC1 en las zonas de recombinación del CS, es un indicador de las rupturas de doble cadena del ADN en la profase de la meiosis (Moens *et al.*, 2007). Los estudios de focos de recombinación mediante inmunolocalización fluorescente de la proteína MLH1 realizados en humanos, portadores de rearrreglos cromosómicos (Pigozzi, Sciurano and Solari, 2005; Sciurano *et al.*, 2012), han permitido establecer que, en los reordenamientos cromosómicos en los que se forma un multivalente con sus extremos libres asinápticos, probablemente haya una reducción local en la frecuencia de entrecruzamientos. Sin embargo, las alteraciones de la tasa total de recombinación, no parecen ser en sí mismas un factor determinante en la viabilidad de los espermatoцитos que presentan reordenamientos cromosómicos, en cambio, sí lo es la asociación gradual de las regiones asinápticas de los multivalentes con el cuerpo XY (Sciurano *et al.*, 2007).

Las proteínas RAD51 y BRCA1 también se han encontrado a lo largo de los ejes no sinapsados del trivalente XY_1Y_2 de *A. lituratus* y *A. planirostris*; la presencia de histona variante γ -H2AX en la cromatina del cuerpo XY_1Y_2 , sugiere que esas regiones están silenciadas transcripcionalmente. Mientras que BRCA1 está restringida a las regiones asinápticas a lo largo del paquinema, la presencia de

RAD51 en esas regiones, gradualmente desaparecen a lo largo que progresa el estadio.

Se sabe que el número de focos de RAD51 en espermatoцитos normales exceden en número a los crossovers finales marcados con la proteína MLH1, lo que significa que la mayoría de FDCs, producidas por la proteína SPO11 en el inicio de la profase I, son reparadas por un mecanismo alternativo diferente de la recombinación homóloga, no solo en segmentos sinapsados de los autosomas, sino también en los segmentos asinapsados de los autosomas y en el cuerpo XY (Sciurano *et al.*, 2012). Una posible explicación para la persistencia de la FDCs no resueltas en las regiones asinápticas hasta el final del paquinema podría ser que existe un obstáculo estérico que impide la sinapsis completa en el centro de los multivalentes (Pigozzi, Sciurano and Solari, 2005). Sin embargo este obstáculo no se ha encontrado en algunos mamíferos que poseen translocaciones y en los que sus multivalentes están completamente sinapsados (heterosinapsis) (Sciurano *et al.*, 2012). Así, esta condición que permite que el complejo de recombinasas RAD51/DMC1 invada las moléculas de DNA y sea reemplazada por el complejo reparador de proteínas (RPA, BRCA1 y otras) no dependería exclusivamente de la disponibilidad de DNA homólogo, sino que simplemente puede depender de la presencia de un complejo proteínico presente en el espacio central de cada CS entre las regiones no homólogas (Sciurano *et al.*, 2012).

3. Sinapsis y remodelación de la cromatina en el cuerpo XY_1Y_2 en *Artibeus lituratus* y *Artibeus planirostris*.

Una de las reglas generales en la gran mayoría de mamíferos placentarios es que ocurra una sinapsis parcial entre los cromosomas X e Y (Moses, 1968; Solari, 1970; 1994). El CS, que es formado desde el paquinema temprano, se hace muy largo y se va acortando en los siguientes estadios, hasta llegar a una longitud mínima al final del paquinema que es variable entre las especies (Solari, 1994). Sin embargo, hay algunos casos descritos donde el CS entre un cromosoma X e Y no se acorta, como en los armadillos (Sciurano *et al.*, 2012) y el roedor *Galea musteloides* (Solari *et al.*, 1993; Sciurano *et al.*, 2013). Las presentes observaciones en las dos especies de filostómidos muestran un comportamiento especial de esos CS en el cuerpo XY_1Y_2 : la sinapsis de la región pseudoautosómica, formada por los cromosomas X- Y_1 está retrasada respecto de la sinapsis del segmento X- Y_2 ; este último segmento está casi completamente sinapsado cuando los cromosomas X e Y_1 comienzan a aparearse

Respecto a la remodelación de la cromatina de la región diferencial de los cromosomas sexuales en el cuerpo XY_1Y_2 , se visualiza como un empaquetamiento muy apretado de las fibras de cromatina, rodeando la región asináptica del cromosoma X, y contiene a la histona variante γ -H2AX (Ver resultados). Al igual que en otros mamíferos, en *A. lituratus* y *A. planirostris* ésta remodelación se asocia a una inactivación transcripcional (Turner *et al.*, 2005; Sciurano *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

- Combinando las técnicas de microscopía electrónica e inmunolocalización fluorescente de proteínas meióticas específicas, los datos obtenidos en la elaboración de esta Tesina confirman lo reportado en la literatura respecto al número diploide, morfología cromosómica y determinación del trivalente sexual XY_1Y_2 en *A. lituratus* y *A. planirostris*.
- Asimismo, esta Tesina aporta nuevos datos sobre silenciamiento transcripcional, inmunolocalización de proteínas, ultraestructura secuencial y los aspectos comparados con otros taxones:
 - La inmunolocalización fluorescente de proteínas meióticas del complejo sinaptonémico y la microscopía electrónica permitieron evaluar el comportamiento del trivalente XY_1Y_2 , como patrón típico de la determinación sexual para individuos de esta familia, donde existen dos regiones de sinapsis entre el cromosoma $X-Y_1$ y $X-Y_2$, así como regiones asinápticas silenciadas transcripcionalmente y marcadas con la variante histónica γ -H2AX y BRCA1.
 - En la zona diferencial del cuerpo XY_1Y_2 , la condensación de la cromatina no se extiende hacia las regiones autosómicas. Esta cromatina tiene una condensación similar a la de los bivalentes.
 - Se establece que el mecanismo básico de la meiosis que impide la extensión de la inactivación de la cromatina hacia los segmentos autosómicos del cuerpo XY_1Y_2 no es la presencia de NORs, ya que estos se alojan en los cromosomas autosómicos 5, 6, 7 y 9, y no en los que componen el trivalente sexual XY_1Y_2 .

➤ Los resultados de esta tesina permiten avanzar en la comprensión de las características típicas de la meiosis en mamíferos, sea normal o patológica, incluyendo a los humanos portadores de reordenamientos cromosómicos estructurales.

Lic. ANGIE BARAJAS RUIZ.
Maestranda

Profesor emérito, DR. ALBERTO JUAN SOLARI.
Director

Dra. ROBERTA B. SCIURANO.
Directora adjunta

RESUMEN

Los murciélagos del género *Artibeus*, pertenecientes a la familia Phyllostomidae, presentan una excepción al patrón típico de determinación sexual XX/XY de los mamíferos euterios: se establece un sistema de cromosomas sexuales múltiples con la consecuente formación de un cuerpo XY_1Y_2 , que incluye dos regiones de sinapsis entre cromosomas X- Y_1 y X- Y_2 .

Combinando las técnicas de microscopía electrónica e inmunolocalización fluorescente de proteínas meióticas específicas, se confirma la presencia de la variante histónica γ -H2AX y de BRCA1 en la región diferencial del cuerpo XY_1Y_2 , indicando que dichas regiones asinápticas están silenciadas transcripcionalmente. Por otra parte, se confirma lo reportado en la literatura respecto al número diploide, morfología cromosómica, ultraestructura secuencial, determinación del trivalente sexual XY_1Y_2 en *A. lituratus* y *A. planirostris*, y se establece que el mecanismo básico de la meiosis que impide la extensión de la inactivación de la cromatina de tipo sexual hacia los segmentos autosómicos del cuerpo XY_1Y_2 no es la presencia de NORs, pues estos se alojan en los cromosomas autosómicos y no en los que componen el trivalente sexual XY_1Y_2 .

Los resultados de esta tesina permiten avanzar en la comprensión de las características típicas de la meiosis en mamíferos, sea normal o patológica, incluyendo a los humanos portadores de reordenamientos cromosómicos estructurales.

BIBLIOGRAFIA

- AKHVERDYAN M, FREDGA K (2001) EM studies of female meiosis in wood lemmings with different sex chromosome constitutions. *Journal of experimental zoology*. 290: 504-516.
- BAKER RJ, BASS RA, JOHNSON MA (1979) Evolutionary implications of chromosomal homology in four genera of Stenodermine bats (Phyllostomidae, Chiroptera). *Evolution* 33:220-226.
- BAKER SM, PLUG AW, PROLLA TA, BRONNER CE, HARRIS AC, YAO X, CHRISTIE DM, MONELL C, ARNHEIM N, BRADLEY A, ASHLEY T, LISKAY RM (1996) Involvement of mouse MLH1 in DNA mismatch repair and ceosing over. *Nat. Genet.* 13(3): 336-342.
- BARROS HMDR, SOTERO-CAIO CG, SANTOS N, SOUSA MJ (2009) Comparative cytogenetic analysis between *Lonchorhina aurita* and *Trachops cirrhosus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Genetics and molecular Biology* 32: 235-241
- COHEN PE, POLLACK SE, POLLARD JW (2006) Genetic Analysis of chromosome pairing, recombination and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr. Rev.* 27(4): 398-426. Review.
- FRANCO MJ, SCIURANO RB, SOLARI AJ (2007) Protein immunolocalization supports the presence of identical mechanisms of XY body in eutherians and marsupials. *Chromosome research* 15:815-824.
- FREDGA K. (1970). Unusual sex chromosome inheritance in mammals. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.* 259:15-36.
- HANDEL MA (2004) The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Experimental cell research* 296:57-63.
- HSU T, BACKER RJ, UTAKOJI T (1968) The multiple sex chromosome system of American leafnosed bats (Chiroptera, Phyllostomidae). *Cytogenetics* 7: 27-38.
- KASAHARA S, DUTRILLAUX B (1983) Chromosome banding patterns of four species of bats, with special reference to a case of X-autosome tranlocation. *Ann Genet* 26: 197-201.
- LEMONS-PINTO MMP, CALIXTO MS, SOUZA MJ, ARAÚJO APT, LANGGUTH A, SANTOS N (2012) Cytotaxonomy of the subgenus *Artibeus* (Phyllostomidae, Chiroptera) by characterization of species-specific markers. *Comparative Cytogenetics* 6(1): 17-28.
- MAHADEVIAH SK, TURNER JMA, BAUDAT F, ROGAKOU EP, et al., (2001) Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nature Genet.* 27: 305-380.
- MARCON E, MOENS P (2003) MLH1p and MLH3p localize to precociously induced chiasmata of okadaic-acid-treated mouse spermatocytes. *Genetics.* 165(4): 2283-2287.
- MASSON JY, DAVIES AA, HAJIBAGHERI N, VAN DYCK E, BENSON FE, STASIAK AZ, STASIAK A, WEST SC (1999) The meiosis-specific recombinase hDmc1 forms rings structures and interacts with hRAD51. *EMBO J.* 18(22): 6552-6560.
- MOENS PB, MARCON E, SHORE JS, KOCHAKPOUR N, SPYROPOULOS B (2007) Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-

- crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *J. Cell Sci.* 120(Pt 6): 1017-1027.
- MOSES MJ (1968) Synaptonemal Complex. *Annual Review of Genetics*, Vol. 2: 363-412.
- MUÑOZ-ARANGO J (2001) Los murciélagos de Colombia. Sistemática, distribución, descripción, historia natural y ecología. Ed. *Universidad de Antioquia*.
- MUDRY MD, RAHN M, GOROSTIAGA M, HICK A, MERANI MS, SOLARI AJ (1998) Revised karyotype of *Alouatta caraya* (Primates: Platyrrhini) based on synaptonemal complex and banding analyses. *Hereditas* 128: 9-16.
- NORONHA RC, NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC, MARQUES-AGUIAR S, BARROS RMS (2001) Sex-autosome translocations: meiotic behavior suggest an activation block with permanence of autosomal gene activity in phyllostomid bats. *Caryologia* 3:267-277.
- NORONHA RC, NAGAMACHI CY, PIECZARKA JC, MARQUES-AGUIAR S, BARROS RMS (2004) Meiotic analyses of the sex chromosomes in Carollinae-Phyllostomidae (Chiroptera): NOR separates the XY_1Y_2 into two independent parts. *Caryologia* 57:1-9.
- NORONHA RC, NAGAMACHI CY, O'BRIEN PC, FERGUSON-SMIT MA, PIECZARKA JC (2009) Neo-XY body: an analysis of XY_1Y_2 meiotic behavior in *Carollia* (Chiroptera, Phyllostomidae) by chromosome painting. *Cytogenetics and genome research* 124:37-43.
- PIECZARKA JC, NAGAMACHI CY, O'BRIEN PC, YANG F, *et al.* (2005) Reciprocal chromosome painting between two south American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). *Chromosome Research* 13:339-347.
- PIGOZZI MI, SOLARI AJ (1994) Regular segregation of the XY_1Y_2 trivalent and univalency in male meiosis of *Artibeus lituratus* (Phyllostomidae, Chiroptera). *Biocell* 18:41-47.
- PIGOZZI MI, SCIURANO RB, SOLARI AJ (2005) Changes in crossover distribution along a quadrivalent in a man carrier of a reciprocal translocation t(11;14). *BIOCELL* 29:195-195.
- RAHN MI, MUDRY M, MERANI MS, SOLARI AJ (1996) Meiotic behavior of the $X_1X_2Y_1Y_2$ quadrivalent of the primate *Alouatta caraya*. *Chromosome Research* 4: 350-356.
- RODRIGUES LRR, BARROS RMS, ASSIS MFL, MARQUES-AGUIAR SA, PIECZARKA JC, NAGAMACHI CY (2000) Chromosome comparison between two species of *Phyllostomus* (Chiroptera-Phyllostomidae) from Eastern Amazonia, with some phylogenetic insights. *Genetics and molecular Biology* 23(3): 595-599.
- RODRIGUES LRR, BARROS RMS, MARQUES-AGUIAR SA, ASSIS MFL, PIECZARKA JC, NAGAMACHI CY (2003) Comparative cytogenetics of two phyllostomid bats. A new hypothesis of the origin of the rearranged X chromosome from *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae). *Caryologia* 56(4): 413-419.
- SBRAGIA IA, CORREA MMO, PESSOA LM, OLIVEIRA JA (2010) The karyotype of *Macrophyllum macrophyllum* (Schinz, 1821) (Phyllostomidae: Phyllostominae) from the state of Bahia, Brazil. *Chiroptera Neotropical* 16(1): 600-602.

- SCIURANO RB, SOLARI AJ (2009) Nuevas perspectivas en el estudio de los bloqueos genéticos de la meiosis en varones infértiles. *Revista Argentina de Andrología* 18 (2):31-39.
- SCIURANO R, RANH M *et al.* (2007) The asynaptic chromatin in spermatocytes of translocation carriers contain the histone variant γ H2AX and associates with the XY body. *Hum. Repr.* 22 (1):142-150.
- SCIURANO RB, RANH MI, *et al.* (2012) The role of asynapsis in human spermatocyte failure. *International Journal of andrology* 1-9.
- SCIURANO R, RANH M.I, ROSSI L, LUACES JP, MERANI MS, SOLARI AJ (2012) Synapsis, recombination and chromatin remodeling in the XY body of armadillos. *Chromosome Res* 20:293–302.
- SCIURANO RB, SOLARI AJ (2014) Ultraestructural and immunofluorescent methods for the study of the XY body as a biomarker, Functional analysis of DNA and chromatin, *Methods in molecular biology*, vol 1094, pp.137-149.
- SCULLY R, CHEN J, PLUG A, XIAO Y, WEAVER D, FEUNTEUN J, ASHLEY T, LIVINGSTON DM (1997) Association of BRCA1 with RAD51 in mitotic and meiotic cells. *Cell.* 88(2): 265-275.
- SOLARI AJ (1970) El par cromosómico X-Y de los mamíferos. *Ciencia e investigación.* 23-32.
- SOLARI AJ (1971) The behavior of chromosomal axes in Searle's X-autosome translocation. *Chromosoma* 34:99-112.
- SOLARI AJ (1974) The behavior of the XY pair in mammals. *Int. Rev. Cytol.* 38, 273-317.
- SOLARI AJ. (1994). Sex chromosomes and sex determination in vertebrates. *CRC Press, Boca Ratón.* pp 109-135.
- SOLARI AJ, PIGOZZI MI (1994) Fine structure of the XY body in the XY₁Y₂ trivalent of the bat *Artibeus lituratus*. *Chromosome research* 2:53-58.
- SOLARI AJ, RANH IM, *et al.* (2001) The behavior of sex chromosomes in two human X-autosome translocations: Failure of extensive X-inactivation spreading. *Biocell* 25(2):155-166.
- TUCKER PK, BICKHAM JW (1986) Sex chromosome-autosome translocation in the leaf nosed bats. II. Meiotic analysis of the subfamilies Stenodermatinae and Phyllostominae. *Cytogenetics Cell Genet* 43: 28-37.
- TURNER JM, APRELIKOVA O, XU X, *et al.* (2004) BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *CurrBiol* 14:2135-2142.
- TURNER J, MAHADEVIAAH K, ELLIOT D, *et al.* (2002) Meiotic sex chromosome inactivation in male mice with targeted disruptions of Xist. *Journal of Cell Science* 115, 4097-4105
- TURNER JMA, MAHADEVIAAH SK, FERNANDEZ-CAPETILLO O, NUSSENZWEIG A, XU X, DENG C-X, BURGOYNE PS (2005) Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nature Genet* 37: 41-47.
- YONENAGA Y, FROTA-PESSOA O, LEWIS KR (1969) Karyotypes of seven species of Brazilian bats. *Caryologia* 22: 63-78.