

UAM

Universidad Autónoma
de Madrid

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



Tesis Doctoral

**Organización y comportamiento
de los cromosomas sexuales
durante la meiosis en mamíferos
monotremas y marsupiales**

Marta Martín Ruiz

Madrid, diciembre 2020

Organización y comportamiento de los cromosomas sexuales durante la meiosis en mamíferos monotremas y marsupiales

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Dña. Marta Martín Ruiz** para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid en el Programa de Doctorado de Biología.

Tesis Doctoral dirigida por

el **Dr. Jesús Page Utrilla** y la **Dra. María Teresa Parra Catalán**

V.º B.º Director

V.º B.º Co-Directora

Doctoranda

Dr. Jesús Page Utrilla

Dra. María Teresa Parra Catalán

Dña. Marta Martín Ruiz

Madrid, España
Diciembre, 2020

La presente Tesis Doctoral ha sido desarrollada en la Unidad de Biología Celular del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid. Toda la investigación en el laboratorio ha sido subvencionada por el Ministerio de Economía y Competitividad dentro del proyecto “La meiosis y la evolución de los cromosomas sexuales en mamíferos “ (CGL2014-53106-P).

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el contrato de ayudante de investigación PEJ16/MED/AI-0736 cofinanciadas por Fondo Social Europeo a través del Programa Operativo de Empleo Juvenil y la Iniciativa de Empleo Juvenil (YEI) y por el proyecto de investigación CGL2014-53106-P.

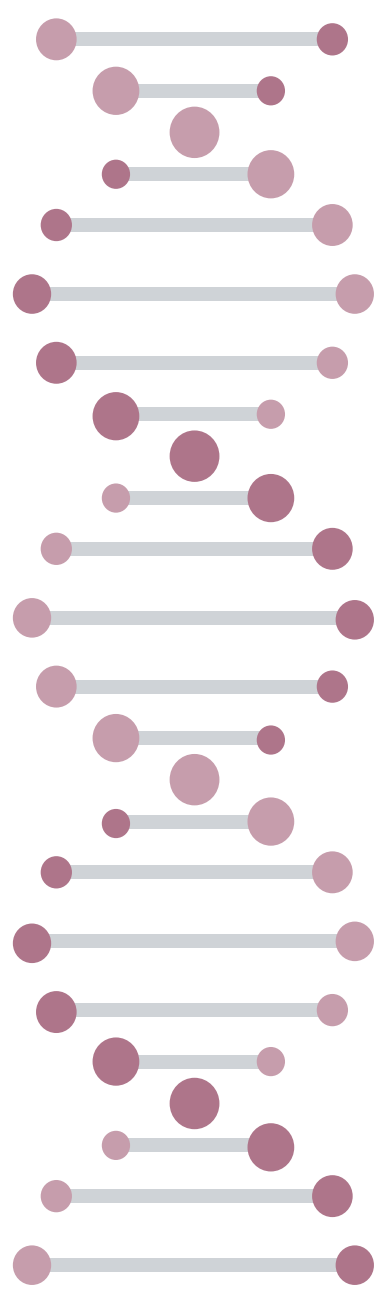
Los resultados de este trabajo han sido presentados en diferentes congresos internacionales: Gordon Research Seminar on Meiosis y Gordon Research Conference on Meiosis (New London, EEUU, 2018), Student and Postdocs Meiosis Workshop (Montpellier, Francia, 2018), EMBO Conference on Meiosis (La Rochelle, Francia, 2019), Chromopalooza Workshop (Viena, Austria, 2020). Además también se han presentado en varios congresos nacionales: Red Española de Meiosis MEIONet (Miraflores de la Sierra, España, 2017), Spanish Meiosis Meeting (El Escorial, España, 2018 y 2019). Finalmente parte de estos resultados se han presentado en jornadas científicas de divulgación: Jornadas de Primeros Pasos (Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, España, 2018, 2019 y 2020), Maratón Científica del Real Jardín Botánico (Madrid, España 2019) y festival internacional científico *Pint of Science* (Madrid, España, 2018).

**A mis padres,
por su apoyo incondicional hoy y siempre.**

A Rafa

“Prepárate para mañana trabajando bien hoy”.

El poder del pensamiento positivo (1952)



AGRADECIMIENTOS

Son muchas las veces que me he imaginado ante estas líneas y muchas las maneras de escribir estos agradecimientos, pero no cabe duda de que mi primer agradecimiento es para la Tesis en sí misma. Por ello, gracias Tesis Doctoral por hacerme crecer y evolucionar, por verme madurar y luchar, por enseñarme a estar sola y a diferenciar lo verdaderamente importante. Por ser esa montaña rusa de emociones, en la que hay momentos que necesitas agarrarte fuerte y sentir la mirada de complicidad de tus amigos que están en los vagones de al lado y otros momentos en los que levantas las manos, te despeinas y te sientes la reina de mundo.

El viaje empieza en la cola con otras muchas personas, esperando horas (meses) y pensando si de verdad quieres subir, viendo abandonar a algunas personas, hasta que puedes sentarte en tu asiento (laboratorio), dedicar unos segundos a ver las vistas mientras que subes lento hasta la llegada a la cima más alta. La primera bajada sin duda es la que más cosilla te da en el estómago y en ese punto ya sabes que estás inmersa en una nueva aventura con miedo a descarrilar, pero decidida a averiguar lo que está por llegar. Sin duda los *loops* son agitados y te causan dolor de cabeza, a veces quieres bajarte de esa atracción que hace que se te escapen lagrimillas, otras tienes ganas de ver lo que ocurre en la siguiente curva. Sabes que saldrás mal en la foto que te hacen al final, será con media sonrisa, el bikini descolocado y habrás perdido las gafas de sol por el camino, pero esos minutos de traqueteo en la recta final, son donde respiras y sientes la adrenalina que te ha causado el viaje, te bajas, miras lo alto que has estado y no paras de comentar con la gente el trayecto, porque a pesar del mareo, estas orgullosa de haber superado los miedos y decir que lo has logrado. Este trayecto de tres años ha sido siempre con los vagones llenos, llenos de gente maravillosa sin los cuales no podría haber llegado aquí.

En primer lugar, gracias a mi compañero de vagón y director de esta Tesis, el Dr. Jesús Page, por brindarme esta oportunidad sin conocerme, por elegir mi CV entre otras 60 inscripciones y por confiar en que pudiera desarrollar este difícil trabajo, que comprendía *handicaps* desde el inicio. Por dar rienda suelta a mis ideas, por escuchar siempre mis sugerencias, por dejarme conocer el mundo científico internacionalmente y concederme la ocasión de viajar a Australia para conocer en persona a las tres especies de este trabajo. Simplemente gracias por enseñarme con tanta pasión el mundo de la meiosis y los cromosomas sexuales, por tu perfeccionismo y tu apoyo. Eres no solo un gran científico y docente, sino una gran persona digna de admirar, me siento muy afortunada de poder haber trabajado contigo y aunque esta etapa termine siempre buscaremos tiempo para tomar unas buenas cervezas que tanto nos gustan.

Por supuesto, quiero agradecer a la Dra. Mayte Parra, mi codirectora en este proyecto, quién siempre ha tenido tiempo a pesar de su apretada agenda, para tener las conversaciones más sinceras y prácticas que podía haber y salir del despacho con ideas renovadas y un chute de energía. Gracias por acompañarme a lo largo de este periodo, abrirme los ojos en muchas ocasiones y formar parte de este trabajo.

También agradecer a la Dra. Rocío Gómez su cercanía, cariño y tratarme como un miembro más desde el minuto uno, por tener ideas ocurrentes y por siempre tener predisposición a ayudar

en lo que hiciera falta. Me alegro de haberte conocido y aún quedan muchas cosas que celebrar. Al Dr. Julio S. Rufas, el hombre conocido por todo el mundo cuando llegué y tan desconocido para mí, que poco a poco me dejó descubrir su sentido del humor, su transparencia y sabiduría. Gracias por tanto, por todas las risas, consejos para siempre mejorar y sobre todo por anteponer el lado humano al profesional, “la ciencia es importante, pero las personas más”. Siempre recordaré cuando decías “pórtate mal el finde, que portarse bien es de aburridos y la vida son dos días” que razón tenías... No hace mucho me dijiste que mi Tesis sería la última Tesis que verías antes de jubilarte y lamentablemente hoy no estás aquí para leer esto, por ello quiero dedicártela. Hasta siempre. Agradecer también al Dr. José Ángel Suja y al Dr. Alberto Viera por su ayuda a la hora de explicarme protocolos nuevos, sus sugerencias científicas y por los buenos ratos despreocupados en los congresos.

Todas estas subidas y bajadas en esta montaña rusa no hubieran sido ni la mitad de divertidas sin mis compañeros y amigos, que la UAM me ha brindado la oportunidad de conocer. Gracias a Elena por transmitirme su entusiasmo por la ciencia y siempre acogerme como una más, tanto que siempre pensaré que estuve en su Tesis, a Inés por ver en ella un ejemplo a seguir como investigadora y por las millones de risas sin fin, a Juanpa por su carisma y sus conversaciones ocurrentes, a Marta caracoles por sentirme súper identificada con tu energía y mostrarme siempre que con trabajo todo sale. A San, por sus grandes consejos, ejemplo de constancia y preocuparse tanto por mí y de que este manuscrito tuviera fin. A Irene y Laurita por su vitalidad y buen rollo. Gracias a Ana por ayudarme a entender que las cosas que uno tiene dentro es mejor sacarlas, porque la empatía se convirtiera en nuestro mejor aliado y por todos los buenos momentos de este largo camino. Agradecer a Pablo su ayuda y consejos al inicio de mi investigación, todos los momentos de fiesta y confianzas y sobre todo por compartir conmigo aquellos largos “periodos de paciencia”, para no volvernos locos. A Quique, gracias por ser ese compañero que facilita la vida en el laboratorio, por aconsejar y dejar que te aconsejen, por buscar conmigo la palabra número 300, por poner “la canción” para que apareciera la célula que buscaba, por revivirme cuando estaba “muerta” al son del “señor de la noche” y por supuesto por todos los momentos divertidos entre cervezas, copas, palomitas o lo que hiciera falta. Gracias a Marta Riba, por pasar de ser la chica de TFG a mi amiga, compañera de mesa y de días largos, por pasar de enseñarla las técnicas de los experimentos a ayudarme a buscar las mejores palabras para describir mis resultados. Gracias por darme la oportunidad de conocerte y descubrir la magnífica persona que eres y por supuesto por los días intensos en La Rochelle de disfrute y complicidad. A Tamara por traer un aire fresco al laboratorio y siempre llenarlo de entusiasmo. No me olvido de ti, Eva, mi tándem desde el minuto uno, la persona que me facilitó el trabajo y el inicio de esta Tesis, gracias por siempre prestarme tu ayuda, por tu alegría y por el gran trabajo en equipo que lográbamos. Siempre recordaré que la vida al ritmo de “espectaculaaaaa” es mucho mejor. Por último mi mención especial es para mis “sestras”, Tere y Nuri, mis imprescindibles, mi alegría de cada día, por estar en todo momento, por saber cuándo necesitaba un abrazo, por cada una de nuestras locuras, por nuestras charlas sin fin, por los viajes, por los muchos cafés para trabajar

y las muchas cervezas para celebrar, porque aun habiendo dejado el labo siempre he sentido una cercanía y apoyo constante, gracias de corazón amigas.

Sin dejar la UAM, quiero hacer una mención a una persona que sin tener un porqué me ha concedido toda su sinceridad y apoyo, gracias a la Dra. Isabel Molina por siempre tener tiempo para escucharme y sanarme con tus abrazos. Gracias a los “chicos del pasillo”, Irene, Sara, Fran, Nuria, Marcos, Julia, Palau, Sheila, Mario, Alicia, Víctor, Félix, Gerardo... por alegrar los días y hacer “intento de ciencia”, gracias Luis por tus siempre “buenos días Marta”, por las charlas amenas y por siempre hacerme saber que tenía un hueco al otro lado del pasillo. Gracias a Pablo Bala por ser mi compi trueno, por juntos hacer de pegamento del pasillo desde aquella primera comida de Navidad, por compartir este camino de la Tesis y por siempre dedicarme palabras buenas sobre mi trabajo.

No quería terminar mis agradecimientos de la UAM sin antes agradecer a Blanca, por siempre preocuparse por mí y dedicarme una sonrisa cada día. A los camareros de la cafetería, por saber cómo quería el café en función de cada día y amenizar nuestros desayunos, especialmente a Jesús, por no dejarme ir a trabajar sin animarme en los días malos y preguntarme minuto y resultados de mis partidos. Por último, agradecer al resto de gente que trabaja en el Departamento de Biología, gracias a los técnicos de laboratorio, profesores, administración... que me han concedido ayuda y han facilitado mi estancia.

Thank you for the opportunity of travelling internationally to congresses, where I was able to develop as a scientist and a person, where I learned so much and where I met incredible people, who gave many experiences and a different outlook on life. I am lucky enough to be able to say that some of you have become true friends, and I simply wanted to say a big thank you to everyone who helped me. It was a pleasure meeting you and we definitely enjoyed the meetings very much, it was fantastic! It was pretty special having friends and colleagues from all over the world. Thank you very much.

Quería agradecer al mundo meiótico de España, por hacerme sentir tan cómoda entre ellos, por darme grandes consejos y haber compartido muy buenos momentos juntos, gracias a la Dra. Aurora Ruiz-Herrera, Dr. Ignasi Roig, Dr. Pedro San-Segundo, Dra. Beatriz Santos, Dr. Jesús Carballo, Dr. Alfonso Fernández, Dr. Ricardo Benavente y Dr. Miguel Brieño-Enríquez (como parte de la familia española), Dr. Tomás Naranjo, Dr. Alberto Martín y en especial a Dra. Mónica Pradillo, por haberme transmitido tus conocimientos desde que fuiste mi profesora en la carrera de Biología hasta día de hoy, ha sido un poder haber trabajado juntas y gracias por poder contar contigo en lo científico y en lo no tan científico. Por supuesto muchas gracias a todos los chicos de la Complu, de Salamanca, UAB, Sevilla y españoles por el mundo por las grandes conversaciones, risas, cervezas, bailes y por comprender más que nadie como es andar en este terreno, desde aquí os deseo lo mejor. En especial a Nadia por ser mi compañera de batallas, por la complicidad, los momentos de desahogo y por valorar tanto mi trabajo.

Quería agradecer también la colaboración del Dr. José Luis Barbero a este proyecto, ya que sin su ayuda una gran parte de este estudio no hubiera podido llevarse a cabo. Gracias por ilusionarte tanto como yo en obtener unos anticuerpos tan únicos y especiales y por los otros muchos que nos has proporcionado, gracias por hacerme sentir en tu laboratorio como en casa, por la cantidad de conocimientos que has enseñado y por dejarme enseñarte algunas cosas a mi manera, gracias por tu bondad y dedicación. Eres digno de admirar.

Thanks for the collaboration of another continent, Australia. First of all, I would like to thank Dr. Frank Grützner and all his team for providing us with the essential material for this study. Thank you also for the discussion of many aspects of this thesis, and above all, for coming to Madrid to meet us and spend some very pleasant and busy days. Secondly, my most sincere thanks to Dr. Marilyn Renfree and all the laboratory team, again for providing us with the necessary material and especially for the great welcome in Melbourne during our stay there. Thank you for giving us all of your attention, providing us with all the laboratory material and facilitating the experiments. For making us feel so comfortable, for inviting us to your home and sharing family moments. To Corinne and Geoff for their help in the colonies, thanks to Jane and Gerard for all their help in the laboratory and the colonies, thanks for the coffee talks, for the meals and for your dedication, you are wonderful people. Thank you Teru, for the great conversations, for your help in the lab, for discovering Melbourne together, for trying to get me to learn Japanese and for showing me your culture, I wish you a good completion of your PhD. Thank you from the bottom of my heart Marilyn, it has been a huge pleasure for me to meet you and learn so much from you. See you in Madrid. Finally I would like to thank Jennifer Ann Marshall Graves for her warm welcome in Melbourne, for letting us sleep at her house, meet her family and spend precious days of excursions, wine tasting and dinners. It is a pleasure to meet the “mother” of sex chromosomes. And of course many greetings to Milli.

Antes de subirme a esta montaña rusa, venía de otros agitados lugares, que me prepararon e ilusionaron tanto que quería continuar investigando. Siempre me acordaré de que la primera oportunidad me la brindó el Dr. Eduardo Rial, seleccionándome entre otras personas para realizar la primera de mis investigación en el CIB-CSIC, él me enseñó la elegancia y meticulosidad de la ciencia, la necesidad de “hacer manos” para mejorar en cada experimento y me abrió el camino de la investigación regalándome los mejores consejos que se pueden tener al salir de la carrera. Gracias por todo, me alegra seguir en contacto para que hoy puedas ver que me he hecho mayor científicamente hablando.

También dedicar unas palabras a mí otra familia científica, mis compañeros de la URJC, por enseñarme otro tipo de ciencia, otra visión de las cosas y siempre cuidarme en momentos difíciles, por crear grandes recuerdos y por dejarme estar presente en cada uno de vuestros grandes triunfos, viviendo y compartiéndolo juntos. Hoy me toca a mí y por supuesto quiero que estéis en él. Gracias a todos y cada uno de los miembros del departamento de Farmacología y Nutrición, es

especial a mi mentora la Dra. Raquel Abalo Delgado por inculcarme los valores necesarios para recorrer el duro pero apasionante mundo de la investigación. A por supuesto mis “Gochos” por estar presentes en mi camino de la Tesis y preocuparse tanto por mí. A Caroline, por aconsejarme desde el corazón, por nuestros planes por Madrid y nuestro viaje por Menorca y por cuidarme tanto siempre, obligada, mucho obligada. A mi amiga Polaca, *thank you for everything, for our fun and endless afternoons to the beat of the song “Work work”... for letting me show you Madrid and afterwards, for showing me Warsaw.*

Sin alejarme mucho de la ciencia, quería agradecer a mis mejores amigos de carrera Dani, Marta y Nico, por ser los mejores amigos que he podido conocer en Biología, por acompañarte a lo largo de este camino y por entender mejor que nadie lo duro que es. Porque aquello que empezó en la facultad de Biología hoy es una amistad tan bonita y sincera que no sé qué haría sin vosotros, por haber estado en mis momentos más duros y nunca dejarme caer. Por todos los viajes, cumpleaños, veranos, las tardes de terrazas, las fiestas, las charlas sin fin, por tanto cariño... gracias por formar parte de mi vida y acompañarme en mi camino personal y profesional.

Fuera del mundo de la ciencia y la biología tengo el placer de contar con gente maravillosa, que forma parte de mi día a día y que me alegra la vida. Amigos con un corazón enorme que llevan ya muchos años a mi lado.

Agradecer a la “CDE” tantos momentos desde pequeños, nos hemos visto crecer, vivir “las primeras veces” juntos, desarrollar nuestros caminos por separado pero siempre hemos permanecido unidos. Gracias por formar parte de mi vida, por tantos recuerdos, por tantos buenos veranos, por las fiestas locas, por las tardes de deporte sin fin, por las millones de risas, por el libro de anécdotas que hemos formado y seguiremos formando y por todo vuestro apoyo. En especial a “Meridiano” por vivir mis triunfos como si fueran suyos durante mi etapa de la Tesis, por dejarme hacerles un abstract cuando volvía de un congreso, pero sabían que no pararía de hablar y que no iba a ser ningún resumen, por estar a mi lado y escuchar cuando lo necesitaba, gracias.

A mis “Homies”, porque ellas son la familia que se elige, gracias por cuidarme siempre, por escucharme hablar de biología aunque os sonara a chino, por tantos buenos momentos, por los viajes por el mundo, por tantas cenas arreglando la vida y por siempre ser un pilar de sujeción básico. Gracias por compartir la vida conmigo.

Por supuesto agradecer a Clarita, todo su apoyo incondicional en todos los años que nos conocemos, por estar a mi lado en todas las circunstancias, por ser la persona más noble y real que he podido conocer y tener la suerte de tenerla a mi lado, te doy mil gracias por ayudarme siempre.

También a ti Carmen, por todas nuestras charlas, por los buenos momentos y porque pase el tiempo que pase sin vernos cuando nos vemos es como siempre, gracias por una amistad sincera, por escucharme siempre y tener las mejores palabras mí.

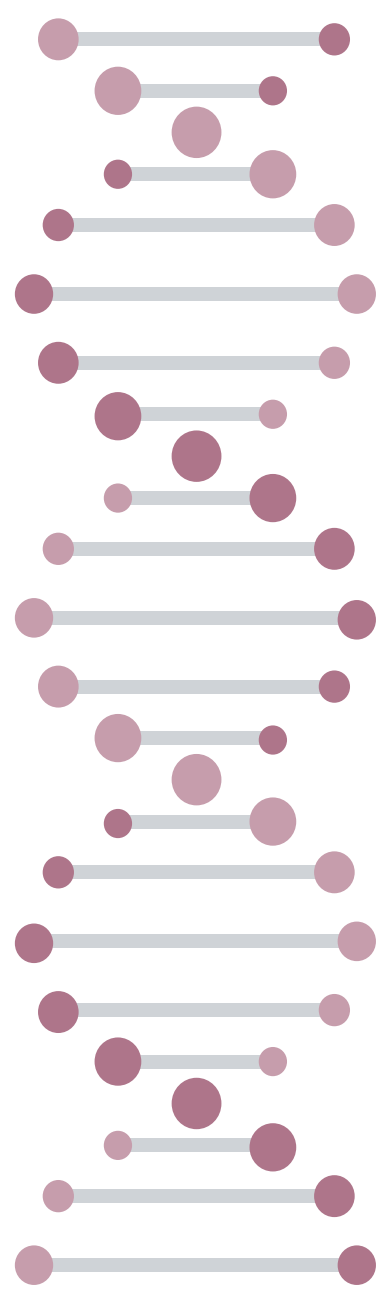
Gracias a Lau e Ire, por vivir conmigo este camino de la Tesis, por estar en todos mis altibajos y darme un cariño único. Por confiar siempre en mí y no dejarme caer, por ser la resistencia que ha forjado una amistad especial, por vivir los mejores viajes juntas y crear los recuerdos más divertidos. Porque no nos hace mucha mecha para #selia en cualquier lugar y porque sé que siempre puedo contar con vosotras. Porque lo que unió el vóley no lo separará nada, gracias amigas. También gracias a los últimos fichajes “calienta que sales remix” por alegrarme la vida y compartir locuras.

Gracias también a todas las personas que en los últimos años han formado parte de mi vida, que se han quedado en el camino, pero que en su momento fueron importantes para mí y han hecho que sea como soy ahora.

A mi familia. Gracias a mi abuelo Martín, que nos dejó justo cuando comencé esta etapa y sé que hoy estaría orgulloso de mí. Gracias a Nono y la Yaya por tanto cariño y apoyo, por desearme siempre lo mejor y por saber valorar la carrera científica como muy dura pero muy muy bonita y por nunca dudar que lo conseguiría. Gracias por todo lo que habéis hecho por mí no solo ahora sino toda mi vida. A Ale, Alejandro y los enanos Bea, Paula y Guille por ese cariño tan tierno y por alegrarnos siempre.

Por supuesto millones de gracias a mis padres, porque a ellos les debo todo, gracias por vuestro cariño, vuestro amor, vuestra paciencia, vuestra confianza absoluta en todo lo que he hecho... Sin vosotros no sería nada de lo que soy, ni nada de lo que seré. Gracias Papá por siempre confiar en que puedo llegar a donde me proponga, gracias por quererme y apoyarme tanto. Gracias Mamá, gracias por darte cuenta de todo, por ser un ejemplo a seguir y una súper mujer, por no rendirte nunca y no dejar que yo lo haga, gracias ser como eres conmigo y con el mundo entero y por darme la mano siempre. Gracias a los dos por darme vuestro impulso. Por último gracias a Rafa, por su infinita paciencia durante toda en esta etapa que ha vivido junto a mí, por darme ese punto de calma a mis locuras, por vivir mis triunfos como si fueran suyos y darme los mejores abrazos en momentos de desesperación. Por escucharme hablar de meiosis aunque no te guste nada la biología y por hacer un esfuerzo enorme por entender todo lo que contaba y siempre animarme diciendo que soy “la crack mundial”. Gracias por animarme a superarme cada día, a levantarme, gracias por estar, pero sobre todo gracias por quererme tan bonito.

Por último dar las gracias a Reyes, por su ayuda en la maquetación y portada de esta Tesis Doctoral, sin ella no habría posible este formato tan personalizado. Gracias por tu paciencia al enseñarme y tu dedicación.



ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	9
TERMINOLOGÍA	15
INTRODUCCIÓN	19
1. La meiosis	21
1.1. Primera división meiótica	21
1.2. Segunda división meiótica	23
2. Procesos específicos de la meiosis	24
2.1. Apareamiento y sinapsis	24
2.2. Recombinación	26
2.3. Segregación	28
3. Organización estructural de los cromosomas durante la meiosis	30
3.1. Complejo sinaptonémico	30
3.2. Complejo de cohesinas	31
4. Cromosomas sexuales	33
4.1. Origen y evolución de los cromosomas sexuales en mamíferos. Estadios de diferenciación.....	33
4.2. Generalidades de los cromosomas sexuales en la meiosis masculina	38
4.3. Comportamiento meiótico de los cromosomas sexuales en monotremas y marsupiales	39
Objetivos	43
Material y métodos	49
1. Material	51
2. Metodología	52
2.1. Obtención de preparaciones de espermatoцитos	52
2.1.1. Esparcidos de espermatoцитos	52
2.1.2. Aplastados de espermatoцитos	53



2.2. Inmunolocalización de proteínas	54
2.3. Generación de anticuerpos específicos	55
2.3.1. Obtención de antígenos de la proteína SYCP3 para la producción de anticuerpos.....	56
2.3.2. Expresión de proteínas	57
2.3.3. Secuenciación de proteínas.....	58
2.3.4. Generación de anticuerpos policlonales.....	58
2.4. Hibridación <i>in situ</i> (FISH) de secuencias teloméricas	59
2.5. <i>Western blot</i>	59
2.6. Captura y procesamiento de imágenes	60
2.7. Cuantificación de resultados y análisis estadístico	61
RESULTADOS	63
1. Comportamiento meiótico de los cromosomas del ornitorrinco	67
1.1. Progresión de la sinapsis durante la profase-I.....	67
1.1.1. Caracterización de la cadena de cromosomas sexuales	70
1.1.2. Presencia de regiones asinápticas en los autosomas	72
1.1.3. Caracterización de la organización de SMC3 en microscopía de alta resolución	73
1.2. Comparación del patrón de distribución de cohesinas durante la profase-I	74
1.2.1. Localización de las cohesinas en etapas tardías de la primera profase meiótica.....	79
1.3. Análisis del complejo sinaptonémico en ornitorrinco	79
1.3.1. Localización de HORMAD1	84
1.4. Reparación del DNA.....	86
1.4.1. Patrón clásico de recombinación.....	88
1.4.2. Patrón inusual de recombinación	92



1.5. Modificaciones epigenéticas	95
2. Comportamiento meiótico de los cromosomas en equidna.....	107
2.1. Progresión de la sinapsis durante la profase-I.....	107
2.2. Comparación del patrón de distribución de cohesinas durante la profase-I	110
2.2.1. Localización de las cohesinas en etapas tardías de la primera profase meiótica.....	111
2.3. Análisis del complejo sinaptonémico en equidna.....	112
2.4. Reparación del DNA.....	115
2.5. Modificaciones epigenéticas	121
3. Comportamiento meiótico de los cromosomas del ualabí de pantano y características morfológicas de sus cromosomas sexuales.....	131
3.1. Cariotipo y configuración trivalente de los cromosomas sexuales	131
3.2. Caracterización de la secuencia de apareamiento de los cromosomas sexuales durante la sinapsis en profase-I	133
3.2.1. Ensamblaje del complejo sinaptonémico durante la sinapsis.....	136
3.3. Patrón de recombinación	137
3.4. Inactivación de los cromosomas sexuales	139
3.5. Dinámica de segregación de los cromosomas sexuales	143
Discusión.....	147
1. Distribución y dinámica de las cohesinas en la meiosis de monotremas	149
1.1. Acumulación de cohesinas en los cromosomas sexuales del ornitorrinco.....	150
1.2. Regiones asinápticas autosómicas acumulan cohesinas en el ornitorrinco.....	152

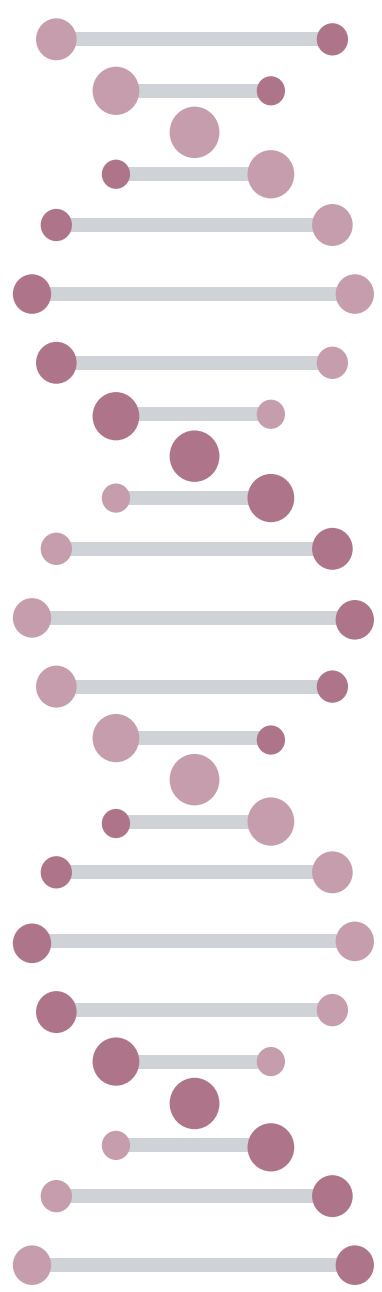


1.3. Diferencias entre los cromosomas sexuales del ornitorrinco y el equidna	153
2. Composición y dinámica del complejo sinaptonémico en monotremas.....	154
2.1. El complejo sinaptonémico del equidna también muestra un retraso en su formación	157
3. El ciclo de recombinación muestra dos patrones diferentes en ornitorrinco	158
4. Evolución del silenciamiento de los cromosomas sexuales en monotremas	159
5. Comportamiento meiótico del trivalente sexual XY₁Y₂ en <i>Wallabia bicolor</i>.....	160
5.1. Sinapsis de los cromosomas X-Y ₂	161
5.2. Apareamiento de la región heteróloga X-Y ₁ y formación de la placa densa	163
5.3. Inactivación transcripcional de los cromosomas sexuales	164
5.4. Los cromosomas sexuales presentan un quiasma en la región PAR que asegura su segregación.....	165
Conclusiones	169
1. Conclusiones respecto a la especie <i>Ornithorhynchus anatinus</i>	171
2. Conclusiones respecto a la especie <i>Tachyglossus aculeatus</i>	171
3. Conclusiones respecto a la especie <i>Wallabia bicolor</i>	172
4. Conclusiones generales	173
Referencias	175

ⁱ Posicione el cursor sobre el título del apartado del índice que se quiera ver y haga clic para acceder directamente.

ⁱⁱ Posicione el cursor sobre la cita en el texto que se quiera ver y haga clic para acceder directamente a la referencia.





ABREVIATURAS



%, porcentaje

°C, Grados Celsius

μg, microgramo

μl, microlitro

μm, micrometros

μM, micromolar

ACA, anticuerpo anti-centrómero (*anti-centromere antibody*)

AMH, hormona antimuleriana (*antimullerian hormone*)

ATM, (*ataxia-telangiectasia-mutated*)

ATR, (*ataxia telangiectasia and Rad3-related*)

CC, complejo de cohesinas (*cohesin complex*)

CO, sobrecruzamientos (*crossover*)

CS, complejo sinaptonémico

Cy3, (*cyanine 3*)

DAPI, 4',6-diamidino-2-fenil-indol (*4',6-diamidin-2-phenyl-indole*)

dHJ, doble intermediario de Holliday (*double Holliday Junction*).

D-loop, (*displacement loop*)

DMC1, recombinasa (*disrupted meiotic cDNA 1*)

DMRT1, gen de determinación del sexo (*double sex and mab-3 related transcription factor 1*)

DMSO, dimetil sulfóxido

DNA, ácido desoxirribonucleico (*desoxiribonucleic acid*)

DNA-PK, (*DNA-dependent protein kinasa*)

DSB, roturas de doble cadena (*double-strand break*)

EA, elemento axial

EC, elemento central

ECo, eje de cohesina

EDTA, ácido etilendiaminotetraacético (*e*thylene*d*iamine *t*etraacetic *a*cid)

EL, elemento lateral

EN, envoltura nuclear

Fab, fragmento de unión a antígeno (*f*ragment *a*ntigen-*b*inding)

FITC, isotiocianato de fluoresceína (*f*luorescein *i*sothiocyana*t*e)

FT, filamento transverso

h., hora

H3K9ac, histona H3 acetilada en el residuo Lys9

H3K9me2, histona H3 dimetilada en el residuo Lys9

H3K9me3, histona H3 trimetilada en el residuo Lys9

HR, vía de recombinación homóloga (*h*omologous *r*ecombination)

IgG., inmunoglobulina tipo G (*i*mmunoglobuline *G*)

IgM., inmunoglobulina tipo M (*i*mmunoglobuline *M*)

kDa., kilodalton

M, molar

MAJIN, proteína transmembrana (*m*embrane-*a*nchored *j*unction *p*rotein)

ml, mililitros

MLH1- MLH3 (*M*utL *H*omolog *1* y *3*)

MRN, complejo *M*RE11-*R*AD50-*N*BS1.

MSCI, inactivación meiótica de cromosomas sexuales (*m*eiotic *s*ex *c*hromosome *i*nactivation)

MSH4- MSH5, (*M*utS *h*omolog *4* y *5*)

MSUC, silenciamiento meiótico de cromatina no sinapsada (*m*eiotic *s*ilencing of *u*nsynapsed *c*hromatin)

NCO, no sobrecruzamientos (*n*on-*c*ross*o*ver)

NHEJ, unión de extremos no homólogos (*n*on *h*omologous *e*nd-*j*oining)

- NOR**, región organizadora de nucleolo (*nucleolar-organizing region*)
- PAR**, región pseudoautosómica de los cromosomas sexuales (*pseudo-autosomal region*)
- PBS**, tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*)
- PFA**, paraformaldehído (*paraformaldehyde*)
- PLK1**, (*polo-like kinase 1*)
- PNA**, sonda peptidonucleica (*peptide nucleic acid*)
- RAD21**, cohesina (*radiation repair 21*)
- RAD51**, recombinasa (*radiation repair 51*)
- REC8**, cohesina (*recombinant 8*)
- RNA pol-II**, RNA polimerasa tipo II
- RNA**, ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)
- RPA**, proteína de replicación A (*replication protein A*)
- rpm.**, revoluciones por minuto
- SDSA**, hibridación dependiente de síntesis de hebra (*synthesis dependant strand annealing*)
- SMC1-SMC3**, proteínas estructurales del complejo de cohesinas (*structural maintenance of chromosomes 1 y 3*)
- SOX3**, (*sry-related HMG box 3*)
- SPO11**, proteína de esporulación 11 (*sporulation specific protein 11*)
- SRY**, región determinante del sexo del cromosoma Y (*sex-determining region Y*)
- STAG3**, cohesina (*stromal antigen 3*)
- STED**, microscopía de alta resolución (*stimulated emission depletion*)
- SYCE1-SYCE2-SYCP3**, proteínas accesorias del element central (*synaptonemal complex central element protein 1, 2 y 3*)
- SYCP1-SYCP2-SYCP3**, proteínas del complejo sinaptonémico (*synaptonemal complex protein 1, 2 y 3*)
- TAE**, Tris/Acetato/EDTA (*Tris/Acetate/EDTA*)

TERB, proteínas asociadas al telómero (*telomere repeat-binding bouquet formation proteins*)

TEX12, (*testis expressed 12*)

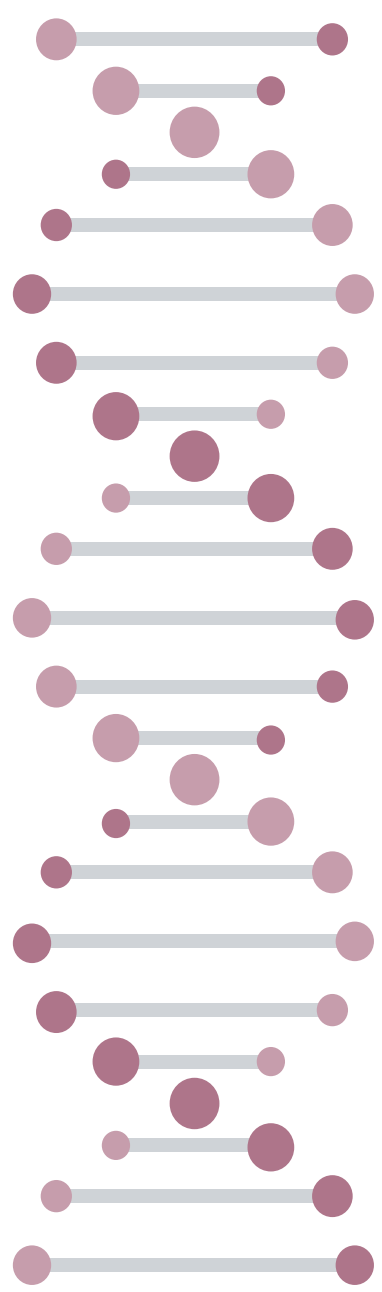
TRIS, *2-Amino-2-(hydroxymethyl) propane-1,3-diol*

XAR e **YAR**, región añadida en el cromosoma X o Y (*X/Y added region*)

XCR e **YCR**, región conservada en el cromosoma X o Y (*X/Y conserved region*)

γH2AX, variante estructural de la histona H2A fosforilada en el residuo de serina 139

Los acrónimos empleados en este trabajo son los utilizados habitualmente en los textos científicos escritos en inglés para facilitar de esta forma la lectura del texto.



RESUMEN



La meiosis es un tipo de división celular específica de la línea germinal de los organismos eucariotas que da lugar a la formación de gametos haploides y es esencial para la reproducción sexual. Consta de dos divisiones consecutivas sin duplicación de DNA entre ambas. En la primera división meiótica tienen lugar los fenómenos exclusivos de apareamiento, sinapsis, recombinación y segregación de los cromosomas homólogos. Los cromosomas sexuales presentan variaciones en alguno de estos procesos. En la mayoría de los mamíferos, los cromosomas X e Y sinapsan y recombinan durante la meiosis masculina en una pequeña región de homología denominada región pseudoautosómica (PAR). La presencia de un quiasma en esta región PAR asegura que los cromosomas puedan segregarse de manera correcta. Sin embargo, existen especies en las que los cromosomas sexuales han alcanzado distintos estadios de diferenciación y algunas presentan cromosomas X e Y completamente diferenciados. En otros casos, se han producido translocaciones de los cromosomas sexuales con autosomas, originando sistemas complejos de cromosomas sexuales.

A fin de comprender estos casos de evolución de cromosomas sexuales y su impacto en el comportamiento meiótico, en esta Tesis Doctoral se presenta un estudio del comportamiento y organización de los cromosomas sexuales durante la meiosis masculina en dos grupos de mamíferos:

- Monotremas, que presentan un sistema de cromosomas sexuales extraordinariamente complejo: $X_{1-5} Y_{1-5}$, en el caso del ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*) y $X_{1-5} Y_{1-4}$ en el equidna de hocico corto (*Tachyglossus aculeatus*). En ambas especies los cromosomas sexuales forman una cadena cromosómica alterna entre sus cromosomas X e Y, debido a la existencia de translocaciones recíprocas.
- Marsupiales, específicamente el grupo de los ualabíes, que presentan reordenamientos cromosómicos Robertsonianos. Es el caso del ualabí de pantano (*Wallabia bicolor*), que presenta una fusión de un autosoma con el cromosoma X, formando un sistema cromosómico XY_1Y_2 .

Hemos analizado el comportamiento de los cromosomas sexuales durante la meiosis mediante técnicas inmunocitológicas, moleculares y de microscopía de fluorescencia y confocal de alta resolución. Por medio de estas metodologías se ha analizado la expresión, distribución y dinámica de diferentes proteínas involucradas en la regulación de la estructura y comportamiento de los cromosomas durante la meiosis: cohesinas meióticas (SMC3, SMC1 α , SMC1 β , STAG3, REC8), componentes del complejo sinaptonémico (SYCP3 y SYCP1), procesos de recombinación (RPA, RAD51, DMC1 y MLH1) y procesos de actividad transcripcional y modificaciones epigenéticas (RNA polimerasa-II, γ H2AX, H3K9ac, H3K9me3, H3K9me2).

Nuestros resultados muestran que en ornitorrinco se produce una acumulación intensa de cohesinas en los cromosomas sexuales a partir de la etapa de paquitene. Sin embargo, esta acumulación no es un fenómeno exclusivo de los cromosomas sexuales, sino que afecta también a las regiones autosómicas que no han completado la sinapsis, indicando que este fenómeno

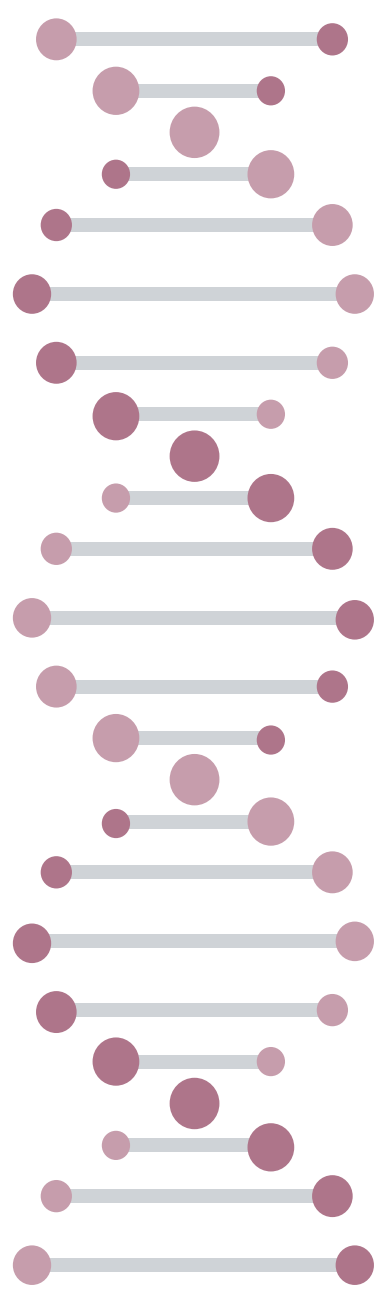
parece ser una respuesta a la presencia de regiones asinápticas en general. La acumulación de cohesinas sobre los cromosomas sexuales y los autosomas desapareados se observa para todas las cohesinas estudiadas (SMC3, SMC1 α , SMC1 β , STAG3) excepto REC8, lo que sugiere que esta proteína tiene una distribución diferencial respecto al resto de proteínas del complejo de cohesina. Además, observamos que STAG3 se acumula transitoriamente en la región centromérica de los bivalentes autosómicos, donde además se interrumpe la asociación de la proteína SYCP1 del complejo sinaptonémico. Esto indica una organización especial de los centrómeros durante la meiosis de ornitorrinco. En cuanto a la dinámica del complejo sinaptonémico, hemos llevado a cabo la inmunolocalización de las tres isoformas de la proteína SCYP3 presentes en ornitorrinco mediante la generación de anticuerpos específicos. Se ha encontrado que el ensamblaje de los elementos laterales está retrasado con respecto a otros mamíferos. Además, la localización de la SYCP3-Y (cuyo gen está localizado en el cromosoma Y₃) es claramente diferente al patrón de las otras dos isoformas, acumulándose específicamente sobre las regiones asinápticas de los cromosomas sexuales y los autosomas. El estudio de la dinámica de las proteínas RPA y RAD51, revela que los fenómenos tempranos de recombinación se resuelven en la etapa de paquitene temprano, antes de las modificaciones morfológicas en sus cromosomas sexuales. Por otro lado, DMC1 y MLH1 mostraron un patrón inesperado, con solo unos pocos focos grandes, muy próximos a la señal centromérica. Finalmente, observamos que los cromosomas sexuales de ornitorrinco no están sujetos al proceso de canónico de inactivación meiótica (MSCI) y no incorporan γ H2AX. Sin embargo, en lo relacionado con modificaciones epigenéticas, muestran algunas características distintivas, posiblemente relacionadas con la presencia de regiones asinápticas.

El estudio de la localización y dinámica de estas mismas proteínas en el equidna revela semejanzas, pero también diferencias importantes con el ornitorrinco. Hemos encontrado que en esta especie no hay cambios morfológicos en sus ejes cromosómicos, ni acumulaciones de cohesinas en las regiones asinápticas de la cadena de cromosomas sexuales. En segundo lugar, hemos detectado igualmente un retraso en el ensamblaje de los elementos laterales del complejo sinaptonémico y que la proteína SYCP3-Y se localiza fundamentalmente sobre las regiones asinápticas de los cromosomas sexuales. Por otro lado, la dinámica de las proteínas relacionadas con los eventos tempranos de recombinación es ligeramente diferente entre las dos especies de monotremas. Por último, tampoco hemos encontrado incorporación de γ H2AX en el equidna, pero sí varias modificaciones epigenéticas que pueden acumularse en los cromosomas sexuales, aunque no parecen estar relacionadas con la actividad transcripcional, sino con la presencia de regiones asinápticas.

Respecto al estudio del ualabí de pantano, hemos observado la coexistencia en los cromosomas sexuales de dos mecanismos de asociación. Por un lado, el cromosoma X y el Y₂ muestran un fenómeno convencional de sinapsis en las regiones que comparten homología (PAR), aunque esta sinapsis está retrasada en relación al resto de cromosomas. Por otro lado, el cromosoma X y el cromosoma Y₁ se asocian mediante una estructura denominada placa densa, en la que participa la proteína SYCP3. La morfología de esta estructura es enormemente variada, indicando una diversidad

de formas en las que se puede iniciar la interacción entre ambos cromosomas. Con respecto al fenómeno de MSCI, en esta especie si hay una incorporación de γ H2AX sobre los cromosomas sexuales, que se correlaciona con la formación de un cuerpo sexual y la presencia de un proceso de inactivación transcripcional de estos cromosomas. Finalmente, hemos podido detectar que los cromosomas sexuales llevan a cabo una segregación temprana, en la que el cromosoma X y el Y_1 siempre migran hacia polos opuestos.

En conjunto, los resultados muestran la aparición de modificaciones en el comportamiento convencional de cromosomas sexuales en las especies estudiadas. Este estudio supone un avance significativo en el conocimiento de la meiosis de dos grupos de mamíferos poco estudiados y proporciona una información importante para entender la dinámica evolutiva de los cromosomas sexuales en mamíferos y sus procesos meióticos asociados.



TERMINOLOGÍA

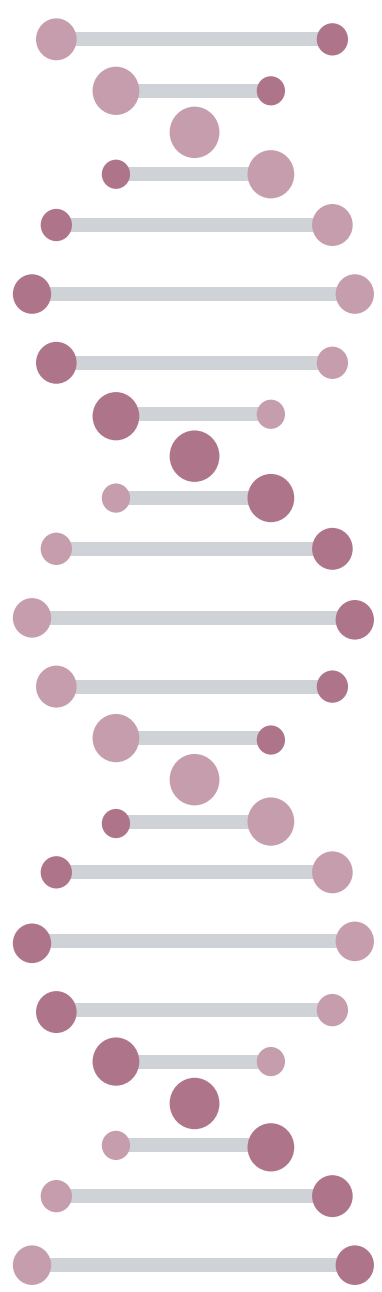
En relación a las cuatro primeras etapas de la primera profase meiótica, denominadas en inglés *leptotene*, *zygotene*, *pachytene* y *diplotene*, en castellano siempre han sido aceptadas las formas acabadas en “-nema” (leptonema, zigonema, paquinema, diplonema), “-tena” (leptotena, zigotena, paquitena, diplotena), “-tene” (leptotene, zigotene, paquitene, diplotene) y “-teno” (leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno).

Teniendo esto en cuenta, en el presente escrito se empleará siempre la terminación “-tene” (leptotene, zigotene, paquitene, diplotene) y con género masculino, pues ha sido aquella con la que me he familiarizado desde mis comienzos en el estudio de la meiosis y la que prevalece sobre las demás en nuestro laboratorio.

Asimismo, en lo que respecta a la segunda de las etapas, las dos posibles grafías son aceptadas como correctas, “cigotene” y “zigotene”. Se empleará aquí la segunda de ellas por los mismos motivos expuestos en el párrafo anterior.

Otro aspecto a tener en cuenta al hablar de meiosis es el fenómeno de la sinapsis. Término del verbo en inglés *to synapse*, usado para referirse a la acción del establecimiento de sinapsis entre los cromosomas homólogos mediante la formación de un complejo sinaptonémico. A falta de un término similar en castellano, se tomó la decisión de adoptar el término directamente traducido, **sinapsar**. Del mismo modo, se hablará de elementos laterales **desinapsados** o el verbo **desinapsar** cuando dichos elementos hayan estado previamente en sinapsis pero esta condición ya no se mantenga, es decir cuando suceda una separación de ambos cromosomas homólogos.

Otros términos que provienen del inglés se han incorporado también en este manuscrito. Usando la abreviatura **DNA**, del inglés *desoxiribonucleic acid*, para hacer referencia al ácido desoxirribonucleico (ADN).



INTRODUCCIÓN

1

La meiosis

La meiosis es un tipo especializado de división celular característica de los organismos eucariotas. Consta de dos divisiones consecutivas sin una ronda de replicación del DNA entre ellas. La primera de estas divisiones es reduccional, ya que los cromosomas homólogos segregan a células hijas distintas, reduciendo por tanto el número cromosómico a la mitad. La segunda división es ecuacional y en ella segregan las cromátidas hermanas de cada cromosoma. Por tanto, como resultado de la meiosis se obtienen cuatro células haploides (n) a partir de una única célula diploide ($2n$). La fusión de células haploides (habitualmente denominados gametos) en el proceso de fecundación restaura la condición diploide.

1.1. Primera división meiótica

Las dos divisiones meióticas tienen grandes diferencias entre sí. Ambas constan de las etapas de profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. Sin embargo, la primera división es particularmente larga y compleja y en ella se dan una serie de procesos exclusivos:

- **Apareamiento:** entendido como la asociación de los cromosomas homólogos entre sí, independientemente de los mecanismos que mantengan su asociación.
- **Sinapsis:** este término se reserva para describir la asociación entre los homólogos mediada por una estructura proteica exclusiva de la meiosis denominada complejo sinaptonémico (**CS**).
- **Recombinación:** que consiste en el intercambio de material genético entre cromosomas homólogos.
- **Segregación reduccional:** en la que los cromosomas homólogos migran a células hijas distintas.

La profase de la primera división meiótica (profase-I) debido a su larga duración y a la cantidad de procesos que ocurren en ella se divide a su vez en cinco subetapas: leptotene, zigotene, paquitene, diplotene y diacinesis (Figura I).

En **leptotene**, una vez ya se ha replicado el DNA, cada cromosoma consta de dos cromátidas hermanas que mantienen su unión gracias a la presencia de mecanismos de cohesión mediados por un conjunto de proteínas denominado complejo de cohesinas. La cromatina está muy poco condensada, formando una maraña de fibras cromosómicas. En esta etapa, comienzan a detectarse una serie de elementos proteicos a lo largo de cada cromosoma. Entre ellos están el **eje de cohesinas (ECo)**, constituido por los componentes del complejo de cohesina, y el **elemento axial (EA)**, una estructura que se comienza a formar en esta etapa y que será el precursor del **elemento**

lateral (EL) del CS que aparecerá a partir de zigotene ([Valdeolmillos et al., 2007](#)). En esta etapa, además, los extremos de cada cromosoma se anclan a la **envoltura nuclear (EN)** por los telómeros. Paralelamente, se inician los fenómenos relacionados con la recombinación meiótica. El primer paso es la generación programada de roturas de doble cadena (**DSB**, *Double Strand Breaks*) en el DNA, en donde se reclutan una serie de proteínas relacionadas con la reparación del DNA por la vía de **recombinación homóloga (HR)**, *Homologous Recombination*)

En **zigotene**, se inicia el apareamiento y la sinapsis de los cromosomas homólogos. La sinapsis conlleva la asociación de una serie de **filamentos transversos (FTs)** a los EAs de los cromosomas y el ensamblaje del **elemento central (EC)** del CS. Esto lleva a la firme asociación de los dos cromosomas homólogos. Hay varios factores que favorecen estos procesos. En primer lugar, los telómeros de los cromosomas, que están unidos a la EN, quedan polarizados en una región del núcleo formando una configuración denominada **bouquet** o ramillete ([Scherthan et al., 2000](#); [Scherthan et al., 1996](#); [Zickler and Kleckner, 1998](#)). Esta dinámica de los telómeros implica un movimiento de los cromosomas lo que contribuye al reconocimiento de cromosomas homólogos y comienzo del proceso de la sinapsis ([Scherthan et al., 1996](#); [Wang et al., 2019](#)). De hecho, la sinapsis empieza generalmente por los telómeros y progresa hacia regiones intersticiales de los cromosomas. En segundo lugar, los fenómenos de reparación del DNA también facilitan el reconocimiento específico de los cromosomas homólogos. Una vez asociados, los cromosomas quedan íntimamente unidos por el CS (ver apartado 1.3) ([Page and Hawley, 2004](#)).

En paquitene la sinapsis es completa y el CS consta de todos sus elementos característicos (ELs, FTs y EC), de modo que los cromosomas homólogos quedan asociados en toda su longitud formando los bivalentes meióticos (también denominados tétradas). Además, morfológicamente los cromosomas se acortan y se hacen más gruesos debido a la condensación de la cromatina. Durante esta etapa, se producen las últimas fases del proceso de recombinación, que llevan al intercambio recíproco de material genético entre los cromosomas homólogos, dando lugar a formación de los sobrecruzamientos o *crossovers*.

En **diplotene** se produce la desinapsis de los cromosomas homólogos. Es un proceso gradual en el que se desensamblan los componentes de los FTs y del EC del CS y se produce una separación de ambos cromosomas homólogos. Los puntos de sobrecruzamiento son visibles citológicamente en esta etapa y se denominan **quiasmas** ([Page and Hawley, 2004](#)).

La última etapa de la profase-I es la **diacinesis**, donde los cromosomas se condensan notablemente y finalmente pierden el anclaje a la EN. La desorganización de la EN marca el inicio de la **prometáfase-I**, en la que los cromosomas comienzan a interactuar con los microtúbulos del huso meiótico. En este punto, comienzan los movimientos de congregación de los bivalentes hasta que quedan estabilizados en el ecuador de la célula. Una vez que los bivalentes están correctamente alineados y posicionados en la placa metafásica podemos decir que la célula se encuentra en **metafase-I**. A continuación, se inicia la etapa de **anafase-I**, en la que se produce una liberación de la cohesión a nivel de los brazos cromosómicos y los homólogos migran a polos opuestos de la célula,

produciéndose una **segregación reduccional**. Por último, en **telofase-I** se descondensa la cromatina, se reconstruye la EN y se produce la división de la célula inicial en dos células hija con la mitad de dotación cromosómica (n) (Figura I).

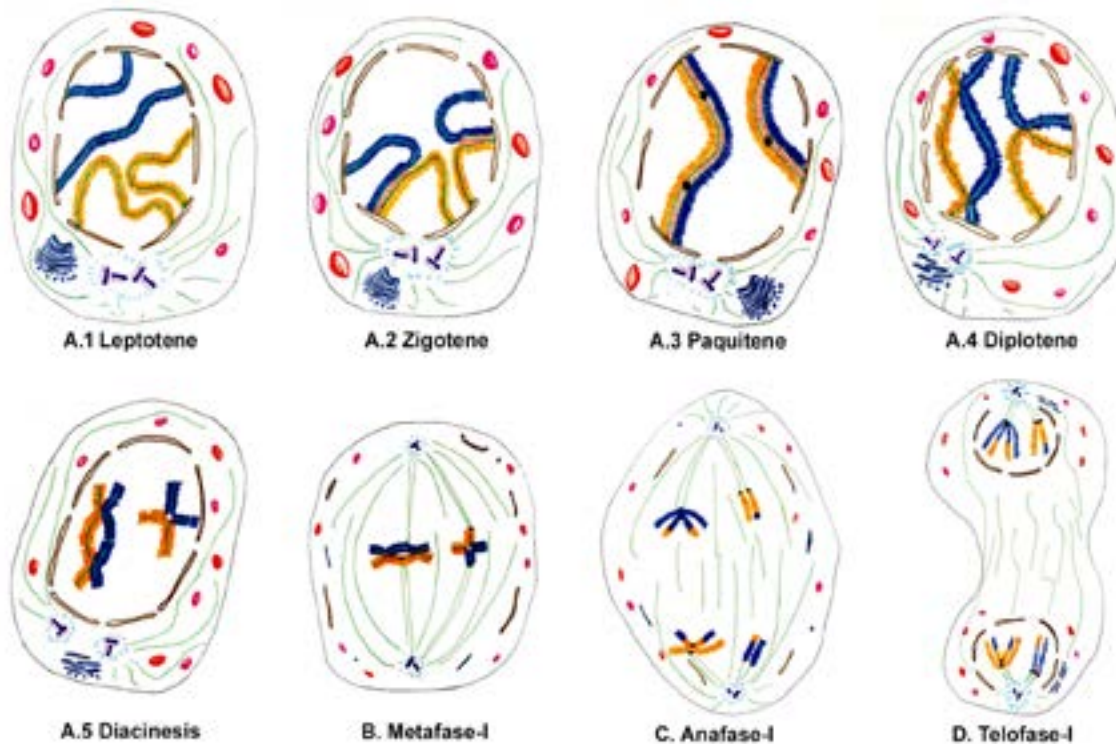


Figura I. Ilustraciones de las etapas de la primera división meiótica. Las imágenes A1-5 corresponden a profase-I. Quedan representados únicamente dos parejas de homólogos. En leptotene (**A.1**) los telómeros quedan anclados en la EN y se forman los EAs (representados por líneas verdes delgadas en el interior de los cromosomas). En zigotene (**A.2**) la sinapsis de los cromosomas homólogos comienza mediante la asociación de los FTs (representados por líneas de color naranja) y la formación del EC. La configuración de bouquet contribuye al inicio de la sinapsis. En paquitene (**A.3**) los homólogos están completamente sinapsados. Aparecen los focos de recombinación recíproca (o nódulos de recombinación, representados como puntos negros). En diplotene (**A.4**) se desensamblan los FTs y el EC del CS y los cromosomas homólogos se quedan unidos exclusivamente por los quiasmas. En diacinesis (**A.5**) la cromatina se condensa y los telómeros se desprenden de la EN. En metafase-I (**B**) los bivalentes quedan alineados en la placa ecuatorial. En anafase-I (**C**) los cromosomas homólogos migran a polos opuestos de la célula. Finalmente, en telofase-I (**D**) alcanzan los polos y se vuelve a formar la EN. La división es reduccional, por lo que las células resultantes presentan la mitad del complemento cromosómico.

1.2. Segunda división meiótica

Tras la primera división meiótica hay una breve interfase denominada **intercinesis**, donde no hay replicación del DNA. La **profase-II** es muy rápida; en ella se condensan los cromosomas y al final de la misma se vuelve a desorganizar la EN. Los cromosomas en **metafase-II** se unen a los microtúbulos y se alinean en la placa ecuatorial con las cromátidas hermanas orientadas a polos puestos. En **anafase-II** se produce una **segregación ecuacional** y se separan las cromátidas hermanas. Finalmente, en **telofase-II** se completa la migración, se descondensa nuevamente la cromatina y se reconstruye la EN (Figura II).

Tras las dos divisiones consecutivas obtendremos células haploides, diferentes entre sí y distintas a la célula madre, que, tras un proceso de diferenciación, **espermatoogénesis** en machos y **oogénesis** en hembras, darán lugar a los **gametos**.

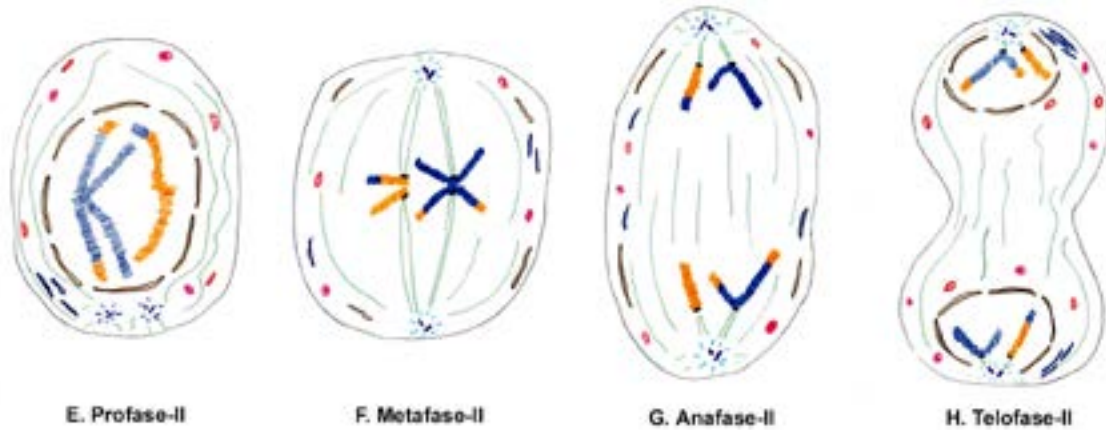


Figura II. Ilustraciones de las etapas de la segunda división meiótica. Los cromosomas muestran fragmentos de distinto color debido al proceso de recombinación durante la primera división meiótica. En profase-II (E) los cromosomas se vuelven a condensar. En metafase-II (F) los cromosomas se alinean en la placa ecuatorial. En anafase-II (G) las cromátidas migran hacia lados opuestos de la célula. Cuando alcanzan los polos en telofase-II (H), se vuelve a formar la EN. En este caso la división es ecuacional.

2

Procesos específicos de la meiosis

Como se ha mencionado anteriormente, hay varios procesos exclusivos que ocurren en la primera división meiótica: el apareamiento y la sinapsis, la recombinación y la segregación cromosómica. Cualquier problema o alteración en alguno de estos procesos puede provocar graves consecuencias que van desde problemas de fertilidad hasta la generación de aneuploidías en la descendencia ([Suja and Barbero, 2009](#)). A continuación, se explican los detalles de cada uno de ellos.

2.1. Apareamiento y sinapsis

La unión de los cromosomas homólogos durante la profase-I meiótica se puede dividir en tres pasos distintos: reconocimiento, alineamiento y sinapsis por medio del CS (ver apartado 3.1) ([Zickler, 2006](#)). Estos procesos conllevan un acercamiento progresivo de los cromosomas homólogos y el establecimiento de una asociación física entre ellos, hasta la yuxtaposición y unión estable en toda su longitud.

Para que se produzca esta unión es necesario que los cromosomas se dispongan en paralelo y estén alineados. Esto viene facilitado por la asociación de los extremos de los cromosomas a la EN y su desplazamiento por la superficie interna de la misma. El complejo MAJIN-TERB1-TERB2 es uno de los principales encargados de estos movimientos. TERB1-TERB2 (*Telomere Repeat-binding Bouquet*

formation proteins 1 and 2) son las proteínas meióticas unidas a los telómeros que interactúan con la proteína transmembrana MAJIN (*Membrane-Anchored Junction proteIN*) ([Dunce et al., 2018](#); [Link et al., 2016](#)). Se establece una conexión física a través de una interacción perinuclear de las proteínas SUN (*Sad-1/UNC-84*) y KASH (*Klarsicht/ANC-1/Syne/homology*). Estos movimientos de los cromosomas son logrados gracias a las proteínas SUN1 y SUN2 ([Ding et al., 2007](#); [Link et al., 2014](#)) y una proteína de dominio KASH que es específica de meiosis denominada KASH5, que es esencial para acercamientos entre los telómeros ([Horn et al., 2013](#); [Morimoto et al., 2012](#)). Debido a estos movimientos, los extremos de los cromosomas se agrupan en una región concreta del núcleo, formando la configuración de *bouquet*, lo que supone un acercamiento real de los homólogos, facilitándoles de esta forma reconocerse e interactuar ([Zickler and Kleckner, 1998](#)).

Estos eventos suceden de forma paralela al inicio de los procesos de recombinación. Así, el reconocimiento de los homólogos puede ser de dos tipos: dependiente o independiente de recombinación. El primero es el mecanismo más extendido, tanto en hongos, como animales y plantas ([Bhalla and Dernburg, 2008](#); [Giroux et al., 1989](#); [Grelon et al., 2001](#); [Zickler, 2006](#)). En este caso, posiblemente el reconocimiento se produce por la comparación de secuencias entre cromosomas con el fin de encontrar una secuencia homóloga que pueda ser utilizada como molde en la reparación de las **DSBs** por la vía de **HR**. Por otro lado, el mecanismo independiente de la recombinación es típico de algunos organismos, como *Caenorhabditis elegans* ([Villeneuve, 1994](#)), *Drosophila melanogaster* ([Kinner et al., 2008](#)) o *Schizosaccharomyces pombe* ([Krejci et al., 2012](#)). En estos casos el reconocimiento puede estar mediado por regiones cromosómicas específicas denominadas centros de apareamiento ([Hawley, 1980](#); [Maguire, 1986](#); [McKim et al., 1993](#); [Villeneuve, 1994](#)) o por la síntesis de RNAs no codificantes ([Ding et al., 2019](#); [Ding et al., 2012](#); [Tsai and McKee, 2011](#)).

En la mayor parte de los organismos el apareamiento de los cromosomas homólogos culmina con el ensamblaje del **CS**, que mantiene firmemente asociados los cromosomas durante la etapa de paquitene ([Page and Hawley, 2004](#)). Aunque, la estructura detallada del CS se describirá más adelante (ver apartado 3.1), es importante señalar que el ensamblaje de esta estructura es un proceso crucial para el correcto desarrollo de la meiosis. Ha sido descrito que en ausencia del CS los fenómenos de recombinación y segregación cromosómica se ven gravemente comprometidos ([Kouznetsova et al., 2005](#); [Yang et al., 2006](#); [Yuan et al., 2000](#)). Además, se ha identificado que las células son capaces de detectar errores en el proceso de sinapsis, lo cual detiene la progresión de la meiosis (*synapsis checkpoint*) ([Burgoyne et al., 2009](#)). Aunque los factores que actúan en la misma no están totalmente esclarecidos y posiblemente se combinan con los mecanismos de control de la recombinación, sí se ha demostrado que los fallos en la sinapsis llevan a una respuesta epigenética específica de las células meióticas. En diversos grupos de organismos se ha observado que las regiones que no completan la sinapsis se desencadena un fenómeno de represión transcripcional, conocido como silenciamiento meiótico de cromatina no sinapsada (**MSUC**, *Meiotic Silencing of Unsynapsed Chromatin*) ([Baarends et al., 2005](#)). Este proceso generalmente se pone de manifiesto en el inicio de paquitene y está asociado a cambios en la organización de la cromatina, principalmente modificaciones de las histonas ([Baarends et al., 2005](#); [Handel, 2004](#); [Hoyer-Fender, 2003](#); [van der Heijden et al., 2007](#)).

2.2. Recombinación

Al mismo tiempo que se inician los fenómenos de sinapsis se produce el fenómeno de recombinación entre los cromosomas homólogos. Este es en esencia un fenómeno de reparación del DNA que ocurre durante la meiosis, cuyas roturas se reparan principalmente por la vía de la **HR** (Figura III). Este proceso se inicia en leptotene con la formación de DSBs catalizadas por la enzima **SPO11** (*SPO*lulation protein 11) ([Keeney and Neale, 2006](#); [Neale et al., 2005](#); [Romanienko and Camerini-Otero, 2000](#)). El número de DSBs debe ser suficiente para permitir que los cromosomas busquen y encuentren a sus homólogos, pero no excesivo hasta el punto de causar inestabilidad en el genoma. El gen *Tex19.1* específico de mamíferos promueve la recombinación dependiente de SPO11 en espermatoцитos de ratón ([Crichton et al., 2017](#)). Las DSBs se producen en los llamados puntos calientes de recombinación (*hot spots*) ([Kumar et al., 2015](#)). La detección de estas roturas es llevada a cabo principalmente por las proteínas **ATM** (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) y **ATR** (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related*) ([Kurzbaue et al., 2012](#)). Estas proteínas son quinasas que fosforilan varios substratos, como las quinasas CHK1 y CHK2 y la histona H2AX en la serina 139 dando lugar a la variante **γ H2AX**, cuya presencia permite detectar los lugares de rotura y la atracción de factores de reparación sobre estas regiones ([Sharma et al., 2012](#)).

La quinasa ATM se activa y une al DNA con ayuda del complejo **MRN**, constituido por MRE11, RAD50 y NBS1, para producir la liberación de SPO11. El complejo MRN además tiene una función de resección de los extremos 5', junto a proteínas como EXO1, SGS1-DNA2, BRCA-1 y BLM ([Lange et al., 2011](#); [Langerak and Russell, 2011](#); [Lipkin et al., 2002](#)). De este modo dejarán expuestos los extremos 3' como cadenas de DNA sencillas, los cuales son recubiertos por la proteína **RPA** (*Replication Protein A*). Esta proteína es esencial para la estabilización y protección de las cadenas sencillas del DNA, potencialmente frágiles, facilitando la formación de estructuras secundarias ([Chen and Wold, 2014](#)). Esta estabilización permite que RPA se una al complejo **ATR-ATRIP** ([Mansour et al., 2008](#); [Widger et al., 2018](#)), promoviendo el reemplazo gradual de RPA por las recombinasas **RAD51/DMC1**.

Mientras que **RAD51** está presente en la línea somática y en la línea germinal, **DMC1** es específica de meiosis. Ambas proteínas median la recombinación entre cromosomas homólogos, lo que facilitaría el reconocimiento de éstos, promoviendo su apareamiento y el inicio de la sinapsis ([Masson and West, 2001](#)). Estas dos proteínas forman filamentos nucleoproteicos encargados de la búsqueda de homología y la invasión del cromosoma homólogo ([Brown and Bishop, 2014](#)). Esta invasión puede resolverse mediante la captura del segundo extremo y la síntesis de DNA utilizando como molde la hebra del cromosoma homólogo y siguiendo un proceso de reparación de DNA que ocurre por la vía de HR ([Brown and Bishop, 2014](#)). Esto da como resultado un bucle de desplazamiento o bucle D (*D-loop*) que puede resolverse por múltiples vías: dando lugar a un **sobrecruzamiento (CO, CrossOver)** o **no sobrecruzamiento (NCO, Non-CrossOver)** ([Hunter, 2015](#)). La mayoría de los eventos de reparación se resuelven por la vía NCO (aproximadamente un 90 %), que dan lugar a procesos de conversión génica en los que no hay intercambio recíproco de información genética. El resto de los eventos de reparación se resuelven como CO ([Baudat et al., 2013](#); [Keeney and Neale, 2006](#); [Matulis and Handel, 2006](#)).

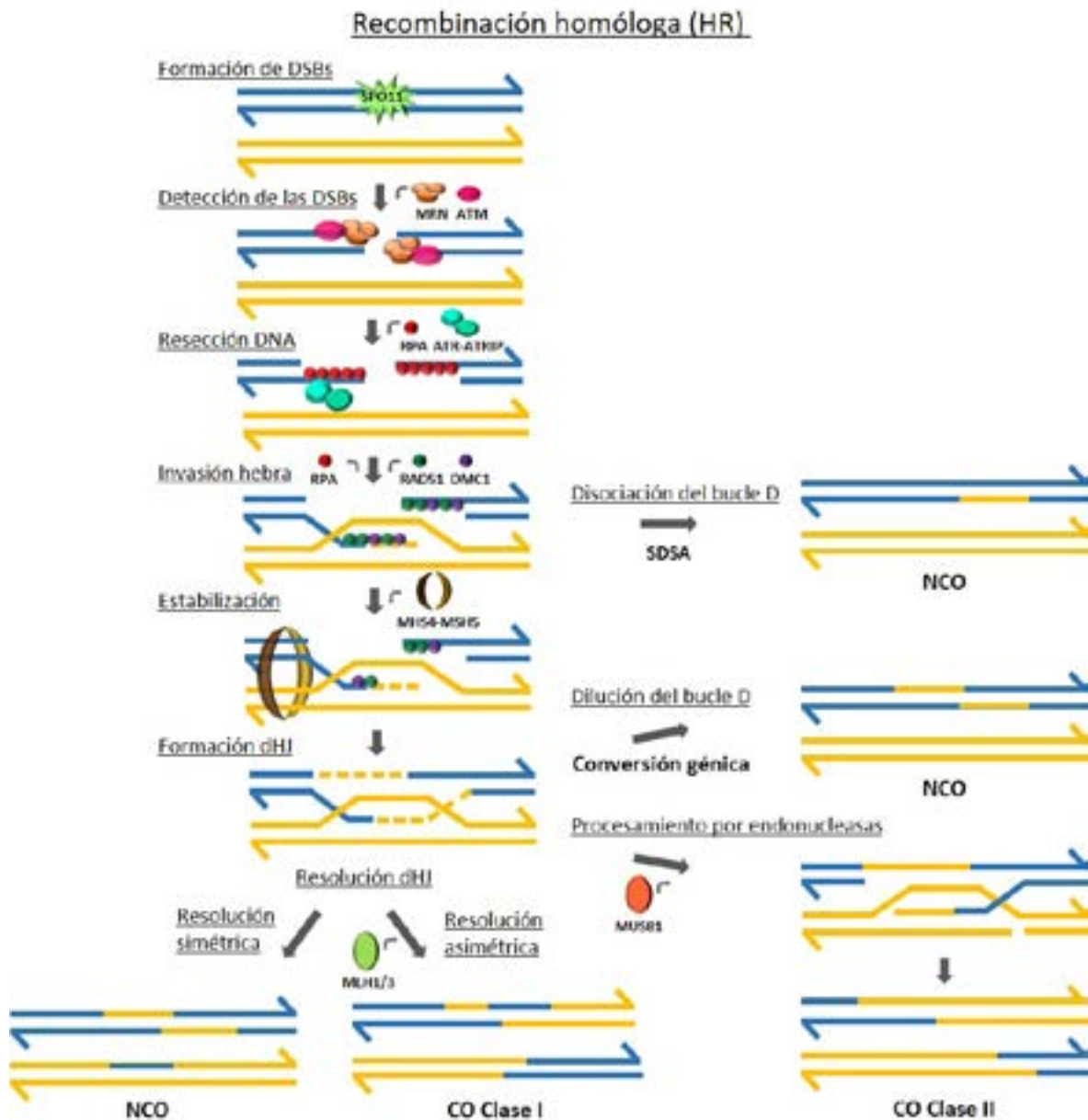


Figura III. Esquema representativo de las diferentes vías de reparación durante el proceso de recombinación homóloga. Durante la meiosis, las roturas de DNA inducidas por SPO11 entran en la vía HR y se produce una detección de las DSBs mediante ATM y el complejo MRN. Se produce una resección del DNA, dejando libres cadenas de DNA sencillas sobre las que se incorporan proteínas como RPA. Seguidamente, las proteínas RAD51 y DMC1 reemplazan a RPA y se inicia una búsqueda del homólogo e invasión de la hebra complementaria. Esto puede resolverse mediante la vía SDSA y sin captura del segundo extremo o con la captura del segundo extremo y síntesis de DNA utilizando como molde la hebra del cromosoma homólogo y formación del doble intermediario de *Holliday* (dHJ). El dHJ puede resolverse por diferentes vías: disolución del bucle D sin que se produzca sobrecruzamiento; mediante el procesamiento por endonucleasas (MUS81), donde se produce un sobrecruzamiento de clase II; mediante la resolución de dHJ por un procesamiento simétrico (sin sobrecruzamiento); o mediante el procesamiento asimétrico donde se produce un sobrecruzamiento de clase I, en el que participan proteínas como MHL1/3.

A continuación se van a formar dos intermediarios secuenciales, el primero es un intermediario estable de invasión de la hebra sencilla (SEI, *Single End Invasión*). El segundo se produce después de la formación del bucle D, este produce una síntesis de DNA en el extremo 3' invasor con la cadena homóloga como molde hasta llegar al extremo 5'. Tras esto tiene lugar una nueva síntesis de DNA

para completar la secuencia que se había perdido en los extremos. Por último, los extremos se unen para producir un **doble intermediario de Holliday (dHJ, double Holliday Junction)**. Estos eventos son promovidos a través de la estabilización de proteínas del grupo ZMM, como el complejo **MSH4/MSH5** (Snowden et al., 2004). Una vez formado, el dHJ debe resolverse para liberar los cromosomas homólogos recombinados. Los sobrecruzamientos de clase I implican la resolución de dHJ por medio de las proteínas **MLH1** y **MLH3** que se localizan en los puntos de quiasma (de Massy, 2003; Moens et al., 2007).

Además de la ruta canónica de recombinación, existen otras rutas que pueden dar lugar a resultados distintos en el proceso de reparación. Así, puede invadir solo un extremo del DNA y se resuelve la rotura por la vía de hibridación dependiente de síntesis de hebra (**SDSA, Synthesis Dependant Strand Annealing**) (de Massy, 2003). Esta ruta de recombinación homóloga es más sencilla ya que no da lugar a un sobrecruzamiento. Por otro lado, el dHJ puede resolverse por una ruta dependiente de la endonucleasa **MUS81** (Baudat et al., 2013; Holloway et al., 2008). En este caso sí se producen sobrecruzamientos, denominados de tipo II. Se estima que, en mamíferos, alrededor de un 10 % de los sobrecruzamientos son de este tipo (Milano et al., 2019).

Por último, aunque durante la meiosis la principal vía de reparación de DSBs es la de HR, en determinadas circunstancias es posible que se active la vía de unión de extremos no homólogos (**NHEJ, Non-Homologous End-Joining**). Esta vía se ha detectado por ejemplo tras la inducción de daño exógeno en el DNA en etapas tardías de la profase-I (Ahmed et al., 2010; Ahmed et al., 2007; Enguita-Marruedo et al., 2019). La vía de NHEJ utiliza cualquier extremo libre del DNA para reparar las DSBs, independientemente de si el extremo es el correcto o no, por lo que es menos específica y frecuentemente lleva a la producción de translocaciones cromosómicas. En esta vía, actúa en primer lugar un heterodímero **Ku70-80** localizando las DSBs y uniéndose a estas regiones. La subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de DNA (DNA-PKcs) tiene una alta afinidad por los extremos Ku-DNA y forma el complejo de DNA-PK. Éste se autofosforila y activa la acción de la endonucleasa Artemis. El paso final y esencial es la unión entre los extremos que es llevado a cabo por la Ligasa-IV, mediante el reclutamiento de un complejo de cofactores que incluyen a XRCC4 y XLF, que forman largas estructuras filamentosas alrededor y sobre sitios de DSB (Conlin et al., 2017; Chang et al., 2017). En ningún caso se ha detectado que esta vía pueda llevar a la formación de sobrecruzamientos.

2.3. Segregación

La segregación de los cromosomas homólogos es el último proceso clave de la primera división meiótica. Para que se produzca correctamente es necesario que ocurran varios eventos durante la meiosis. En primer lugar, es necesario que la sinapsis y la recombinación hayan ocurrido de forma correcta, ya que se necesita al menos de un quiasma entre los cromosomas homólogos para asegurar que estos se mantengan unidos hasta metafase-I. En segundo lugar, es necesaria

una orientación coordinada de los cinetocoros hermanos. Durante metafase-I se produce una orientación sintética, en la cual los cinetocoros hermanos se orientan juntos hacia el mismo polo celular. Existen varios factores implicados en promover esta orientación sintética, entre los que se encuentran algunos componentes del complejo de cohesinas, del complejo sinaptonémico y el complejo de monopolina ([Corbett et al., 2010](#); [Parra et al., 2003](#); [Suja and Barbero, 2009](#); [Toth et al., 2000](#)). De esta manera, los cromosomas homólogos migran a polos opuestos, por lo que se produce una segregación cromosómica reduccional. Sin embargo, en metafase-II los cromosomas se alinean en la placa metafásica orientando sus cinetocoros hermanos de manera anfitélica, uniéndose a los microtúbulos de polos opuestos y llevando a cabo una segregación de tipo ecuacional en anafase-II ([Suja and Barbero, 2009](#)).

Además de la correcta orientación de los cinetocoros, se requiere una liberación secuencial de la cohesión entre cromátidas hermanas. Durante la primera división meiótica hay una liberación parcial de la cohesión, solamente a lo largo de los brazos cromosómicos. En primer lugar, durante las últimas etapas de la profase-I la fosforilación de las proteínas que forman parte del complejo de cohesina por las quinasas PLK1 (*Polo-Like Kinase 1*) y Aurora B permite que una parte de las cohesinas se liberen y esto facilita la condensación y compactación de los cromosomas ([Weitzer and Uhlmann, 2002](#)). En segundo lugar, en la transición de metafase-I a anafase-I, la acción de proteólisis llevada a cabo por la proteasa separasa degrada las cohesinas que se encuentran a lo largo de los brazos cromosómicos. La separasa permanece inactiva hasta la transición de metafase a anafase-I mediante la unión a su inhibidor específico, la securina ([Nasmyth et al., 2000](#)). Sin embargo, en esta etapa solo se produce la liberación de la cohesión a lo largo de los brazos cromosómicos. Esto permite la segregación de los homólogos en anafase-I, mientras que mantienen la asociación de las cromátidas hermanas en la región centromérica. Esto es debido a la acción de proteínas que protegen a cohesión centromérica. Estas proteínas son las Shugoshinas (Shugoshina 1-2), de las cuales la Shugoshina 2 es esencial en meiosis ([McGuinness et al., 2005](#); [Panier and Boulton, 2014](#)). Durante la metafase-I, las shugoshinas permanecen en el dominio centromérico interno y de esta manera las cohesinas quedan protegidas frente a la degradación por la separasa. En la metafase-II, la tensión que se ejerce de los cinetocoros desenmascara los complejos de cohesión centroméricos dejándolos accesibles frente a la separasa. De esta manera, la cohesión centromérica se libera en la transición de metafase-II a anafase-II, lo que permite la segregación de las cromátidas hermanas a polos opuestos ([Gómez et al., 2007](#)).

3

Organización estructural de los cromosomas durante la meiosis

Como se ha mencionado previamente, la organización del cromosoma durante la meiosis está claramente marcada por la formación de una estructura proteica específica, el complejo sinaptonémico. Sin embargo, hay otras estructuras que también son relevantes para entender la organización y comportamiento de los cromosomas. A continuación, se detallan los componentes y la organización de los mismos.

3.1. Complejo sinaptonémico

El **CS** es una estructura específica de la meiosis que media la estrecha asociación entre los cromosomas homólogos, es decir la sinapsis entre ellos (Figura IV). Esta estructura es un macrocomplejo que recorre los cromosomas en toda su longitud y está constituido principalmente por dos **elementos laterales (ELs)**, uno en cada cromosoma homólogo, una serie de **filamentos transversos (FT)** que se asocian a cada EL y que interaccionan entre sí para dar lugar a la formación de un **elemento central (EC)** (Fawcett, 1956; Moses, 1956). El CS es una estructura muy conservada evolutivamente a nivel estructural, aunque la secuencia de sus componentes proteicos es muy variable de unos organismos a otros (Fraune et al., 2012).

El ensamblaje de los componentes del SC se inicia en leptotene, con la formación de los **elementos axiales (EAs)**, que se anclan sobre el **scaffold** cromosómico, y otras estructuras axiales como el eje de cohesina (ECo). Los EAs están constituidos principalmente por las proteínas **SYCP2** (*Synaptonemal Complex Protein 2*) y **SYCP3** (*Synaptonemal Complex Protein 3*) (Dobson et al., 1994) y además colocalizan con las proteínas **HORMAD**, que se ubican preferentemente en regiones asinápticas (Shin et al., 2010; Wojtasz et al., 2009). La sinapsis comienza en la etapa de zigotene, en la que se produce la asociación de los EAs (ahora denominados ELs) y los filamentos transversos (FTs) constituidos principalmente por la proteína **SYCP1** (*Synaptonemal Complex Protein 1*) (Heyting, 1996). Los FTs se autoensamblan entre los ELs de los dos cromosomas homólogos de forma similar a una cremallera. La imbricación de los FTs en la zona central del CS da lugar a la formación del EC, al que se asocian otras proteínas accesorias: **SYCE1**, **SYCE2** (Costa et al., 2005), **TEX12** (Hamer et al., 2006) **SYCE3** (Rogakou et al., 1999) y **SIX6OS1** (Gómez et al., 2016). Estas proteínas dependen de SYCP1 para su correcta incorporación en zigotene.

El proceso de desensamblaje del CS ocurre en diplotene. Los FTs y los componentes de EC se disocian del CS quedando los cromosomas unidos únicamente por las regiones de sobrecruzamiento (Fraune et al., 2012). La quinasa PLK1 fosforila las proteínas SYCP1 y TEX12 (Roig et al., 2010), lo que produce una desorganización del CS quedando únicamente los ELs a lo largo de los cromosomas.

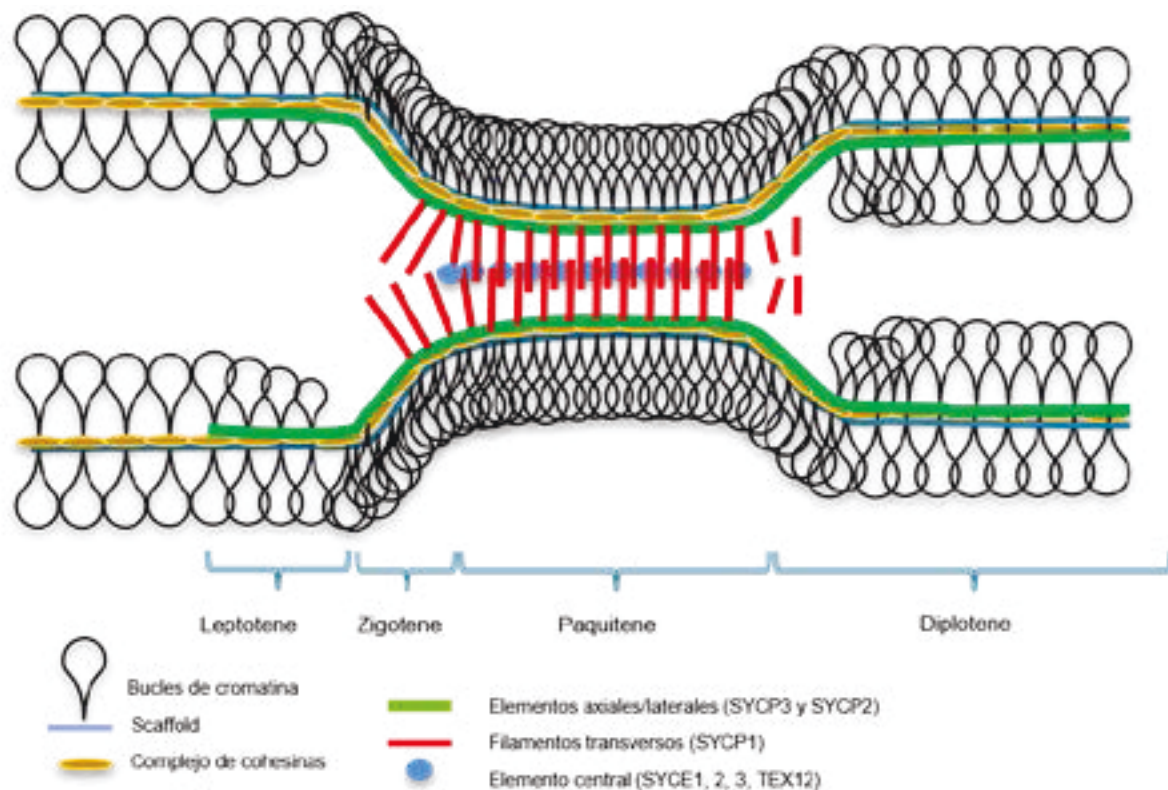


Figura IV. Representación de los componentes proteicos del CS y su interacción. Los bucles de cromatina se disponen de manera lateral y los EAs formados por SYCP3 y SYCP2 junto al EC se anclan sobre el *scaffold* en la fase de leptotene. A partir de zigotene los cromosomas homólogos empiezan sinapsar. Se produce la incorporación de los FTs (SYCP1) y en paquitene cuando la sinapsis es completa a la región central del CS se asocian SYCE1, 2 y 3, TEX12 y SIX6OS1, formando el elemento central. En diplotene se desensambla el CS, desprendiéndose las proteínas del EC y de los FTs.

3.2. Complejo de cohesinas

La presencia de mecanismos que mantengan la asociación de las cromátidas hermanas de cada cromosoma es un requisito indispensable para la correcta segregación de los cromosomas tanto en mitosis como en meiosis. La cohesión entre las cromátidas hermanas se establece durante la fase S y es proporcionada por el **complejo de cohesinas (CC)**. Este complejo fue caracterizado inicialmente en *Saccharomyces* y *Xenopus* y posteriormente se ha demostrado que está presente en todos los eucariotas (Michaelis et al., 1997; Rothkamm et al., 2015). El CC es un complejo multiproteico formado por cuatro subunidades centrales denominadas cohesinas. Dos de estas subunidades son proteínas de la familia SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*): **SMC1** y **SMC3**, las cuales forman un heterodímero. Cada una de las proteínas SMC está compuesta por dos dominios α -hélice en la región central, enrollados sobre sí mismos formando una hélice antiparalela y unidos por un codo, y dos dominios globulares en los extremos N y C terminal, que se asocian entre sí formando un dominio ATPasa (Anderson et al., 2002). La unión entre SMC1 y SMC3 se establece por un lado a través de sus dominios de codo, y por otro a través de los dominios ATPasa. Este dominio desarrolla un papel crucial en el establecimiento y la liberación de la cohesión (Schwacha and Kleckner, 1997). La tercera subunidad de cohesinas pertenece a una súper familia de kleisinas (“*kleisimo*” = “cierre”

en griego) (Gruber et al., 2003; Haering et al., 2004; Sumara et al., 2000). La subunidad de kleisina RAD21, interacciona por su región C-terminal con la cabeza de la ATPasa de SMC1 y por su región N-terminal con la cabeza ATPasa de SMC3, de modo que se forma una estructura en forma de anillo que queda cerrado por la kleisina (Figura V) (Litwin and Wysocki, 2018; Nishiyama, 2018). La cuarta subunidad que forma el complejo de cohesinas pertenece a la familia de los antígenos del estroma SA o STAG, la cual interacciona con la α -kleisina. Así, en células somáticas, el complejo de cohesinas está formado por **SMC1 α** y **SMC3**, formando el heterodímero, la α -kleisina **RAD21** que las une y dos proteínas accesorias, **STAG1/STAG2** (Nasmyth, 2011). Algunas de estas proteínas se pueden localizar, aunque con dificultad, por medio de técnicas de inmunofluorescencia, que revelan la disposición de las mismas a lo largo de los cromosomas en la región entre las cromátidas hermanas (Hirano, 2015).

Durante la meiosis, sin embargo, el CC muestra algunas diferencias notables respecto a su composición, organización y funciones comparado con las células somáticas. En primer lugar, aunque el anillo de cohesina muestra una estructura similar, durante la meiosis su composición es diferente, dado que aparecen algunos componentes exclusivos que sustituyen parcial o totalmente a las subunidades somáticas (Suja and Barbero, 2009). En las células germinales de mamíferos, SMC1 α y STAG1/STAG2 se reemplazan en gran medida por otras subunidades de cohesión específicas de la meiosis, **SMC1 β** y **STAG3**, respectivamente (Ishiguro, 2019). Por otro lado, se sintetizan dos formas meióticas de la kleisina, **REC8** y **RAD21L**, que pueden aparecer conjuntamente con RAD21. En segundo lugar, la distribución de las cohesinas a lo largo de los cromosomas durante la meiosis, principalmente durante la profase-I, es visible citológicamente. De hecho, se ha descrito la formación de una estructura longitudinal a lo largo de los cromosomas desde la etapa de leptotene hasta diplotene (Figura IV), que recibe el nombre de eje de cohesinas (ECo) (Prieto et al., 2001). En tercer lugar, algunos trabajos han puesto de manifiesto que algunas de estas subunidades muestran diferentes distribuciones espacio-temporales en las divisiones meióticas. Se ha propuesto que en la meiosis de mamíferos el complejo formado por SMC1 α /SMC3 jugaría un papel principalmente en la cohesión a lo largo de los brazos cromosómicos, mientras que el complejo SMC1 β /SMC3 estaría involucrado en la cohesión tanto de brazos en la región centromérica. Así, se demostró que SMC1 α se pierde de las regiones cromosómicas desinapsadas en diplotene y no se detecta en los bivalentes durante diacinesis y metafase-I (Eijpe et al., 2000). Sin embargo, SMC3 permanece asociada a los cromosomas en esta etapa y después se va acumulando en los centrómeros durante diacinesis. Por su parte, SMC1 β se detecta en leptotene y zigotene y en los cromosomas sinapsados y desinapsados desde zigotene a diacinesis, aunque se pierde en los cromosomas desinapsados de diplotene tardío y se acumula en los centrómeros en diacinesis (Revenkova et al., 2001).

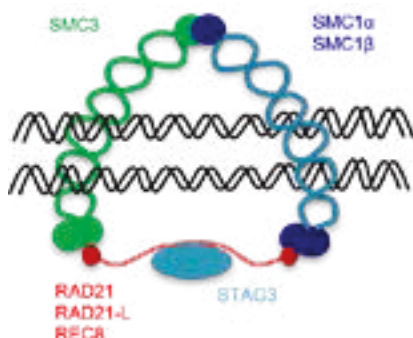


Figura V. Representación de los componentes del complejo de cohesina durante la meiosis. Dos proteínas de la familia SMC (SMC1 y SMC3) establecen la estructura básica en forma de anillo. El anillo se cierra gracias a la familia de proteínas kleisinas (RAD21, RAD21-L y REC8) y por último se unen proteínas accesorias como STAG3.

4

Cromosomas sexuales

En vertebrados la determinación del sexo viene dada por diferentes mecanismos ([Marshall Graves and Shetty, 2001](#)). En muchas especies de peces y reptiles el sexo viene determinado por la temperatura a la que se desarrollan los huevos, (**TSD**, *Temperature Sex Determination*). En otras especies de peces y reptiles, así como en la mayoría de anfibios, aves, serpientes y mamíferos el sexo está determinado genéticamente, (**GSD**, *Genetic Sex Determination*). Entre las especies que usan la determinación genética del sexo, algunas presentan machos heterogaméticos, es decir, el macho es heterocigoto para un locus determinante del sexo y produce dos tipos de gametos, mientras que en otras el sexo heterogamético son las hembras. Finalmente, en muchos casos esta diferencia alélica va acompañada de una diferenciación morfológica y genética de los cromosomas sexuales, generando un sistema de determinación cromosómico. Las especies con machos heterogaméticos tienen hembras XX y machos XY, mientras que las especies con hembras heterogaméticas tienen hembras ZW y machos ZZ.

4.1. Origen y evolución de los cromosomas sexuales en mamíferos. Estadios de diferenciación

Los cromosomas sexuales se originan en muchos grupos a partir de un par de cromosomas autosómicos tras la adquisición de una mutación en un locus concreto que se transforma en un gen de determinación del sexo en uno de los cromosomas homólogos ([Charlesworth and Charlesworth, 2005](#)). Tras esto, hay un período evolutivo donde las regiones adyacentes a este nuevo gen dejan de recombinar con el cromosoma homólogo (Figura VI). El mantenimiento de la inhibición de la recombinación es fomentado por inversiones, la acumulación de heterocromatina y mutaciones adicionales que promueven la pérdida de genes que carecen de ventajas o funciones específicas del sexo ([Hill and Robertson, 1966](#); [O'Brien et al., 1999](#)). La pérdida de la recombinación hace que el cromosoma característico del sexo heterogamético (Y en el caso de los mamíferos) quede aislado genéticamente e inicie un proceso de evolución independiente. En este proceso, el cromosoma aislado puede sufrir una serie de fenómenos de pérdida de genes o incluso de segmentos cromosómicos de gran tamaño. Esto da como resultado una pérdida de homología con el cromosoma X, y la formación de cromosomas sexuales morfológicamente diferenciados (Figura VI).

Debido a la pérdida de genes funcionales en el cromosoma proto-Y, el cromosoma proto-X debería evolucionar para compensar esta pérdida. Teorías tempranas proponían un modelo de compensación de dosis génica gen por gen, que es el patrón de la mayoría de aves. Aunque los sistemas de compensación de dosis génica parecen ser fundamentalmente diferentes

entre los taxones, muchas características comunes se comparten entre linajes divergentes y se asemejan a sistemas que controlan la expresión de genes autosómicos e incluso mecanismos reguladores que están presentes en taxones muy distantes de los vertebrados ([Chandler, 2017](#); [Disteche, 2016](#); [Livernois et al., 2012](#)). La metilación del DNA parece controlar la expresión genética en muchos vertebrados, invertebrados e incluso plantas. Las modificaciones de histonas que activan o silencian la transcripción son ubicuas. La supresión que se observa en la represión parcial de genes en el cromosoma X inactivo en aves, marsupiales y humanos, parece similar a la expresión monoalélica de genes autosómicos. Esto hace que sea probable que todos estos sistemas de compensación de dosis génica se hayan construido a partir de elementos de antiguos mecanismos de silenciamiento que son omnipresentes dentro y probablemente fuera de los vertebrados ([Abbott et al., 2017](#); [Graves, 2016](#)).

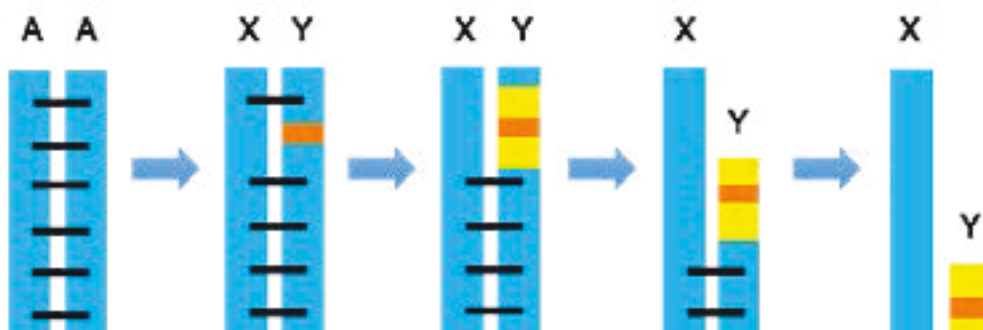


Figura VI. Representación de la evolución de cromosomas sexuales en mamíferos. A: autosomas; X: cromosoma sexual X; Y: cromosoma sexual Y. A partir de una pareja de cromosomas homólogos, uno de los cromosomas adquirió una mutación en un alelo relacionado con la determinación del sexo (fragmento naranja), pasando a ser un cromosoma proto-Y y su homólogo, por tanto, el proto-X. Alrededor de este gen se generó una serie de eventos que tienen como consecuencia el cese de la recombinación y el comienzo de una evolución independiente del cromosoma Y. Esto lleva al inicio de una diferenciación genética (fragmento amarillo), y posteriormente la pérdida de genes y degradación del cromosoma Y. Finalmente el cromosoma Y puede llegar a perder completamente la homología con el X.

Existen tres grupos principales de mamíferos: **monotremas** (prototerios), **marsupiales** (metaterios) y **placentarios** (euterios). Los marsupiales y los placentarios forman la subclase terios, que divergió hace 190 millones de años del grupo de los monotremas ([Graves, 2016](#); [Veyrunes et al., 2008](#)). La mayoría de las especies de terios tienen un sistema cromosómico **XX** (hembras)/**XY** (machos). El cromosoma X es grande y contiene una gran cantidad de genes, alrededor de 1100, mientras que el cromosoma Y es pequeño y tiene un bajo contenido génico ([Waters et al., 2007](#)). El par cromosómico XY de los terios tiene un origen común, definido por un gen identificado como **SRY** (Figura VII). Este gen es el causante de activar una vía genética de diferenciación de las gónadas embrionarias en testículos y la supresión del desarrollo ovárico, y es por lo tanto un factor clave de determinación del sexo masculino ([Burgoyne et al., 1992](#); [Calvente et al., 2013](#)). Sin embargo, en los monotremas no se ha detectado ningún ortólogo de SRY. El gen SOX3 (a partir del cual se originó el gen SRY) es autosómico en monotremas, localizándose en el cromosoma 6 del ornitorrinco y en el cromosoma 16 en equidna ([Wallis et al., 2007](#)). Esto implica que el gen SRY evolucionó tras la divergencia de los terios y prototerios y que la determinación del sexo en los monotremas dependerá de otro gen ([Wallis et al., 2007](#)). Se han propuesto varios candidatos. El gen **DMRT1** que determina el sexo

masculino en las aves (ligado al cromosoma Z) es uno de ellos. Sin embargo, en el ornitorrinco este gen se encuentra en uno de los cromosomas X, por lo que es poco probable que promueva el desarrollo masculino, y no se ha encontrado ninguna variante de DMRT1 transmitida por el cromosoma Y. Otro candidato es un gen que codifica para la **hormona antimuleriana (AMH, AntiMullerian Hormone)** ya que se encuentra ligado al cromosoma Y de los monotremas (Figura VII). Gracias a un mapeo de genes se localizó AMH ubicado en el cromosoma Y₅. Estos resultados favorecen un escenario en el que la transformación del gen AMH en un determinante del sexo dio origen a los proto-cromosomas sexuales en monotremas ([Cortez et al., 2014](#); [Ellegren, 2011](#); [Hattori et al., 2012](#); [Tsend-Ayush et al., 2012](#); [Wallis et al., 2007](#))

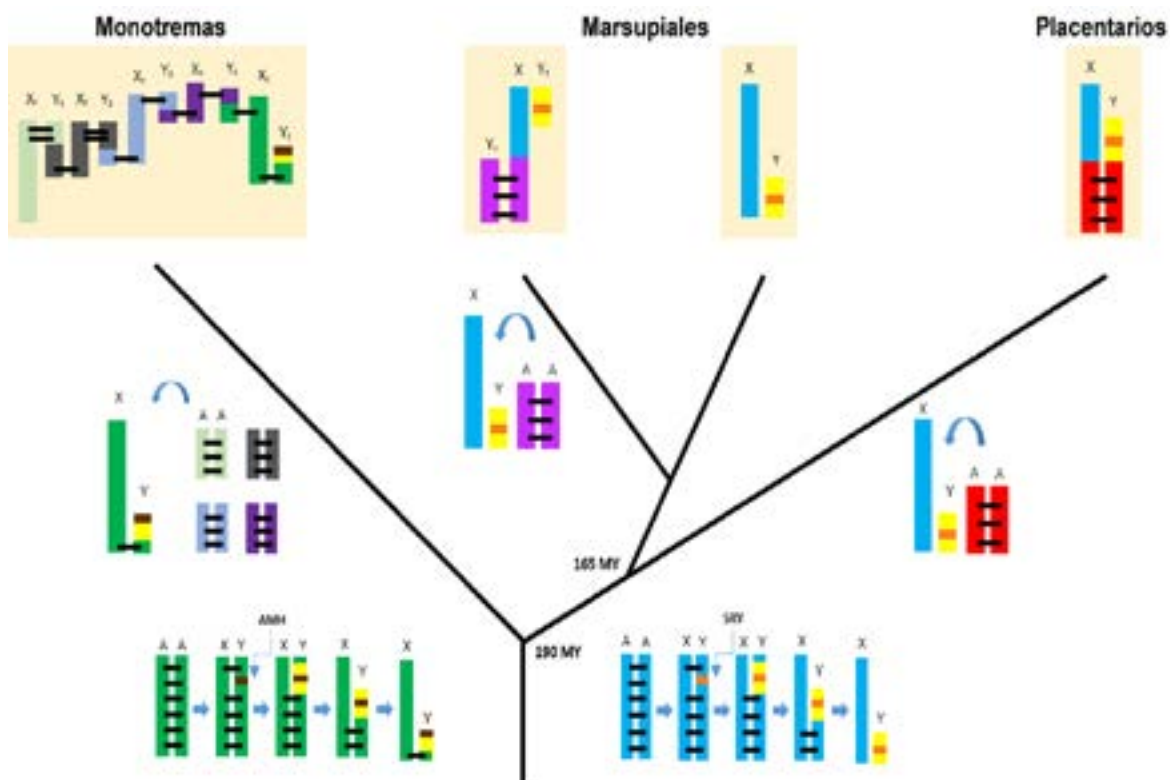


Figura VII. Esquema representativo de un árbol filogenético de los tres grupos principales de mamíferos y la evolución de sus cromosomas sexuales. La evolución de los cromosomas sexuales en color verde es representativa del grupo de monotremas, con el gen AMH actuando como determinante del sexo masculino. Posteriormente una serie de translocaciones recíprocas múltiples con diferentes autosomas forma una cadena compleja de cromosomas sexuales. Por otro lado, la evolución de los cromosomas sexuales en color azul representa el sistema de cromosomas sexuales de los marsupiales y los placentarios, con el gen SRY como determinante del sexo masculino. Los marsupiales en su mayoría tienen una configuración XY sin región PAR, aunque en algunas especies se han producido translocaciones entre autosomas y los cromosomas sexuales (X), dando lugar a sistemas múltiples XY₁Y₂. En último lugar, encontramos a los placentarios que en su mayoría mantienen un sistema XY con región PAR. Esta región es el resultado de una translocación autosómica a los dos cromosomas sexuales, regenerando así la región de homología.

El grupo de monotremas comprende dos familias. El **ornitorrinco** (*Ornithorhynchus anatinus*) es el único representante de la familia *Ornithorhynchidae*. Los **equidnas**, de la familia *Tachyglossidae*, se subdividen en dos géneros con cuatro especies en la actualidad: el equidna de hocico corto australiano (*Tachyglossus aculeatus*) y los equidnas de hocico largo o de Nueva Guinea, que comprenden las especies *Zaglossus attenboroughi*, *Zaglossus bartoni*, *Zaglossus bruijnii*. Este grupo de mamíferos presenta un sistema complejo

de cromosomas sexuales múltiples (Murtagh, 1977). El ornitorrinco presenta un total de **diez cromosomas sexuales**: las hembras tienen dos copias de cada uno de los cinco cromosomas X distintos (X_{1-5}), mientras que los machos tienen cinco X (X_{1-5}) y cinco Y (Y_{1-5}). Este sistema de cromosomas se originó por una serie de translocaciones recíprocas de varios autosomas con los cromosomas X e Y originales (Figura VIII) (Grützner et al., 2004; Rens et al., 2004; Veyrunes et al., 2008). El equidna de hocico corto presenta diez cromosomas X en las hembras (X_{1-5}), sin embargo los machos presentan cinco cromosomas X y cuatro cromosomas Y (X_{1-5}, Y_{1-4}) (Figura VIII) (Rens et al., 2007). Los resultados de hibridaciones de secuencias de DNA y mapeo de genes muestran que uno de los pares XY del equidna es un autosoma del ornitorrinco y también que uno de los pares XY del ornitorrinco muestra similitud con un autosoma del equidna. Esto implica que este sistema complejo se ha originado por translocaciones de diferentes parejas de autosomas a los cromosomas sexuales ancestrales de monotremas (Figura VII). Tres de estas translocaciones ocurrieron en común antes de que el ornitorrinco y el equidna divergieran hace aproximadamente 50 millones de años, mientras que hubo una última translocación adicional que ocurrió de forma independiente en cada linaje involucrando diferentes autosomas (Phillips et al., 2009; Rowe et al., 2008).

La complejidad de este sistema cromosómico hace que no se haya podido caracterizar con detalle la disposición de las regiones de homología que comparten los diferentes cromosomas. Además, las múltiples translocaciones suponen un reto para la transmisión de estos cromosomas durante la meiosis, donde los cinco cromosomas X deben segregarse hacia un polo y los cinco (o cuatro) cromosomas Y hacia el otro para asegurar una correcta distribución de los cromosomas en los gametos (Daish et al., 2009; Daish and Grützner, 2019). Lo que sí está definido mediante comparación de genes es que el cromosoma X_5 y el Y_5 son los más antiguos de la cadena cromosoma y por tanto esto sugiere que representan a los cromosomas sexuales originales (Cortez et al., 2014).

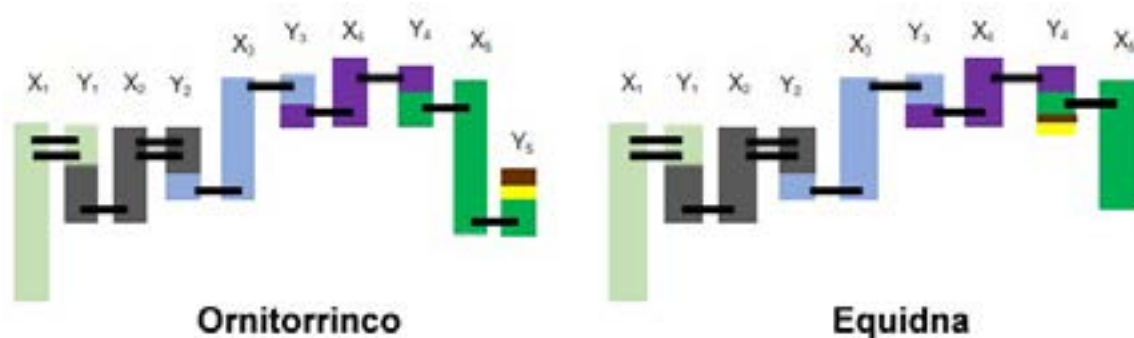


Figura VIII. Esquema representativo de la cadena de cromosomas sexuales en machos de ornitorrinco y el equidna. A la izquierda se muestran las 5 parejas XY del ornitorrinco y a la derecha las 4 parejas de XY y el X_5 del final de la cadena en el equidna. En verde se representan los dos cromosomas sexuales originales y en marrón el gen AMH que se ha propuesto como candidato a ser el gen crucial en la determinación del sexo en monotremas. Las barras negras indican las probables uniones entre cromosomas por sus regiones de homología.

Los mamíferos placentarios y marsupiales presentan un sistema de cromosomas sexuales mucho más sencillo, con un par de cromosomas XY en los machos. El origen de este sistema es monofilético para los terios, es decir, ha evolucionado a partir de un ancestro común. En este

sentido, se observó que los genes ligados al cromosoma X en marsupiales corresponden con los genes del brazo largo del cromosoma X en humanos y que los genes presentes en el brazo corto del mismo están localizados en los autosomas de marsupiales ([Graves and Watson, 1991](#)).

En la línea evolutiva de los marsupiales el cromosoma Y se ha diferenciado por completo del cromosoma X, de modo que no hay actualmente ninguna región de homología compartida entre ambos cromosomas. Esto contrasta con la situación encontrada en los placentarios, donde los cromosomas X e Y habrían pasado igualmente por un periodo de diferenciación completa, pero la translocación de un segmento autosómico a los dos cromosomas sexuales habría reestablecido la homología entre ambos de manera parcial, dando lugar a la aparición de una nueva región denominada pseudoautosómica (PAR) ([Burgoyne, 1982](#)). Esto indica que ambos cromosomas presentan una región conservada en el X e Y **XCR** e **YCR** (**X/Y Conserved Region**) y una región añadida **XAR** e **YAR** (**X/Y Added Region**).

Múltiples estudios indican que los marsupiales tienen una extraordinaria estabilidad cromosómica y que los cromosomas sexuales en la mayoría de las especies están completamente diferenciados y no presentan región PAR (Figura IX) ([Graves, 1996](#); [Hayman, 1990](#); [Sharman, 1973](#); [Sharp, 1982](#)). Sin embargo, algunos grupos de marsupiales australianos, particularmente en el grupo de los ualabíes, sí presentan una dinámica de cambios cromosómicos mucho más acentuada y muchas especies que presentan **reordenamientos cromosómicos Robertsonianos (Rb)**. Estos cambios pueden involucrar a los cromosomas X e Y, generando sistemas de cromosomas sexuales. Un ejemplo de esta situación la encontramos en el **ualabí de pantano** (*Wallabia bicolor*) que presenta un sistema **XY₁Y₂** en machos (Figura VIII). Esta configuración deriva de la fusión Rb de un autosoma con el cromosoma X, generando por tanto un sistema complejo en el que coexisten una región de homología entre el X fusionado y el autosoma libre (ahora Y₂) y una región diferencial sin homología entre el X y el cromosoma Y ancestral (ahora Y₁) ([Deakin, 2018](#); [Toder et al., 1997](#))

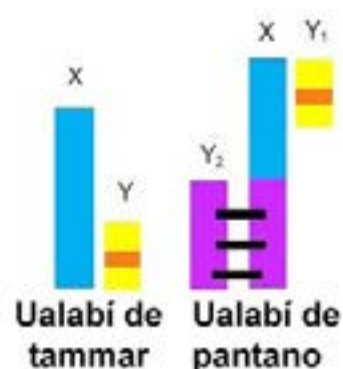


Figura IX. Esquema representativo del sistema cromosómico sexual de los marsupiales. A la izquierda se representa la configuración de los cromosomas sexuales en la mayoría de los marsupiales, como es el caso del ualabí de Tammar (*Macropus eugenii*), donde la diferenciación es total entre ambos cromosomas y no tienen región PAR. A la derecha se muestra el sistema XY₁Y₂ presente en el ualabí de pantano. El autosoma representado en morado se ha translocado solamente con el cromosoma X. El autosoma no translocado (Y₂) es homólogo del correspondiente fragmento del X (representado en morado). El fragmento original del cromosoma X y el cromosoma Y₁ no presentan homología.

4.2. Generalidades de los cromosomas sexuales en meiosis masculina

Las diferencias en tamaño y contenido génico de los cromosomas sexuales tienen consecuencias importantes en el comportamiento meiótico de estos cromosomas. Aun cuando la diversidad de cromosomas sexuales explicada anteriormente genera cierta variabilidad en este comportamiento entre unas especies a otras, existen en general modificaciones recurrentes en los procesos de apareamiento, sinapsis, recombinación y segregación.

En primer lugar, los cromosomas sexuales presentan una serie de modificaciones en la organización de las estructuras específicas de la meiosis como el ECo y el CS. Así, los cromosomas X e Y muestran habitualmente un engrosamiento de los EAs y debido a la diferencia de tamaño presentan extensas regiones que no completan la sinapsis. Algunas de las proteínas del complejo de cohesina también se acumulan en estos engrosamientos. En segundo lugar, la sinapsis habitualmente se produce de forma tardía en comparación con el resto de cromosomas y se inicia a final de zigotene o comienzo de paquitene. En tercer lugar, la sinapsis se produce principalmente entre las regiones homólogas del cromosoma X y el Y (PAR), pero frecuentemente se extiende hacia segmentos no homólogos. Esta sinapsis heteróloga es inestable y se disuelve con rapidez durante la etapa de paquitene, quedando de nuevo los cromosomas asociados únicamente por la región PAR ([Page et al., 2012](#); [Solari, 1974](#); [Solari, 1993](#)).

Por otro lado, la dinámica de recombinación también se encuentra retrasada en los cromosomas sexuales. En primer lugar, las DSBs ocurren de manera simultánea en los autosomas y el cromosoma X en la etapa de leptotene, mientras que en el cromosoma Y ocurren habitualmente al final de zigotene. Esto también afecta a la región PAR de X. En este caso, se ha propuesto que las DSBs en esta región se producirían por una variante de SPO11, denominada **SPO11 α** ([Bellani et al., 2010](#); [Kauppi et al., 2011](#)), que actuaría de manera específica sobre el segmento PAR en zigotene. En segundo lugar, la reparación del DNA en los cromosomas sexuales se completa en etapas más tardías que para el resto de los cromosomas. Esto puede ser debido al hecho de que al no tener un cromosoma homólogo con quien reparar (excepto la región PAR), los cromosomas sexuales tienen que reparar con la cromátida hermana, hecho que podría justificar el retraso de este proceso ([Ishiguro et al., 2011](#); [Keeney and Neale, 2006](#)).

Como se ha mencionado anteriormente la presencia de regiones cromosómicas que no completan la sinapsis durante la meiosis lleva aparejado un fenómeno de inactivación transcripcional (MSUC). En los cromosomas sexuales este fenómeno es particularmente llamativo, ya que los cromosomas X e Y permanecen asinápticos en la mayor parte de su longitud. El fenómeno de inactivación asociado a esta característica se denomina **MSCI** (*Meiotic Sex Chromosome Inactivation*) y representa un caso especial del fenómeno de MSUC ([Baarends et al., 2005](#); [Mahadevaiah et al., 2008](#); [Schimenti, 2005](#); [Turner et al., 2004](#)). La inactivación de los cromosomas hace que estos formen una masa de cromatina muy condensada que se denomina cuerpo sexual ([Solari, 1974](#)). La formación del cuerpo sexual está ligada a la

remodelación de la cromatina. La **fosforilación de H2AX (γ H2AX)** es uno de los marcadores más típicos de la inactivación de los cromosomas sexuales ([Fernandez-Capetillo et al., 2003](#); [Turner, 2007](#)). H2AX es fosforilada en todo el núcleo por las quinasas ATM y ATR en las etapas tempranas de la meiosis como respuesta a la aparición de DSBs producidas de forma endógena por SPO11 ([Bellani et al., 2005](#); [Sosa et al., 2015](#)). Sin embargo, se ha propuesto que existiría una segunda ola de fosforilación de H2AX en respuesta a la presencia de regiones cromosómicas que no completan la sinapsis. En este caso la fosforilación estaría medida por BRCA1 y ATR, que permanecen asociados a los EAs de los cromosomas desapareados y desencadenarían la fosforilación de H2AX ([Boekhout et al., 2019](#); [Garcia-Cruz et al., 2009](#); [Mahadevaiah et al., 2001](#); [Page et al., 2012](#); [Turner et al., 2004](#)). La compactación de la cromatina producida sobre los cromosomas sexuales va ligada a cambios epigenéticos adicionales que incluyen la modificación de histonas, la incorporación de variantes histónicas específicas y RNAs no codificantes ([van der Heijden et al., 2007](#)). Este proceso no solo afecta a la expresión de los genes de estos cromosomas, sino que está relacionada con el control de la progresión de la meiosis. Alteraciones en el programa de silenciamiento de los cromosomas sexuales pueden permitir la expresión de genes de estos cromosomas, particularmente los genes ZFY1 y 2 presentes en el cromosoma Y, que son deletéreos para el desarrollo normal de la meiosis ([Mahadevaiah et al., 2008](#); [Royo et al., 2010](#)).

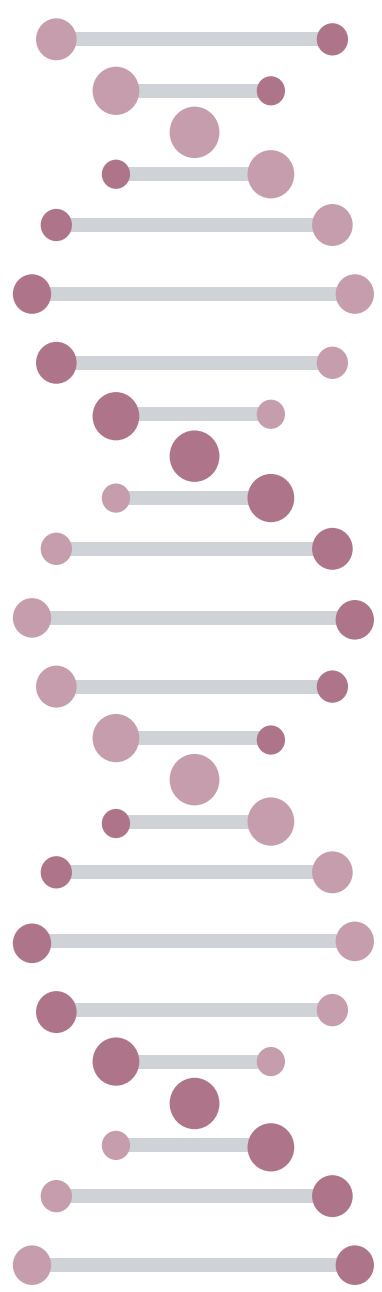
A pesar de estas modificaciones del desarrollo normal de la meiosis, en la mayoría de los mamíferos los cromosomas X e Y son capaces de sinapsar y recombinar adecuadamente en la pequeña región PAR. La formación de un quiasma en esta región asegura que los cromosomas puedan segregarse de manera correcta. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, no todas las especies de mamíferos presentan esta región PAR. En estos casos se han desarrollado mecanismos alternativos de segregación. Uno de estos mecanismos es la formación de una conexión entre ambos cromosomas sexuales mediante filamentos proteicos que incorporan componentes del CS, principalmente de la proteína SYCP3, como es el caso del jerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) y el topillo mediterráneo (*Microtus duodecimcostatus*) ([de la Fuente et al., 2007](#); [de la Fuente et al., 2012](#)). En otras especies, como ocurre en *Mus mattheyi*, *Mus minutoides*, *Mus dunni* o *Psammomys obesus*, se forman conexiones de cromatina/ γ H2AX que aseguran su correcta segregación ([Ashley and Moses, 1980](#); [Gil-Fernández et al., 2020](#); [Wolf, 1994](#)). Por último, es posible la formación de estructuras más complejas como la descrita en los marsupiales, que al igual que en el caso de los jerbos y topos, incorpora la proteína SYCP3 ([Page et al., 2003](#)).

4.3. Comportamiento meiótico de los cromosomas sexuales en monotremas y marsupiales.

La mayor parte de los estudios sobre el comportamiento meiótico de los cromosomas sexuales se ha realizado sobre especies de mamíferos placentarios, particularmente roedores y humanos.

Aun así, hay algunos trabajos centrados en el estudio de otros grupos de mamíferos. En el caso de los marsupiales, existen una gran cantidad de trabajos centrados el proceso de apareamiento en especies con cromosomas sexuales completamente diferenciados ([Graves, 1996](#); [Page et al., 2005](#); [Page et al., 2003](#); [Roche et al., 1986](#); [Seluja et al., 1987](#); [Sharp, 1982](#); [Solari, 1993](#); [Solari and Bianchi, 1975](#)). En estos casos se ha encontrado un retraso en el apareamiento y la ausencia del CS entre los cromosomas sexuales. Asimismo, se ha demostrado la ausencia de recombinación entre los cromosomas X e Y. En su lugar, se ha caracterizado la formación de una **placa densa (PD)**, que es responsable de mantener la asociación de los cromosomas sexuales ([Page et al., 2006b](#); [Roche et al., 1986](#); [Sharp, 1982](#); [Solari and Bianchi, 1975](#)). La PD está formada por proteínas del CS, principalmente por la proteína SYCP3 e implicada en mantener la asociación de los cromosomas sexuales desde su apareamiento en paquitene ([Page et al., 2003](#)) hasta su segregación en metafase-I ([Page et al., 2006b](#)). Finalmente, se ha encontrado que los cromosomas sexuales de marsupiales sufren un fenómeno de silenciamiento MSCI similar al descrito en mamíferos placentarios ([Franco et al., 2007](#); [Namekawa et al., 2007](#)).

Con respecto a los monotremas, son pocos los estudios sobre la organización y dinámica de los cromosomas durante la meiosis. En los últimos años, el grupo del Dr. Frank Grützner en Australia ha abordado este problema y ha demostrado una serie de particularidades de la meiosis en el ornitorrinco. Entre ellas destaca la formación de una cadena cromosómica que incluye a todos los cromosomas sexuales ([Grützner et al., 2004](#)). También se ha estudiado la dinámica de la proteína SMC3, que muestra un patrón de localización y acumulación específico sobre los cromosomas sexuales ([Casey et al., 2017](#)). Otro hallazgo importante es que las proteínas SYCP2 y SYCP1 están altamente conservadas en los monotremas ([Casey et al., 2015](#)). Por el contrario, la proteína SYCP3 presenta una mayor divergencia. De hecho se ha encontrado que el genoma de ornitorrinco tiene tres genes distintos para esta proteína: **SYCP3**, **SYCP3-like** y **SYCP3-Y**. ([Casey et al., 2015](#)). Esto podría ser clave en el ensamblaje del CS. Finalmente, se ha puesto de manifiesto que, a diferencia de los placentarios y los marsupiales, los cromosomas sexuales del ornitorrinco no presentan un fenómeno de silenciamiento durante la meiosis ([Daish et al., 2015](#)), por lo que se postula que el proceso de MSCI evolucionó después de la divergencia de los monotremas y los terios. No existen estudios sobre la meiosis de equidna.



OBJETIVOS

Planteamiento del problema

De acuerdo a los antecedentes presentados, en la mayoría de los mamíferos los cromosomas X e Y sinapsan y recombinan durante la meiosis masculina en una pequeña región de homología denominada región pseudoautosómica (PAR). La presencia de un quiasma en la PAR asegura que los cromosomas puedan segregarse de manera correcta. Sin embargo, existen especies en las que los cromosomas sexuales han alcanzado distintos estadios de diferenciación a lo largo de la evolución.

Los monotremas presentan un sistema complejo de cromosomas sexuales, lo que les confiere una serie de características interesantes y extraordinarias desde el punto de vista evolutivo, genético y citogenético. Estudios recientes ([Casey et al., 2017](#); [Daish et al., 2015](#)) han puesto de manifiesto algunos aspectos relevantes del comportamiento de estos cromosomas durante la meiosis de ornitorrinco, que contrastan con los patrones de comportamiento encontrados en el resto de los mamíferos. No obstante, hay muchos aspectos que no han sido analizados en esta especie, como el ensamblaje del CS o la dinámica de recombinación, y no hay estudios sobre la meiosis de equidna. Un estudio más detallado de la meiosis en estas especies podría aclarar el origen evolutivo de algunas de las peculiaridades meióticas de los monotremas, así como de otras características comunes con otros grupos de mamíferos.

En el caso de los marsupiales, la mayor parte de las especies presentan cromosomas X e Y que están completamente diferenciados y no poseen región PAR. El comportamiento meiótico de estos cromosomas está bastante bien caracterizado en diversas especies con esta configuración cromosómica ([Page et al., 2003](#); [Sharp, 1982](#); [Solarí and Bianchi, 1975](#)). No obstante, existen especies de marsupiales en las que los cromosomas sexuales sí presentan regiones de homología entre el cromosoma X e Y, como es el caso de algunas especies de ualabíes. En concreto, la especie *Wallabia bicolor* presenta un sistema de cromosomas sexuales XY_1Y_2 , que podría combinar un mecanismo convencional de asociación entre los cromosomas (presencia de un quiasma en la región de homología) y otro alternativo (presencia de la placa densa en la región no homóloga). El estudio de este caso ofrece una oportunidad única para comparar ambos mecanismos en un mismo organismo.

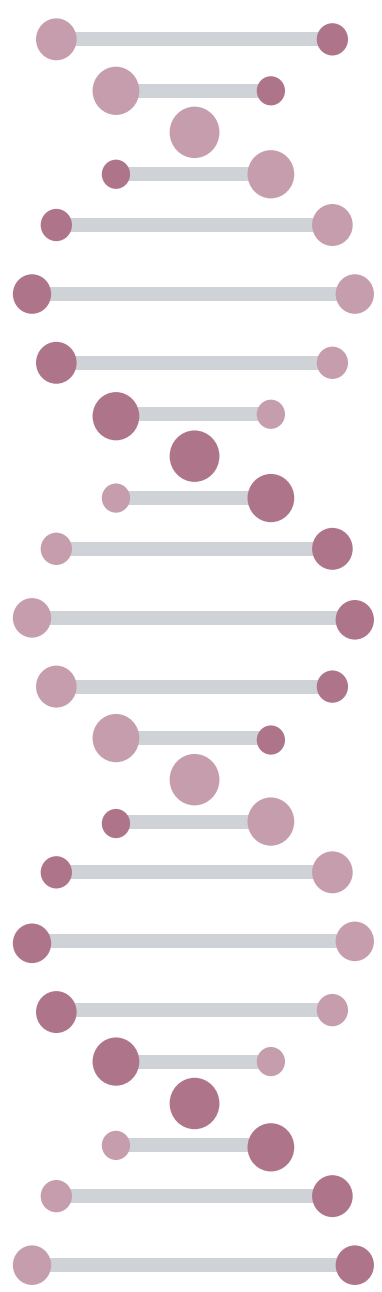
Objetivo general

El **objetivo principal** de la presente Tesis Doctoral es la realización de un estudio del comportamiento y organización de los cromosomas, y en especial de sus cromosomas sexuales, en el ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*), el equidna de hocico corto (*Tachyglossus aculeatus*), ambos con un sistema complejo de cromosomas sexuales, y el ualabí de pantano (*Wallabia bicolor*), que presenta una translocación reciente de un autosoma al cromosoma X.

Objetivos específicos

Para cada una de las especies analizadas se abordarán los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la progresión de los procesos de apareamiento y sinapsis durante las diferentes etapas de la profase-I y establecer las configuraciones que adoptan los cromosomas sexuales.
2. Analizar la distribución de las proteínas del CS (especialmente SYCP3) y del complejo de cohesina (SMC3, SMC1, STAG3, REC8) durante la primera división meiótica de estas especies.
3. Estudiar el proceso de reparación del DNA, mediante la localización de proteínas implicadas en la vía de recombinación homóloga: RPA, RAD51, DMC1 y MLH1.
4. Estudiar el fenómeno de MSCI mediante marcadores de la activación e inactivación transcripcional. Se localizarán la RNA polimerasa-II y diferentes modificaciones de histonas como γ H2AX, H3K9ac, H3K9me2 y H3K9me3.
5. Estudiar la disposición de los cromosomas sexuales en metafase-I y anafase-I en células que conserven su organización tridimensional a fin de establecer los mecanismos que aseguran su asociación y segregación en la primera división meiótica.



MATERIAL Y MÉTODOS

1

Material

Para la realización de esta Tesis Doctoral se han utilizado muestras de testículo de tres especies: *Ornithotinchus anaticus*, *Tachyglossus aculeatus* y *Wallabia bicolor*.

El material de ornitorrinco y equidna fue proporcionado por el laboratorio del Dr. Frank Grützner (Universidad de Adelaida, Australia), de acuerdo con las regulaciones del comité de ética y bioseguridad de la Universidad de Adelaida (*Institutional Biosafety Committee, Dealing ID 12713; 2011-2014 University of Adelaide Animal Ethics S-2011-146*). Los ejemplares de ornitorrinco y equidna se recolectaron entre 2002-2014 (*AEEC permit R.CG.07.03, Environment ACT permit LI 2002 270, NPWS permit A193*) y 2008 (*AEC permit N°. S-49-2006*) en el Upper Barnard River (*New South Wales, Australia*).

El material de ualabí de pantano fue proporcionado por el laboratorio de la Dra. Marilyn Renfree (Universidad de Melbourne, Australia), siguiendo la normativa del comité de ética de experimentación animal de la Universidad de Melbourne. Los animales fueron mantenidos en las colonias de la Universidad de Melbourne bajo los permisos de investigación de *Victorian Department of Environment, Land, Water and Planning Wildlife Act 1975*. Además, la Dra. Renfree nos proporcionó también material de ornitorrinco, recolectado en época de reproducción con los permisos de *New South Wales Parks and Wildlife*. Todas las técnicas de muestreo y selección se ajustaron a las directrices del *Australian National Health and Medical Research Council (2013)* y fueron aprobadas por los comités de experimentación y ética animal de la Universidad de Melbourne.

La relación de especies, su constitución cromosómica y el número de individuos estudiados se detallan a continuación:

Monotremas			
Especie	Individuos	Cariotipo	Origen
Ornitorrinco: <i>Ornithorhynchus anatinus</i>	5	$2n = 42 + X_{1-5} Y_{1-5}$	<i>Department of Molecular and Biomedical Science. School of Biological Sciences. The University of Adelaide, South Australia, Australia.</i> <i>Department of Zoology. School of BioSciences, The University of Melbourne, Victoria, Australia.</i>
Equidna de hocico corto: <i>Tachyglossus aculeatus</i>	4	$2n = 54 + X_{1-5} Y_{1-4}$	<i>Department of Molecular and Biomedical Science. School of Biological Sciences. The University of Adelaide, South Australia, Australia.</i>
Marsupiales			
Especie	Individuos	Cariotipo	Origen
Ualabí de pantano: <i>Wallabia bicolor</i>	5	$2n = 4 + XY_1Y_2$	<i>Department of Zoology. School of BioSciences, The University of Melbourne, Victoria, Australia</i>

Tabla I. Resumen de especies, número de individuos, cariotipo y origen del material utilizados en esta investigación.

El material se preservó de diferentes formas para optimizar su envío desde Australia a nuestro laboratorio:

- Parte del material se disgregó en PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1mM Na₂ HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Posteriormente con la ayuda de unas pinzas dentadas los túbulos seminíferos de rasgaron hasta obtener una suspensión celular. Las células en PBS se mezclaron con dimetilsulfoxido (DMSO) (PanReac AppliChem) a una dilución final de 10 % de DMSO. Posteriormente, la suspensión celular se congeló lentamente (- 1 °C/min) en el Mr.Frosty (Tarson Products) hasta alcanzar los -80 °C y se preservó a esa temperatura para su almacenaje.
- Otra parte del material se congeló directamente sin preparar una suspensión celular. En este caso se trocearon suavemente los túbulos seminíferos con una cuchilla y los túbulos resultantes se congelaron directamente en nitrógeno líquido. Finalmente, las muestras se conservaron a -80 °C.

Tanto en un caso como en el otro las muestras se enviaron por avión en un contenedor seco de nitrógeno líquido.

Algunas de las muestras de ualabí de pantano y ualabí de Tammar se pudieron procesar en fresco en el laboratorio de la Dra. Marilyn Renfree en Melbourne.

2

Metodología

2.1. Obtención de preparaciones de espermatoцитos

2.1.1. Esparcidos de espermatoцитos

Para la obtención de los esparcidos de **ornitorrinco** se partió de suspensión celular de espermatoцитos conservados en DMSO al 10 % a -80 °C. Se descongeló la suspensión celular y se diluyó 1/10 en sacarosa 50 mM. La mezcla se incubó en frío (4 °C) 10 minutos, resuspendiendo varias veces durante este tiempo. Después se dejó caer una gota de este material desde unos 15 cm de altura sobre el portaobjetos y se añadieron 4 gotas de Triton X-100 (Sigma) al 0.05 % con una pipeta Pasteur y se esperó 10 minutos para la correcta permeabilización de las células. Después se fijaron añadiendo varias gotas de una solución de formaldehído al 1 % en agua destilada. Se dejaron secar los portaobjetos en horizontal durante hora y media en una cámara húmeda a temperatura ambiente y seguidamente se lavaron con PhotoFlo (Kodak) al 0.04 % o con Triton X-100 (Sigma) al 0,04 % en agua destilada y se dejaron secar al aire. Una vez secas, las preparaciones se

utilizaron inmediatamente o bien se conservaron montadas con VectaShield (Vector Laboratories) y almacenadas en la nevera a 4 °C.

En el caso del **equidna** se trabajó siempre con material congelado directamente en nitrógeno líquido. En el caso del **ualabí de pantano** se trabajó con testículo congelado o bien con material fresco. En estos casos se disgregaron los túbulos seminíferos con la ayuda de pinzas curvas dentadas para obtener una suspensión celular homogénea. Se recogió en un tubo *ependorf* (1,5 ml) y se dejó decantar dichos túbulos, para obtener dos fracciones, en el *pellet* los túbulos seminíferos vacíos y en el sobrenadante las células de interés formando una suspensión celular. Esta suspensión celular se puede preservar congelada a -80 °C en DMSO al 10 % para ser utilizada en otra ocasión. Una vez obtenida la suspensión celular se añadieron 400 µl de sacarosa 100 mM por cada 100 µl de suspensión celular, se mezclaron y se dejó incubar diez minutos. Para realizar los esparcidos, los portaobjetos se introdujeron en la solución fijadora de formaldehído al 1 % en agua destilada (pH 9,5) con 0,15 % de Triton X-100 (Sigma), conteniendo un 3 % de tetraborato sódico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$). Una vez embebido se escurrió ligeramente el exceso de fijador del portaobjetos y se añadieron 15-20 µl de la suspensión celular en una esquina del mismo. Las células se extendieron por toda la superficie del portaobjetos con ligeros movimientos y cada portaobjetos se colocó en una cámara húmeda en posición horizontal. Se dejó secar durante dos horas y después se lavó con PhotoFlo 0,04 % (Kodak) o con Triton X-100 (Sigma) al 0,04 % como se ha indicado para el material de ornitorrinco. Igualmente, las muestras se utilizaron inmediatamente o se conservaron montadas en Vectashield a 4 °C.

2.1.2. Aplastados de espermatozoides

Esta técnica permite extender las células de los túbulos seminíferos en una monocapa manteniendo la organización tridimensional de las células. Se fijaron los túbulos seminíferos en una solución de formaldehído al 2 % en PBS con Tritón X-100 (Sigma) al 0,1 % durante 15 minutos. Mientras los portaobjetos previamente limpios con etanol absoluto/acetona (1/1) se impregnan con una gota de poli-L-lisina 1 mg/ml (Sigma) que ayuda a la adherencia de las células sobre el portaobjetos. Una vez fijados, los túbulos fueron colocados PBS para detener la fijación y no endurecer el material. A continuación, varios túbulos seminíferos se colocaron en un portaobjetos, se añadió una gota de fijador y se colocó un cubreobjetos sobre ellos. El material se dispersó presionando suavemente con un lapicero sobre el cubreobjetos. Posteriormente, con una almohadilla de papel de filtro se secó el exceso de fijador de alrededor del cubreobjetos y con el dedo pulgar se presionó sobre la muestra. Finalmente, las preparaciones se sumergieron en nitrógeno líquido. Si las preparaciones iban a ser utilizadas en ese momento se retiró inmediatamente el cubreobjetos con ayuda de una cuchilla y se rehidrataron en una jarra coplin con PBS, para continuar con el protocolo de inmunofluorescencia. Si las preparaciones iban a utilizarse más adelante, tras sumergirlas en nitrógeno líquido se guardaron a -80 °C. Para su uso es necesario volverlas a sumergir en nitrógeno líquido, para poder retirar el cubreobjetos y rehidratarlas en PBS.

2.2. Inmunolocalización de proteínas

Se realizó una inmunofluorescencia indirecta para la localización de proteínas en las preparaciones realizadas por medio de los protocolos de esparcido y de aplastado. Para ello fueron rehidratadas con PBS durante cinco minutos sumergidas en una jarra coplin. Los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS a las concentraciones apropiadas, descritas en la Tabla II. Para cada preparado se puso un volumen de 50 o 25 μ l de la dilución de anticuerpos, dependiendo de si es una preparación de esparcido o de aplastado, respectivamente, y se incubaron en una cámara húmeda toda la noche a temperatura ambiente.

Anticuerpos primarios				
	Proteína	Tipo y hospedador	Proveedor	Dilución
Complejo de cohesinas	SMC3	Policlonal de conejo	Cedido por el Dr. José Luis Barbero	1:25
	SMC1 α	Policlonal de conejo	Cedido por el Dr. José Luis Barbero	1:25
	SMC1 β	Policlonal de conejo	Cedido por el Dr. José Luis Barbero	1:25
	STAG3	Policlonal de conejo	Cedido por el Dr. José Luis Barbero	1:25
	REC8	Policlonal de conejo	Cedido por el Dr. José Luis Barbero	1:25
Complejo sinaptonémico	SYCP3 platypus	Policlonal de conejo	Nueva obtención en el CIB-CSIC	1:40
	SYCP3-like	Policlonal de conejo	Nueva obtención en el CIB-CSIC	1:40
	SYCP3-Y	Policlonal de conejo	Nueva obtención en el CIB-CSIC	1:40
	SYCP1	Policlonal de conejo	Nueva obtención en el CIB-CSIC	1:100
	SYCP3	Policlonal de conejo	Abcam 15093	1:100
	SYCP3	Policlonal de conejo	Knuff cedida por Christa Heyting	1:500
Centrómero	Proteínas centroméricas	Policlonal de humano	Antibodies Incorporated,15-235	1:50
Recombinación	RAD51	Policlonal de conejo	Santa Cruz 8349	1:50
	RPA32/RPA2	Policlonal de conejo	Abcam 10359	1:50
	RPA70/RPA1	Policlonal de conejo	Abcam 87272	1:50
	DMC1	Monoclonal de ratón	Novus 2H12/4	1:50
	MLH1	Monoclonal ratón	Pharmingen 550838	1:50
Modificaciones epigenéticas	RNA polimerasa-II	Monoclonal de ratón	Abcam 24758-1000	1:100
	γ H2AX	Monoclonal de ratón	Upstate 05-636	1:1000
	γ H2AX	Policlonal de conejo	Abcam 2893	1:500
	H3K9ac	Monoclonal de ratón	Sigma H0913	1:100
	H3K9me2	Monoclonal de ratón	Abcam 1220	1:100
	H3K9me3	Policlonal de conejo	Abcam 8898	1:100
Check point	Hormad1	Policlonal de cobaya	Cecido por el Dr. Attila Toth	1:50

Tabla II. Listado de los anticuerpos primarios usados en las diferentes técnicas utilizadas.

Al día siguiente, se retiró el cubreobjetos sumergiendo las preparaciones en PBS y se lavaron las preparaciones tres veces con PBS, durante cinco minutos cada lavado. A continuación, se incubaron las muestras con las combinaciones adecuadas de anticuerpos secundarios descritos en la Tabla III, durante una hora en la cámara húmeda. Finalmente se tiñeron las preparaciones con 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (2 µg/ml) y se montaron con VectaShield (Vector Laboratories). Se selló el cubreobjetos sobre el portaobjetos con esmalte de uñas y conservaron en oscuridad a 4 °C.

Anticuerpos secundarios				
	Tipo de anticuerpo	Fluorocromo	Proveedor	Dilución
Conejo	Burro anti-IgG	FITC (488)	Jackson ImmunoResearch	1:100
	Burro anti-IgG	Cy3 (549)	Jackson ImmunoResearch	1:100
	Burro anti-IgM	Dylight (549)	Jackson ImmunoResearch	1:100
	Burro anti-IgG	Alexa Fluor (350)	Invitrogen	1:100
	Burro anti-IgG	Dylight (649)	Jackson ImmunoResearch	1:50
Ratón	Burro anti-IgG	FITC (488)	Jackson ImmunoResearch	1:100
	Burro anti-IgG	Cy3 (549)	Jackson ImmunoResearch	1:100
Humano	Burro anti-IgG	Cy3 (549)	Jackson ImmunoResearch	1:100
	Burro anti-IgM	Dylight (549)	Jackson ImmunoResearch	1:100
	Burro anti-IgG	Cy3 (549)	Jackson ImmunoResearch	1:100

Tabla III. Listado de los anticuerpos secundarios usados en las diferentes técnicas utilizadas.

Para la detección de dos anticuerpos primarios generados en la misma especie se prosiguió del siguiente modo: se incubó con el primer anticuerpo primario toda la noche a temperatura ambiente y se detectó con un anticuerpo secundario Fab durante cuatro horas a temperatura ambiente. Posteriormente, tras los lavados correspondientes, se incubó el segundo anticuerpo primario otra vez toda la noche a temperatura ambiente y al día siguiente se detectó con el segundo anticuerpo secundario, en este caso una IgG completa, una hora a temperatura ambiente. En ocasiones se necesitó poner un tercer anticuerpo primario, con su correspondiente anticuerpo secundario (triples-inmunolocalizaciones). El montaje y conservación es el mismo que el caso anterior. Esta técnica fue la más utilizada, ya que la mayoría de anticuerpos utilizados eran policlonales de conejo.

2.3. Generación de anticuerpos específicos

Ante la inexistencia de anticuerpos que fueran capaces de reconocer los ELs del CS de ornitorrinco se generaron nuevos anticuerpos para las tres isoformas de SYCP3 de esta especie, en colaboración con el Dr. José Luis Barbero (CIB-CSIC).

2.3.1. Obtención de antígenos de la proteína SYCP3 para la producción de anticuerpos

Obtención de la secuencia codificante de los fragmentos de la proteína SYCP3 ornitorrinco por PCR.

El cDNA que fue enviado desde la Universidad de Adelaida, Australia. Se buscó la secuencia de cDNA codificante para la proteína SYCP3 de ornitorrinco en la base de datos de nucleótidos y se diseñaron dos oligonucleótidos sintéticos para cada secuencia, uno de la región 5' incorporando la señal de inicio de traducción ATG y la secuencia correspondiente a un enzima de restricción (CATATG: NdeI), y el segundo para la región 3' al que se le añadió la señal de terminación TAA y la secuencia de una segunda enzima de restricción (GTCGAC: Sall). La secuencia de los cebadores utilizados es:

- SYCP3 P1: 5'-GGC ATA TGA AAA GAT TGG AAC AAT ATA TTA AAT C-3' (*sense*)
- SYCP3 P2: 5'-GCG TCG ACT CAA AAT AAC ATG GAC TGA AGA AAC-3' (*anti-sense*)
- SYCP3 PL1: 5'-CG CAT ATG AAA AAA GTC GAA CTA TAT GTT AAA G-3' (*sense*)
- SYCP3 PL2: 5'-GC GTC GAC TCA AAA TAC CAT GGA CTT AAG CAA C-3' (*anti-sense*)
- SYCP3 Y1: 5'-GC CAT ATG AAG AGA AAA AGA CTG GAA GTG GA C-3' (*sense*)
- SYCP3 Y2: 5'-GC GTC GAC TTA CTC TCT ACT GTC CAA TCT ATT C-3' (*anti-sense*)

El programa de amplificación del DNA empleado fue:

- Un ciclo de 4 minutos a 95 °C,
- 36 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y un minuto a 72 °C.
- Un ciclo de 5 minutos a 72 °C.

Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR.

Las concentraciones de los componentes de la reacción de PCR utilizadas en las amplificaciones realizadas a lo largo de este trabajo, fueron estándar: 0.2 mM dNTPs (4 tipos de desoxirribonucleótidos trifosfatos), 1.5 mM MgCl₂, 0.3 μM de cada uno de los cebadores y 5U de DNA polimerasa AmpliTaq (Applied Biosystems), en un volumen final de 100 μl. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador modelo *GeneAmp PCR System 2700 Applied Biosystems*. Los programas de PCR y las parejas de cebadores usados para todas las amplificaciones se especifican en el apartado correspondiente.

Electroforesis en geles de agarosa.

Todo el DNA, los productos de PCR y los fragmentos de restricción se corrieron en geles de agarosa cuya concentración crece del 0,8 % al 2 % en tampón TAE 1x. La electroforesis se llevó a cabo siguiendo

el protocolo descrito ([Sambrook et al., 1989](#)). Los geles de agarosa se visualizaron en “GelDoc2000” mediante el programa “Quantity One” (Bio-Rad) después de teñir con bromuro de etidio.

Clonaje de productos de PCR.

Los productos de PCR se clonaron en el vector pET12a (Promega). Para ello se cortaron con las enzimas de restricción NdeI y Sal-I (NZYtech) y se purificaron los fragmentos correspondientes mediante el kit “GeneClean®Turbo” (MP Biomedicals, LLC). Posteriormente se ligaron según indica el protocolo de “T4 DNA Ligase” (Roche). En primer lugar la mezcla de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes de *E.coli* DH5 α . Se escogieron al azar colonias resistentes a ampicilina y se realizaron minipreparaciones de colonias para seleccionar cuales de ellas contenían el plásmido con el inserto adecuado. Los plásmidos seleccionados por tamaño de inserto y secuencia, se purificaron y se utilizaron para transformar bacterias competentes de *E.coli* BL21DE3 y se crecieron en placas de LB con ampicilina durante toda la noche a 37 °C.

Comprobación de colonias por minipreparaciones de colonias y digestión con endonucleasas de restricción.

Las colonias se analizaron mediante minipreparaciones de colonias (Solución de lisis: Tris/HCl pH 8 10 mM, NaOH 0.1 M, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) pH 8, 10 mM, SDS 1% y CIH 1 M) para ver si tenían el inserto, analizando el tamaño en geles de agarosa al 0,8 %. Posteriormente, de las colonias que presentaban el inserto se realizaron minipreparaciones de cultivo, obteniéndose así pequeñas cantidades de DNA plasmídico, siguiendo las instrucciones del kit “High Pure Plasmid Isolation” (Roche), que después se analizaron de nuevo mediante digestión con endonucleasas de restricción, siguiendo las instrucciones del fabricante (NZYtech). Los fragmentos de restricción se corrieron nuevamente, en geles de agarosa al 1,2 %.

Secuenciación del DNA.

Todas las reacciones de secuenciación se han realizado en el servicio de secuenciación automática de DNA del Centro de Investigaciones Biológicas.

2.3.2. Expresión de proteínas

Expresión de los fragmentos de la proteína.

Para expresar los fragmentos de la proteína en bacterias *E.coli*, se inocularon 500 ml de medio LB con 150 μ g/ml de ampicilina con las colonias seleccionadas anteriormente que contenían la construcción de interés, y se dejaron crecer a 37 °C en agitación. Cuando la densidad óptica del cultivo medida a 600 nm era aproximadamente 0,7, lo cual sucedía en unas tres horas en nuestras condiciones de cultivo, se indujo con IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) a concentración final de 1 mM durante tres horas a 37 °C. Una vez pasado este tiempo, el cultivo se centrifugó 10

minutos a 6000 rpm y 4 °C. El pellet resultante se resuspendió en 1 ml de agua con inhibidores de proteasas (Complete Mini EDTA-free, Roche) por cada 10 ml de cultivo inicial. Finalmente, las bacterias se lisaron por sonicación y se centrifugaron 8 minutos a 14000 rpm y 4 °C. Las fracciones no soluble y la soluble se procesaron de formas distintas.

Purificación de la proteína.

Las fracciones no solubles se cargaron en el gel, después de añadir un volumen de buffer de carga de Laemmli 4x, en geles preparativos de SDS-poliacrilamida al 15 % y se corrieron con buffer de transferencia que contenía Azul de Coomasie (0.4-0.8 %). Del gel, se recortó la banda correspondiente a nuestro fragmento de proteína guiándonos por los marcadores (Precisión Plus Protein Standards Dual Color, Bio-Rad) y se trituró en PBS 1x, EDTA 5 mM y PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 Mm.

Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 2000 rpm y 4 °C. Las fracciones solubles procedentes de la extracción se congelaron a -80 °C y se liofilizaron durante 24-48 horas. Por último, se resuspendió en el mínimo volumen posible de PBS y se dializó frente a agua destilada.

2.3.3. Secuenciación de proteínas

Los fragmentos recombinantes purificados se llevaron al servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) para obtener y confirmar la secuencia N-terminal de cada uno de ellos.

2.3.4. Generación de anticuerpos policlonales

Inmunización de conejos.

Para la generación de anticuerpos frente a la proteína SYCP3 se inmunizó un conejo mediante tres inyecciones sucesivas (semana 0, semana 3 y semana 6) con el antígeno aislado y purificado, realizado por el personal adecuado en el animalario del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)

Obtención de sueros.

Pasadas nueve semanas de incubación del antígeno en la sangre del conejo, se sacrificó al animal y la muestra de sangre se centrifugó 15 minutos a 3500 rpm y 4 °C recogiendo los sobrenadantes. Los sueros se inactivaron durante 30 minutos a 56°C y posteriormente se le añadió Ázida Sodica (5 Mm) y PMSF (0,2 Mm). Se filtraron por filtros de 45 micras y por último se alicuotearon, pudiéndose usar en el momento o guardar a -20 °C.

2.4. Hibridación *in situ* (FISH) de secuencias teloméricas

Para la detección de ADN telomérico en esparcidos de espermatozoides se realizó una hibridación *in situ* fluorescente (FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*) usando una sonda telomérica peptidonucleica (PNA, Peptide Nucleic Acid), la cual consta de tres repeticiones de la secuencia CCCTAA y está unida a un isotiocianato de fluorescencia (FITC, *Fluorescein IsoThioCynate*, *Applied Biosystems*).

La hibridación se realizó en preparaciones en las que previamente se habían inmunolocalizado proteínas cromosómicas (ver apartado 2.2). Terminada la inmunodetección, se lavaron las preparaciones dos veces durante quince minutos en PBS a temperatura ambiente (todos los lavados, fijaciones y tratamientos de este protocolo se llevaron a cabo por inmersión, en oscuridad y agitación). A continuación, se fijaron las preparaciones en formaldehído 4 % en PBS durante diez minutos y se volvieron a lavar tres veces durante cinco minutos en PBS. Después, se deshidratan las muestras sumergiéndolas en una serie de alcoholes durante cinco minutos cada alcohol (70 °, 90 ° y 100 °). Tras el alcohol absoluto se dejó secar por completo, se añadieron 50 µl de la sonda y se colocó un cubreobjetos cubriendo toda la superficie donde se encuentran los espermatozoides:

- Tris 1M (pH 7,2)0,4 µl
- MgCl₂ Buffer.....4,2 µl
MgCl₂ 25 mM, ácido cítrico 9 mM, Na₂HPO₄ 82 mM; pH 7
- Formamida desionizada de Sigma.....32 µl
- Agua destilada.....7,4 µl
- Tel-probe PNA (5 µl/ml)5 µl

Se pusieron las preparaciones en una placa a 80 °C durante tres minutos para desnaturalizar el DNA por calor. A continuación, se colocaron en una cámara húmeda en oscuridad durante dos horas a temperatura ambiente. Tras la incubación con la sonda se lavaron dos veces durante quince minutos en formamida 70 % con BSA al 10 % (Albumina de suero Bovino). Posteriormente, se realizaron tres lavados durante cinco minutos cada uno con tampón TBS (Tris 1 M pH 7, NaCl 1,5 M en H₂O y 0,05 % de Tween-20) y por último se deshidrataron nuevamente con la serie de alcoholes ascendentes y se dejaron secar para montar con VectaShield (Vector Laboratories).

2.5. Western blot

Se utilizaron los testículos congelados de ornitorrinco para realizar la siguiente técnica. En primer lugar, se dejó atemperar la muestra y se realizó una extracción de proteínas siguiendo el protocolo del kit “*NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents*” (Thermo Scientific),

obteniendo de esta forma tres extractos de proteína (nuclear, citoplasmática y total). Se colocaron la cubeta de los geles en la fuente (PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad) y se insertó el gel (Mini-PROTEAN TGX Gels, Bio-Rad al 12 %) sobre el cual van a correr las muestras y un marcador para después poder comprobar el peso molecular de las proteínas de interés (Precision Plus Protein All Standards). Se cargaron las muestras y el marcador sobre el peine del gel en la cubeta con el buffer de electroforesis. La electroforesis se corrió en dos pasos: el primero a un voltaje de 80 voltios (hasta que el frente haya pasado el *stacking*) y después se aumentó el voltaje a 100-120 voltios.

A continuación, cuando las bandas habían corrido por todo el gel (y se habían separado las proteínas de las muestras), se procedió a la transferencia. Para ello previamente se empaparon bien las esponjas, papeles y el gel (una vez extraído de los cristales) en el *buffer* de transferencia, para inmediatamente después montar el set de transferencia poniendo las esponjas en los extremos, sobre ellas los papeles (Mini Trans-Blot Filter paper) y el gel. Sobre el gel se colocó la membrana de transferencia (Immun-Blot PVDF Membrane For Protein Blotting, 0,2 μm) con la precaución de que no queden burbujas. Se colocó en la cubeta con el buffer de transferencia una hora y media a 100 voltios. Tras este paso se bloqueó la membrana con TBS-T 1 % con BSA 5 % durante una hora a temperatura ambiente y después se lavaron tres veces durante diez minutos en PBS 1X/Tween20 1 %. Finalmente, se incubó la membrana con los anticuerpos primarios (SYCP3, SYCP3-like y SYCP3-Y) a una dilución 1/500 toda la noche en la cámara fría a 4 °C en agitación. Al día siguiente, tras tres lavados durante diez minutos en PBS 1X/Tween20 1 %, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario de burro que reconoce IgGs de conejo conjugado con peroxidasas (Jackson ImmunoResearch) a una dilución 1/5000 durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, se lavó el anticuerpo secundario con tres lavados durante diez minutos PBS 1X/Tween 20 1 % y se procedió al revelado con un sistema de detección de quimioluminiscencia (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante. El análisis de proteínas se realizó usando *ImagenLab Software* (Bio-Rad)

2.6. Captura y procesamiento de imágenes

Las preparaciones fueron observadas por un microscopio óptico Olympus BX61 equipado con una platina motorizada en el eje Z y la captura de imágenes se hizo con una cámara digital Olympus DP72 controlada mediante el programa Cell-F, usando el software AnalySIS de Olympus (Soft Imaging System, Olympus). Las preparaciones de aplastados de espermatozoides se fotografiaron como series de fotografías (*stacks*) abarcando todo el volumen celular, capturando una imagen cada 0.2 μm . En las preparaciones de esparcidos las células quedan proyectadas en un plano focal, por lo que solo se tomó una única imagen.

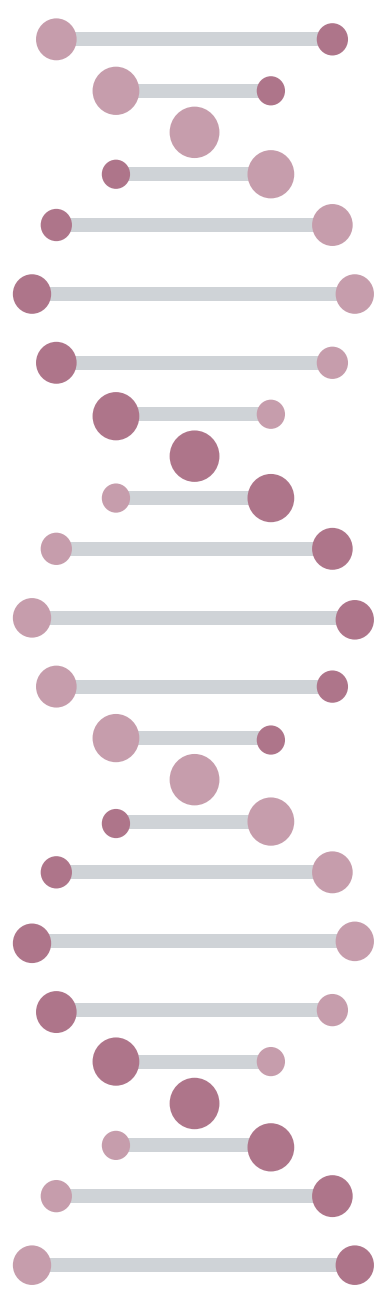
Para el estudio de algunas estructuras y se utilizó además un microscopio confocal Leica TCS SP8 equipado con un sistema STED (*Stimulated Emission Depletion*) 3X de superresolución, situado en el servicio de microscopía del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC).

El procesamiento de las fotos se hizo mediante los programas Adobe Photoshop 7.0 y Adobe Photoshop Cs6 (Adobe Inc., Estados Unidos) para ajustar los niveles de intensidad de la señal de los anticuerpos, eliminar el fondo e intercambiar los colores de las señales para la mejor visualización de cada elemento. Para el tratamiento de las imágenes tomadas como stacks se usó el programa ImageJ (National Institute of Health, USA: <https://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.7. Cuantificación de resultados y análisis estadístico

Se realizaron tres réplicas de los experimentos de cuantificación, utilizando tres individuos diferentes en el ornitorrinco y otros tres en el equidna. A su vez en cada una de las réplicas se realizaron los conteos en un mínimo de dos preparaciones de esparcido diferentes. Los resultados se expresan como la media del número de focos contados y su desviación estándar (tablas 1.1 y 2.1). En el análisis cuantitativo de la recombinación del ornitorrinco se contabilizó el número de focos de las proteínas RPA y RAD51 en un total de 75 células por cada proteína en diferentes etapas de la profase-I, mientras que para el análisis del equidna se contabilizaron un total de 50 células por cada proteína. El número de células contadas es relativamente pequeño dada la dificultad de encontrar células adecuadas para un correcto recuento, por ello se pensó en realizar un test no paramétrico de *Kruskal-Wallis* con un post-hoc para comparaciones múltiples mediante el test de *Dunn's*. Sin embargo, los datos pasaron el análisis de normalidad realizado por medio de los test de *D'Argostino & Pearson* y *Kolmogorov Smirnov*. Por ello, se asumió que estos datos corresponden a una distribución gaussiana y se empleó un test de ANOVA de una vía y un post-hoc de *Tukey* para comparaciones múltiples. Las diferencias en el número de focos entre ambas proteínas por etapa, a su vez fueron analizadas por medio de un test *t-Student*.

Para todos los test estadísticos las diferencias se consideraron significativas a unos valores $p \leq 0,05$, representándose mediante un asterisco (*): * $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$. Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron con el programa informático GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc.). Así mismo para el manejo de los datos y el cálculo de los mismos se ha utilizado Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Estados Unidos, 2013).



RESULTADOS





Ornitorrinco

Ornithorhynchus anatinus (Ornithorhynchidae)

Fotografía tomada en Healesville Sanctuary (Healesville, Victoria, Australia)

“La vida es una unión simbiótica y cooperativa que permite que triunfen a los que se asocian”.

Lynn Margulis (1938-2011)

1

Comportamiento meiótico de los cromosomas del ornitorrinco

Los machos de ornitorrinco muestran una dotación cromosómica $2n = 52$, con 21 bivalentes autosómicos y 10 cromosomas sexuales (5X y 5Y). En este apartado se detallará la dinámica de estos cromosomas sexuales que presentan un complejo sistema de organización en forma de cadena. En el segundo apartado se realizará una comparación con la segunda especie de estudio, el equidna de hocico corto, la cual presenta un número cromosómico $2n = 63$, con 27 bivalentes y 9 cromosomas sexuales

1.1. Progresión de la sinapsis durante la profase-I

En primer lugar, se ha estudiado la secuencia de apareamiento y sinapsis de los cromosomas del ornitorrinco durante la profase-I. Para ello se ha llevado a cabo la inmunolocalización de la cohesina SMC3. Se trata de una proteína altamente conservada en mamíferos (presenta un 99% de homología entre el ornitorrinco y humanos) que forma parte de los ECo que se ensamblan a lo largo de los cromosomas y subyacen a los EAs y ELs del CS durante la profase-I. Además, se ha realizado de manera conjunta la inmunolocalización de la proteína SYCP1, componente principal de los FTs del CS. De esta manera se ha podido observar no solo la formación del ECo, sino además determinar qué regiones han completado la sinapsis. La secuencia de localización de estas dos proteínas en la meiosis del ornitorrinco ha sido descrita previamente ([Casey et al., 2017](#)). No obstante, dado que este patrón es fundamental para poder entender los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, se hace una descripción detallada del mismo según los resultados obtenidos en nuestro laboratorio.

La proteína SMC3 se aprecia en las células en leptotene formando pequeños focos o filamentos cortos y finos distribuidos por todo el núcleo. Este fenómeno corresponde con el inicio de la formación de los ECo a lo largo de los cromosomas (Figura 1.1A). En esta etapa no se detecta señal de SYCP1, indicando que no hay indicio todavía del comienzo de la sinapsis (Figura 1.1A'). La etapa siguiente es zigotene (Figura 1.1B), donde la señal de SMC3 aparece en forma de filamentos delgados, más largos y continuos que en la etapa anterior. El núcleo presenta un aspecto enmarañado dado que los cromosomas aparecen muy elongados. Se pueden distinguir filamentos finos que no muestran marcaje con SYCP1, indicando que corresponden a regiones cromosómicas que no han iniciado la sinapsis. Por el contrario, en algunas partes del núcleo se observan otros filamentos más gruesos que sí incorporan el marcaje de SYCP1 y que corresponden con las regiones donde ha empezado la sinapsis (Figura 1.1B' y B''). La incorporación de SYCP1 ocurre de manera discontinua a lo largo de los cromosomas. Así, en etapas avanzadas de zigotene la señal de SYCP1 todavía se detecta fragmentada en muchos segmentos cromosómicos, lo cual indica que la sinapsis se inicia por varios puntos a lo largo de los cromosomas (Figura 1.1C' y 1.1C'').

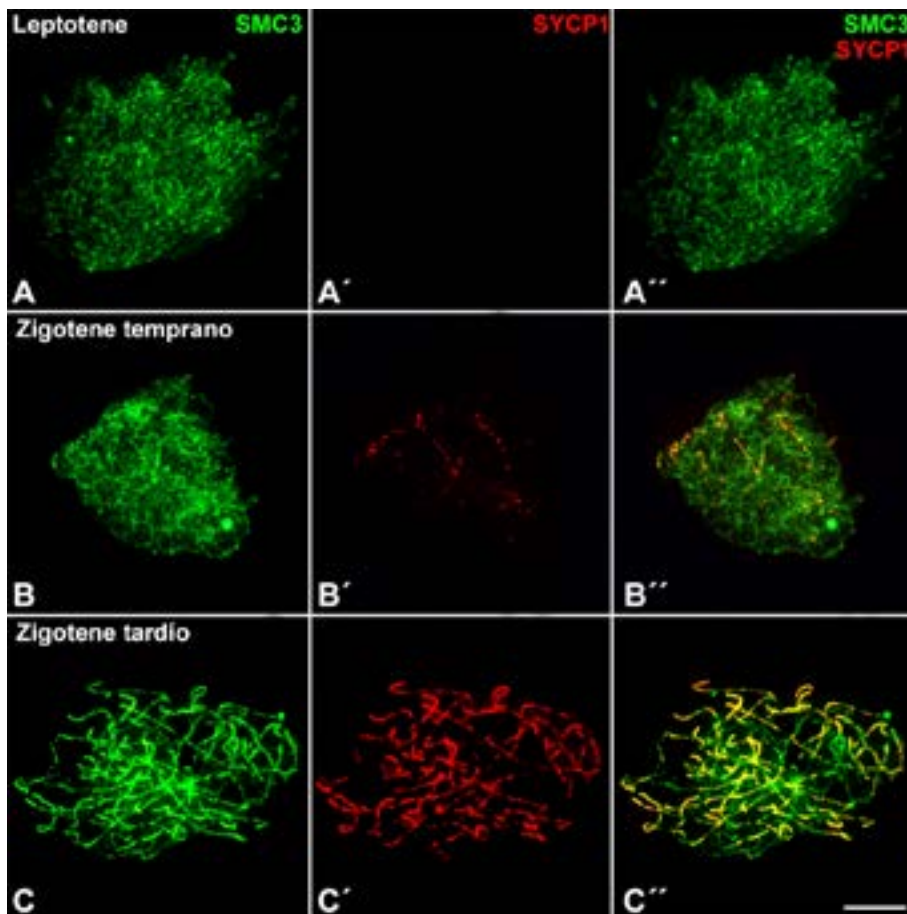


Figura 1.1. Secuencia sináptica de los cromosomas de ornitorrinco. Doble inmunolocalización de las proteínas SMC3 (verde) y SYCP1 (rojo) en esparcidos de espermatocitos primarios. **(A-A'')** Leptotene. **(A)** Los ECos se observan como filamentos finos en el núcleo. **(A')** No hay señal de SYCP1. **(B-B'')** Zigotene temprano. **(B)** Los ECos se muestran más continuos. **(B')** Comienza a verse la señal de SYCP1 entre cromosomas homólogos. **(B'')** Superposición de señales, donde se aprecia que las regiones sinapsadas quedan marcadas con ambas proteínas. **(C-C'')** Zigotene tardío. **(C)** Se observan los ECos más continuos que la etapa anterior. **(C')** Aumenta de la señal de SYCP1, que aparece en la mayoría de los cromosomas homólogos. **(C'')** La sinapsis ha progresado observándose en la mayoría de cromosomas la doble señal de las proteínas no obstante, quedan regiones donde no se ha completado el proceso, que quedan marcadas exclusivamente con SMC3. Barra de escala 10 μm .

El inicio de la etapa de paquitene queda definido por la extensión máxima de la sinapsis en los cromosomas. En esta etapa hay una colocalización casi total de las proteínas SMC3 y SYCP1. Se aprecian algunas discontinuidades de SYCP1 en la mayoría de los cromosomas, cuya posición aparentemente coincide con la posición de los centrómeros (ver figura 1.4). Sin embargo, algunas regiones cromosómicas no incorporan SYCP1, por lo que permanecen asinápticas. De acuerdo a estudios previos estas regiones corresponden a los cromosomas sexuales, que no tienen una sinapsis completa (Casey et al., 2017). Estas regiones asinápticas muestran diversas modificaciones estructurales, la más evidente es el engrosamiento de los ECos revelados con SMC3, que pueden llegar a ser muy extensos. Debido a que no se dispone de marcadores de temporalidad para determinar el avance de paquitene, y aun cuando en un trabajo anterior se han propuesto hasta ocho subetapas (Casey et al., 2017), en nuestro caso se propone la división de paquitene en cuatro subetapas, acorde a las modificaciones morfológicas observadas de los ECos de los cromosomas que no completan la sinapsis. Se ha considerado paquitene temprano aquella etapa en la que la mayoría de los autosomas

han completado la sinapsis, pero no se aprecian aún diferenciaciones de los ECos en los cromosomas sexuales (Figura 1.2A y A''). Cuando aparecen los primeros signos de engrosamiento de los ECos se considera una etapa de transición entre paquitene temprano y medio (Figura 1.2B y B'').

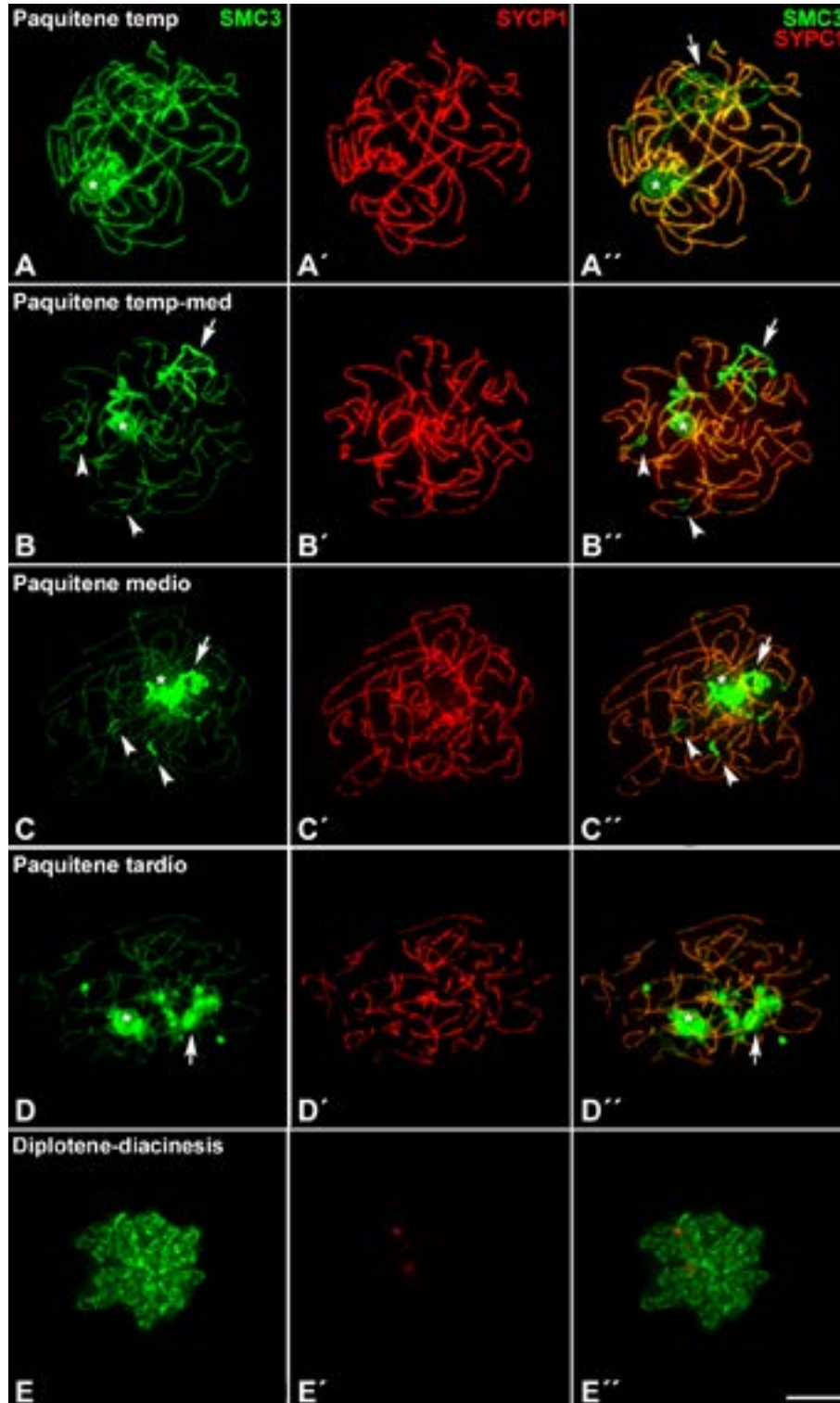


Figura 1.2. Secuencia sináptica de los cromosomas de ornitorrinco. Doble inmunolocalización de las proteínas SMC3 (verde) y SYCP1 (rojo) en esparcidos de espermatocitos primarios. **(A-A'')** Paquitene temprano. **(A)** Los ECos son continuos en todo el núcleo y son indistinguibles los cromosomas sexuales. **(A')** SYCP1 se muestra continua sobre la mayoría de los ejes de los cromosomas. **(A'')** Combinación de ambas señales. Ambas proteínas colocalizan, indicando

que los cromosomas han completado la sinapsis, a excepción una región que corresponde a la cadena de los cromosomas sexuales. **(B-B'')** Paquitene temprano-medio. **(B)** Los ECos de los cromosomas sexuales, así como los de algunas regiones autosómicas, muestran un cambio morfológico, acumulando SMC3. **(B')** SYCP1 se muestra continua en la mayoría de autosomas, a excepción de las regiones engrosadas con SMC3. **(B'')** Se puede ver como SYCP1 se encuentra entre los ejes de cohesinas y se ausenta de las regiones que acumulan SMC3. **(C-C'')** Paquitene medio. **(C)** Los cromosomas sexuales muestran una mayor acumulación concentrándose alrededor del nucleolo y se mantiene la acumulación de SMC3 en regiones autosómicas. **(C'-C'')** SYCP1 se encuentra entre los ejes de los cromosomas sinapsados excluyéndose, de la región de acumulación de SMC3, que corresponde a las regiones asinápticas. **(D-D'')** Paquitene tardío. **(D)** La acumulación de SMC3 se concentra en formas esféricas. **(D'-D'')** Nuevamente SYCP1 se ausenta de estas masas de acumulación de SMC3. Además, durante todo el paquitene se observa una nube esférica marcada con SMC3 que corresponde al nucleolo unido a una parte de la cadena cromosómica (flecha blanca). **(E-E'')** Diplotene-diacinesis. **(E)** SMC3 se observa como una señal punteada y discontinua **(E'-E'')** Ausencia de SYCP1 en esta etapa. La fecha indica los cromosomas sexuales, la punta de flecha las regiones asinápticas de los autosomas y (*) el nucleolo. Barra de escala 10 μm .

En ella, los engrosamientos son todavía pequeños y se puede apreciar la trayectoria de los ECos. En paquitene medio los engrosamientos de los EC se hacen mucho más grandes y abultados y con frecuencia ya no se pueden distinguir las trayectorias de cromosomas individuales, sino que la señal de SMC3 es tan intensa que engloba varios cromosomas (Figura 1.2C y C''). En paquitene tardío la señal de SMC3 se redistribuye formando estructuras redondeadas de pequeño tamaño distribuidas de manera irregular por el núcleo (Figura 1.2D y D'').

En diplotene y etapas posteriores los cromosomas aparecen más condensados. SMC3 se mantiene a lo largo de los cromosomas como una señal punteada y discontinua (Figura 1.2E). La señal de SYCP1 no es visible ya en estas etapas (Figura 1.2E'), que son muy poco abundantes, lo cual indica que el proceso de desensamblaje de la proteína SYCP1 podría ser muy rápido. Por ello, no fue posible caracterizar con detalle la desinapsis de los cromosomas homólogos.

1.1.1. Caracterización de la cadena de cromosomas sexuales

Durante paquitene los cromosomas sexuales forman una cadena cromosómica. Uno de los objetivos de este estudio es caracterizar el comportamiento de los cromosomas sexuales, principalmente la secuencia de sinapsis de sus regiones sinapsadas y asinapsadas. Para ello se hacía necesario extender los cromosomas lo máximo posible, para ello se han ensayado múltiples condiciones de esparcido de los espermatoцитos. Sin embargo, el resultado no ha sido suficiente para poder realizar una separación óptima de los cromosomas.

Al inicio de la formación de la cadena se ha observado que existen dos grupos de cromosomas sexuales sin conexión entre ellos. Uno de los extremos de la cadena está en contacto con una estructura redondeada que corresponde al nucleolo (Figura 1.2B). A medida que las modificaciones de los ECos se hacen más evidentes en paquitene medio, la cadena tiende a confluir para formar una estructura única y concentrarse alrededor del nucleolo ([Casey et al., 2017](#)). En esta etapa los cromosomas aparecen más agregados y se hace imposible distinguir unos de otros (Figura 1.2C). Finalmente, en paquitene tardío la señal de SMC3 se redistribuye en varias estructuras de morfología redondeada. Es posible que algunas de ellas correspondan a parte de la señal de SMC3 que se acumuló en los cromosomas sexuales, dado que algunas todavía permanecen asociadas al nucleolo. Sin embargo es difícil asegurar que todas estas estructuras correspondan exactamente con la localización de dichos cromosomas (Figura 1.2D).

Para localizar individualmente cada cromosoma y la cadena de cromosomas sexuales, se combinó la inmunodetección de SMC3 y un suero que reconoce proteínas centroméricas, o de SMC3 y SYCP1, con la localización de los telómeros por medio de hibridación *in situ* con sondas teloméricas. Fuimos capaces de identificar todos los autosomas y putativamente las regiones PAR de los cromosomas sexuales, que nacen de las regiones asinápticas con gran acumulación de SMC3 y terminan en un telómero marcado por la sonda (Figura 1.3A y B). En algunos casos se observa que las regiones centroméricas de los cromosomas sexuales están en la transición entre las regiones sinapsadas (PAR) y no sinapsadas. En otros, la señal centromérica aparentemente se sitúa en el interior de las acumulaciones de SMC3 y por lo tanto dentro de las zonas que permanecen en asinapsis. Sin embargo no se pudo realizar un análisis detallado de la ordenación de los cromosomas sexuales en la cadena cromosómica ni tampoco determinar si la longitud de las regiones sinapsadas es variable durante la profase-I.

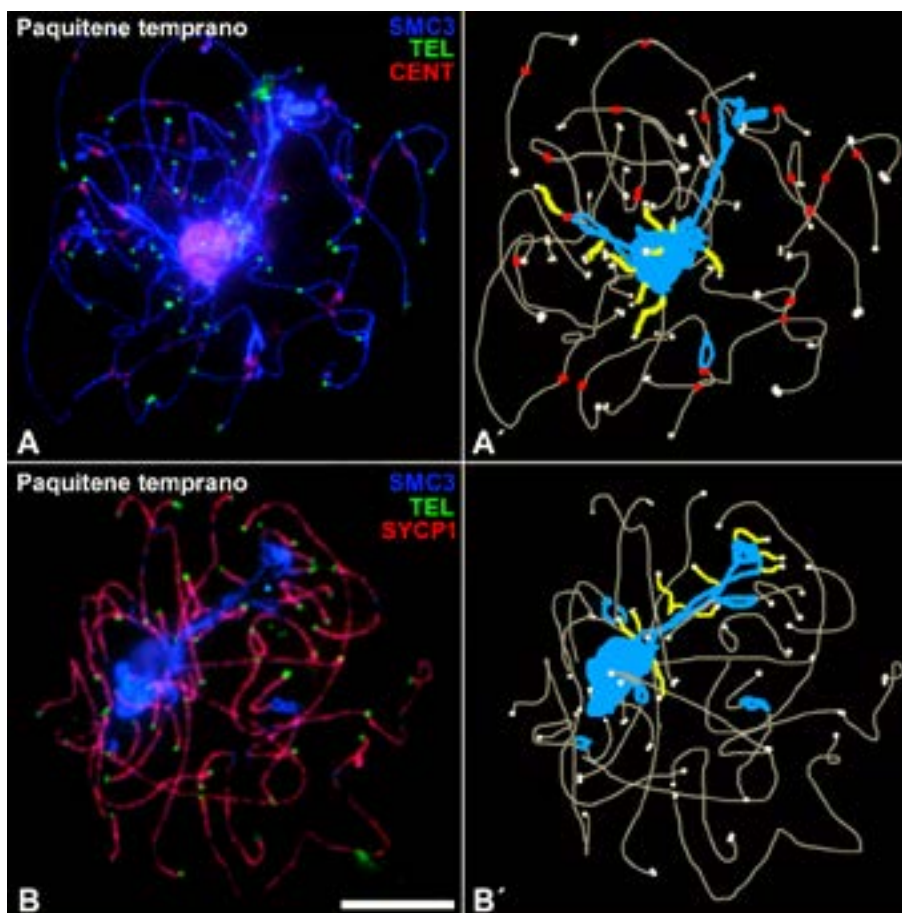


Figura 1.3. Configuración de la cadena de cromosomas sexuales de ornitorrinco en paquitene temprano. **(A)** Doble inmunolocalización de SMC3 (azul) y centrómero (rojo) e hibridación *in situ* de secuencias teloméricas (TEL, verde). **(B)** Doble inmunolocalización de SMC3 (azul) y SYCP1 (rojo), e hibridación *in situ* de secuencias teloméricas (DNA tel., verde). **(A')** Representación esquemática del espermatocito de la figura A, delineando de la trayectoria de los autosomas (gris) desde uno de sus telómeros (blanco) hasta el otro pasando por el centrómero (rojo). En azul queda identificada la acumulación de cohesinas en los cromosomas sexuales y en amarillo putativamente las regiones sinápticas de la cadena sexual. **(B')** Representación esquemática del espermatocito de la figura B, delineando en gris toda la longitud de los autosomas sinapsados (SYCP1) con inicio y fin en los telómeros (blanco), en azul la acumulación de cohesinas en los cromosomas sexuales y en amarillo las regiones sinápticas de la cadena sexual. En ninguno de los dos casos se puede identificar con claridad la trayectoria de la cadena cromosómica. Barra de escala 10 μm .

1.1.2. Presencia de regiones asinápticas en los autosomas

Estudios previos han descrito que los cromosomas sexuales eran los únicos que acumulaban SMC3 (Casey et al., 2017). Sin embargo, nuestros resultados muestran que algunas regiones autosómicas completan la sinapsis de forma tardía y también acumulan SMC3 en las regiones de asinapsis (Figura 1.2B' y C''). La morfología de estos engrosamientos de SMC3 es completamente comparable a la que muestran los cromosomas sexuales y aparecen en regiones intersticiales de los mismos. A fin de caracterizar mejor estas regiones se realizó una doble inmunolocalización de SMC3 y proteínas centroméricas. Se observó que en leptotene, cuando se están formando los ECos, los centrómeros aparecen distribuidos por todo el núcleo (Figura 1.4A). En zigotene las señales centroméricas de los dos cromosomas homólogos se disponen paralelamente en cada bivalente a medida que avanza la sinapsis (Figura 1.4B, B' y B'').

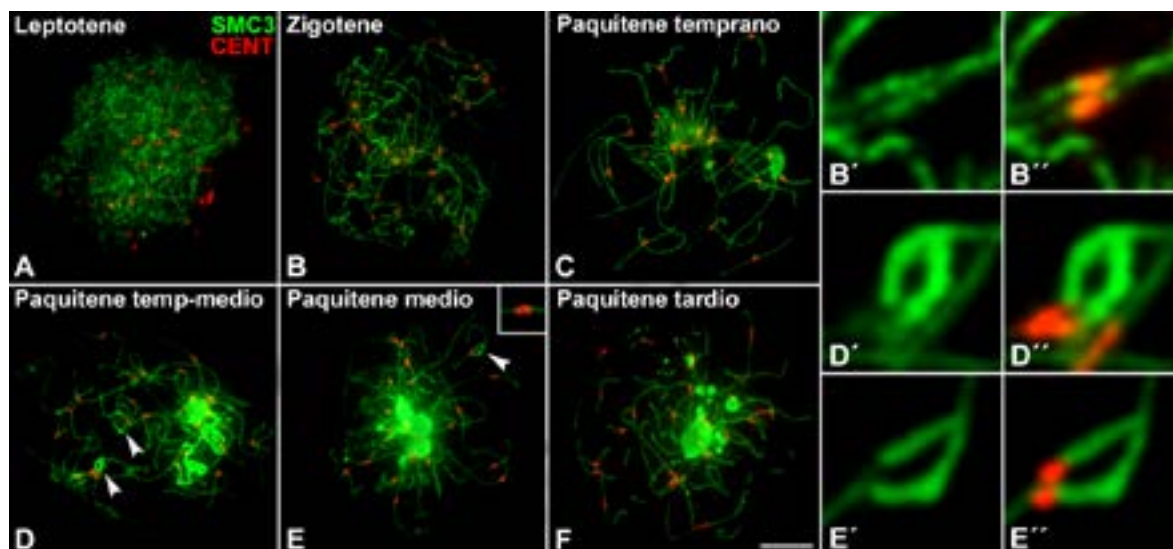


Figura 1.4. Persistencia de regiones asinápticas en los autosomas de ornitorrinco durante paquitene. Doble inmunolocalización de las proteínas SMC3 (verde) y centrómero (rojo) en espermátocitos. (A) Leptotene. Los centrómeros se distribuyen homogéneamente por todo el núcleo sobre los fragmentos de ECos. (B) Zigotene. Las señales centroméricas se muestran paralelas durante la sinapsis entre los cromosomas homólogos (B'-B''). (C) Paquitene temprano. Completada la sinapsis las señales centroméricas de los bivalentes aparecen más grandes. (D-E) Paquitene temprano-medio y paquitene medio. En algunos autosomas se observan regiones de asinapsis cercanas al centrómero, que muestran ECos engrosados (puntas de flecha). También se observa que en algunos bivalentes las señales centroméricas son dobles a lo largo de los ECos (detalle en E, D', D'', E' y E''). Detalles a mayor aumento de algunas de las regiones asinápticas autosómicas, donde se aprecian las señales centroméricas próximas y desplazadas entre sí. (F) Paquitene tardío. Todos los autosomas completan la sinapsis y se ven los centrómeros homólogos juntos. Barra de escala 10 µm.

En paquitene temprano (Figura 1.4C), la sinapsis se ha completado en la mayoría de autosomas y las señales de centrómero son más grandes, correspondiendo a los centrómeros de los dos cromosomas homólogos de cada bivalente. Algunas de estas señales centroméricas se ven alargadas o incluso en algunos casos se aprecian dos señales individuales una detrás de la otra a lo largo del ECo. También se aprecian varias señales individuales pero muy próximas en algunos bivalentes autosómicos que claramente no han completado la sinapsis en esta región. Desde paquitene temprano-medio en adelante (Figura 1.3D y E), una vez que aparecen las

acumulaciones de SMC3, estas regiones autosómicas que no han completado la sinapsis se detectan de manera más clara, adoptando estructura en forma de horquilla. Se comprobó que estas acumulaciones de SMC3 se localizan siempre en las regiones pericentroméricas, donde además los centrómeros homólogos quedan ligeramente desplazados entre ellos (Figura 1.4D', D'', E' y E''). En ocasiones se puede apreciar una morfología asimétrica de estas horquillas, en la que uno de los cromosomas presenta una longitud mayor y aparece ligeramente deformado (Figura 1.4E' y E''). Al final de paquitene, estas regiones acaban completando la sinapsis y se pueden visualizar a lo largo de todos los ejes cromosómicos dos focos juntos correspondiendo a los centrómeros homólogos apareados (Figura 1.4F). Se han contabilizado hasta un máximo de cuatro autosomas con esta característica en una misma célula, si bien lo más frecuente es visualizar dos a la vez (Figura 1.4D). Aun cuando no se ha realizado una identificación específica de los cromosomas que muestran este retraso de la sinapsis y la acumulación de SMC3, el tamaño de los cromosomas y la posición del centrómero nos permite sugerir que se trata de los mismos cromosomas en todas las células, lo cual podría indicar una constitución especial de estos cromosomas que los hace proclives a mostrar este retraso sináptico.

1.1.3. Caracterización de la organización de SMC3 en microscopía de alta resolución

Con el fin de obtener más detalles de la organización estructural de los ECos, así como de las regiones asinápticas y las acumulaciones de SMC3, se ha llevado a cabo un estudio con microscopía confocal STED de alta resolución (Figura 1.5). Hemos podido observar que los ECos son más delgados que lo observado en otras especies de mamíferos, como el ratón. También hemos observado que los ECos de los dos cromosomas homólogos muestran un enrollamiento helicoidal a lo largo de cada bivalente y están muy próximos entre sí (Detalle figura 1.5A'), de modo que no se detecta claramente un espacio central entre ambos, como sí es característico de los ELs del CS en otros mamíferos. Esto hace que la señal de proteína SYCP1 aparezca solapada con la de SMC3 cuando ambas proteínas se visualizan al mismo tiempo (Figura 1.5B').

Por otro lado, se ha podido caracterizar que las acumulaciones de SMC3 en las regiones asinápticas presentan una estructura granular y bastante homogénea (Figura 1.5A'). No se aprecia en el interior de las mismas la trayectoria del ECo, sino que la proteína SMC3 parece ocupar todo el espacio del engrosamiento de manera regular. Esto contrasta con las estructuras engrosadas del CS descritas previamente en otros mamíferos como los marsupiales ([Page et al., 2003](#); [Solari, 1974](#)), que habitualmente presentan una organización fibrilar.

Además, hemos visualizado en este detalle las regiones PAR de los cromosomas sexuales que nacen de las regiones asinápticas marcadas con una gran acumulación de SMC3 (Figura 1.5B').

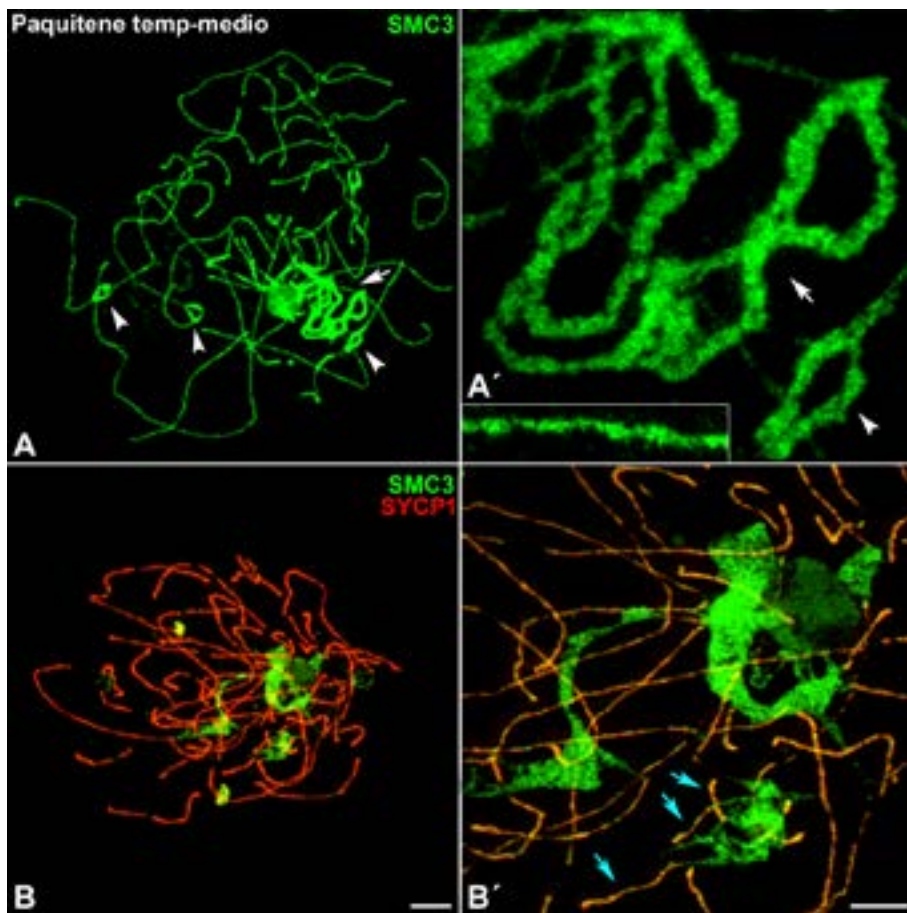


Figura 1.5. Acumulaciones de SMC3 visualizadas mediante microscopía de alta resolución. (A) Inmunolocalización de SMC3 en un espermatozoido de ornitorrinco en paquítene temprano-medio, visualizado con microscopía confocal. La sinapsis se ha completado en los autosomas, exceptuando las regiones próximas a los centrómeros de algunos de ellos (puntas de flechas), que muestran acumulaciones de SMC3. Los cromosomas sexuales también muestran la acumulación característica (flechas blancas). **(A')** Ampliación observada con microscopía confocal STED de parte de la cadena sexual (flecha blanca) y una región asináptica autosómica (punta de flecha), mostrando una estructura granular. En la parte inferior izquierda se muestra un detalle de la trayectoria de un bivalente en el que se aprecia que los ECos están enrollados helicoidalmente. **(B)** Inmunolocalización de SMC3 (verde) y SYCP1 (rojo) visualizada con microscopía confocal, donde SYCP1 se ausenta de las regiones que acumulan cohesina. **(B')** Ampliación observada con microscopía confocal STED, se muestra que los ECos están muy próximos entre sí y SYCP1 solapa con SMC3. Se aprecian las putativas regiones PAR de los cromosomas sexuales (flechas azules). Barra de escala A y B: 5 μ m. Barra de escala A' y B': 2,5 μ m.

1.2. Comparación del patrón de distribución de cohesinas durante la profase-I

Aun cuando la distribución de las diferentes proteínas que forman parte del complejo de cohesina debería ser similar, estudios previos han demostrado la formación de complejos con diferente composición, distribución, dinámica y funciones durante la meiosis ([Valdeolmillos et al., 2007](#)). Estas diferencias son especialmente interesantes en el caso de los cromosomas sexuales ([Page et al., 2006a](#)).

Por ello, se ha comparado la distribución de las diferentes subunidades del complejo de cohesinas en la meiosis de ornitorrinco. En primer lugar, se ha estudiado la localización de las dos isoformas de la proteína SMC1: SMC1 α y SMC1 β . En ratón, esta última es exclusivamente sintetizada durante la meiosis y presenta un patrón de temporal de localización distinto de SMC1 α ([Revenkova et al., 2001](#)). En ornitorrinco, ambas isoformas muestran un patrón similar entre sí y también similar al de SMC3. En leptotene forman filamentos muy cortos y delgados (Figura 6G) que se hacen más largos durante zigotene, a medida que los cromosomas inician la sinapsis (Figura 1.6H). En paquitene temprano ambas SMC1 se aprecian a lo largo de los cromosomas de manera continua y homogénea (Figura 1.6I). Dado que en esta etapa aún no hay modificaciones de los ECo, no se puede diferenciar los cromosomas sexuales. Estas acumulaciones se hacen patentes durante paquitene temprano-medio y paquitene medio sobre los cromosomas sexuales y en los segmentos autosómicos sin sinapsis (Figura 1.6J-K). En paquitene tardío se completa la sinapsis de estos segmentos autosómicos y se observa una acumulación de SMC1 α/β en estructuras de forma esférica muy próximas al nucleolo, donde posiblemente se encuentren los cromosomas sexuales (Figura 1.6L).

La cuarta proteína a estudiar fue STAG3, una cohesina específica de meiosis que sustituye parcialmente a las variantes somáticas STAG1 y STAG2. El patrón fue similar al resto de las subunidades de cohesinas analizadas previamente en la mayoría de las etapas, tanto en las etapas iniciales, donde STAG3 forma filamentos delgados en leptotene y zigotene, como en las diferentes subetapas de paquitene. Al igual que en el caso de las proteínas SMC3 y SMC1, STAG3 se acumula en las regiones no sinapsadas de los autosomas y los cromosomas sexuales (Figura 1.6M-R). Sin embargo, se encontró una diferencia importante en paquitene temprano. En esta etapa STAG3 se acumula en los autosomas en forma de pequeños focos redondeados, uno por bivalente, sobre la trayectoria del ECo. (Figura 1.6O). Para caracterizar mejor estos focos de STAG3, se realizó una triple inmunodetección de STAG3, SYCP1 y proteínas centroméricas (Figura 1.6). Se apreció que la acumulación de STAG3 colocalizaba con la región del centrómero (Figura 1.7A, A', D y D'). Además, se pudo comprobar que en esta región la señal de SYCP1 estaba interrumpida (Figura 1.7B, B', E y E'). Estos resultados indican una organización especial de los centrómeros durante la meiosis de ornitorrinco, en los que el ensamblaje del EC del CS está interrumpido y se produce una acumulación transitoria de STAG3.

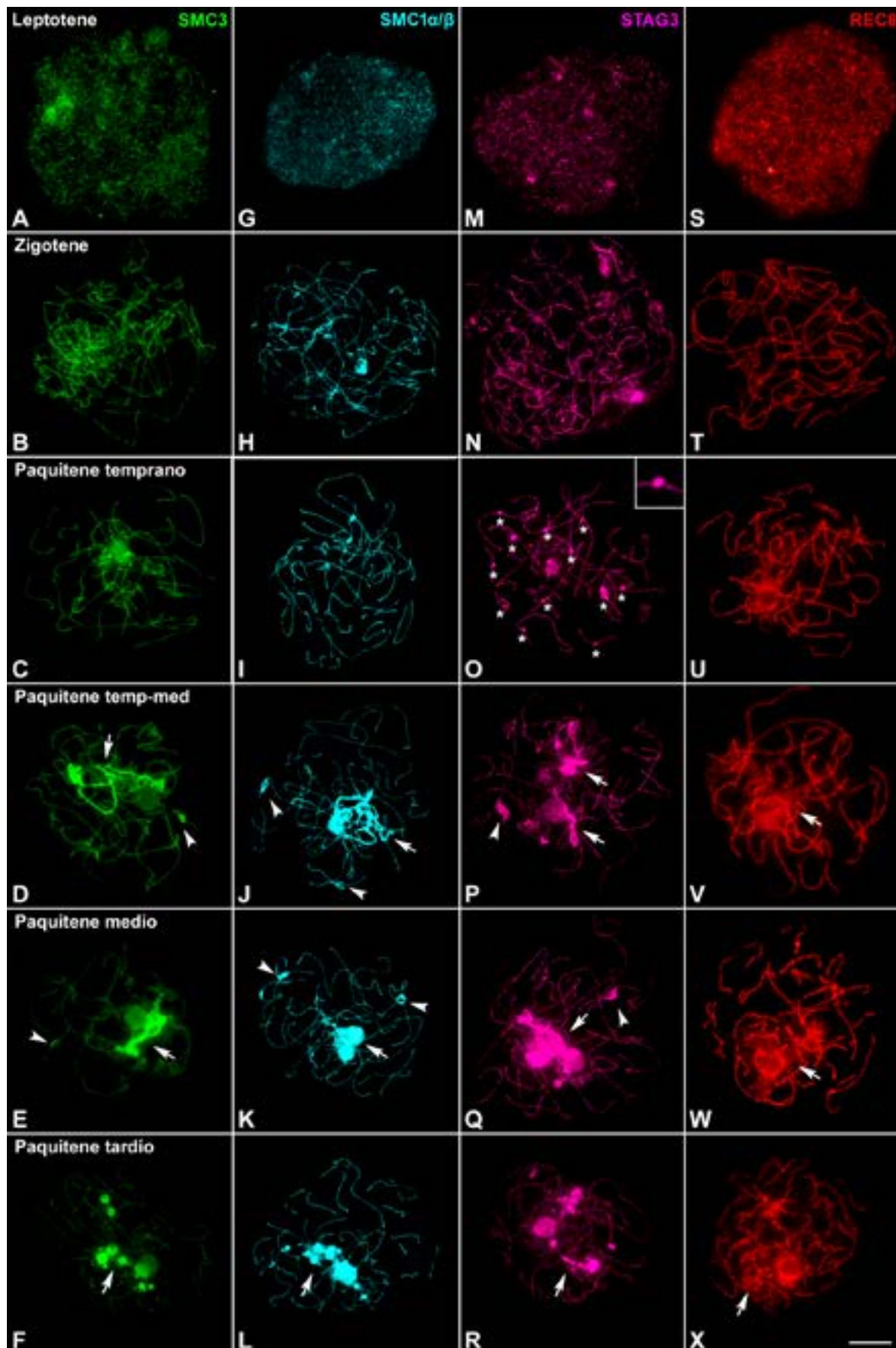


Figura 1.6. Distribución de las diferentes subunidades del complejo de cohesinas durante la profase-I en ornitorrinco. Inmunolocalización de SMC3 (verde), SMC1 α y SMC1 β (cian), STAG3 (magenta), REC8 (rojo) en esparcidos de espermatocitos. **(A, G, M, S)** Leptotene. Todas las cohesinas forman filamentos cortos y delgados. **(B, H, N, T)** Zigotene. Los ECos son más continuos y elongados a medida que los cromosomas van sinapsando. **(C, I, O, U)** Paquitene temprano. La sinapsis se ha completado y no hay modificaciones morfológicas sobre los ejes, haciendo indistinguibles los cromosomas sexuales. **(O)** STAG3 muestra en etapa focos intensos sobre los ECos (*). **(D, J, P, V)** Paquitene temprano-medio. Todas las cohesinas muestran acumulaciones sobre las regiones asinápticas de los cromosomas sexuales y algunas regiones autosómicas. **(E, K, Q, W)** Paquitene medio. Las acumulaciones son más intensas y concentradas. **(F, L, R, X).** Se completa la sinapsis de los segmentos autosómicos y se observa una acumulación en estructuras de forma esférica. **(V, W, X).** A partir de paquitene temprano-medio REC8 muestra una acumulación mucho más tenue en las regiones asinápticas comparadas con el resto de cohesinas. Las fechas indican los cromosomas sexuales y las puntas de flecha las regiones asinápticas de los autosomas. Barra de escala 10 μ m.

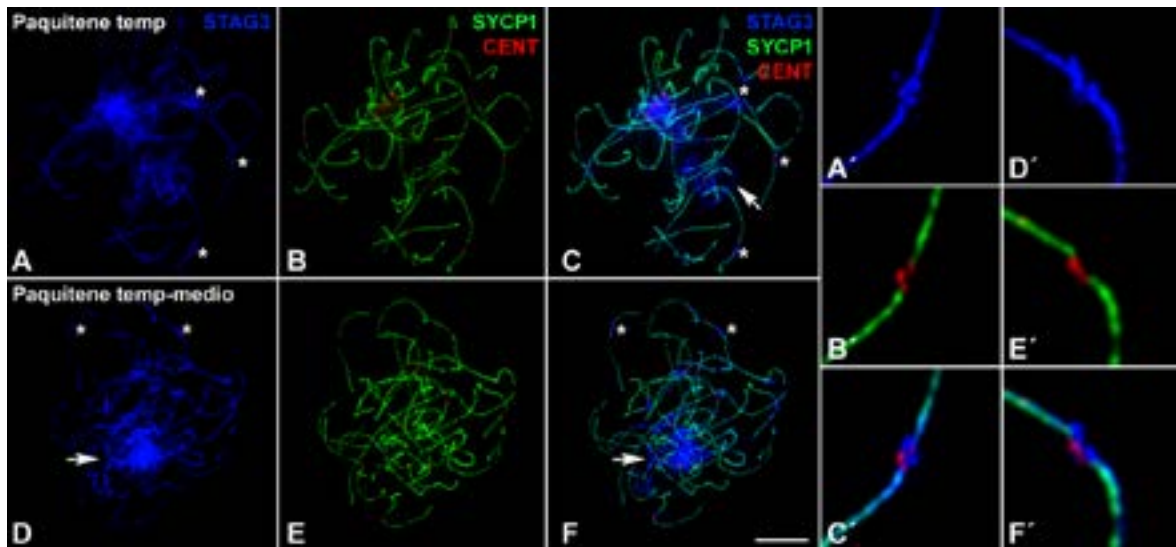


Figura 1.7. Acumulación de STAG3 en las regiones centroméricas de los autosomas en ornitorrinco. Triple inmunolocalización de STAG3 (azul), SYCP1 (verde) y centrómeros (rojo) en esparcidos de espermatocitos. **(A-C)** Paquitene temprano. **(D-F)** Paquitene temprano-medio. **(A y D)** STAG3 se acumula en las regiones asinápticas de los cromosomas sexuales (flecha) y en focos a lo largo del ECos (*). **(B y E)** SYCP1 se localiza a lo largo del eje en las regiones sinapsadas y se interrumpe en los centrómeros. **(C y F)** Combinación de las tres señales. **(A'-F')** Detalles de la zona centromérica, donde se interrumpe la señal de SYCP1 y se acumula STAG3. Barra de escala 10 μ m.

En último lugar, se analizó la distribución de REC8, subunidad del anillo de cohesinas específica de meiosis que sustituye parcialmente a RAD21. Al igual que en los casos anteriores, REC8 aparece como filamentos delgados y discontinuos en leptotene, que se hacen continuos en zigotene y recorren toda la longitud de los cromosomas en paquitene (Figura 1.6S-X). Sin embargo, mientras que el resto de cohesinas muestran una gran acumulación en las regiones asinápticas de los autosomas y los cromosomas sexuales, REC8 no muestra una acumulación tan evidente (Figura 1.6V-X). Esta diferencia se hace más patente al comparar de manera conjunta el patrón de SMC3 y REC8 (Figura 1.8). La distribución de ambas proteínas es muy similar hasta paquitene temprano-medio, cuando SMC3 se acumula de manera muy intensa sobre las regiones asinápticas de los autosomas y de los cromosomas sexuales. En esta etapa REC8 muestra una señal mucho menos intensa, que permite definir de manera más detallada la trayectoria del ECo subyacente a dicha acumulación. Esta menor acumulación de REC8 en regiones asinápticas es acorde con el patrón descrito previamente en los cromosomas sexuales de ratón (Page et al., 2006a), indicando que su menor abundancia en estas regiones, y específicamente en los cromosomas sexuales, es un patrón conservado evolutivamente en mamíferos.

Se ha intentado analizar la localización de otras dos subunidades de kleisin, RAD21 y RAD21L, pero no se han obtenido resultados consistentes, y por ello no se muestran.

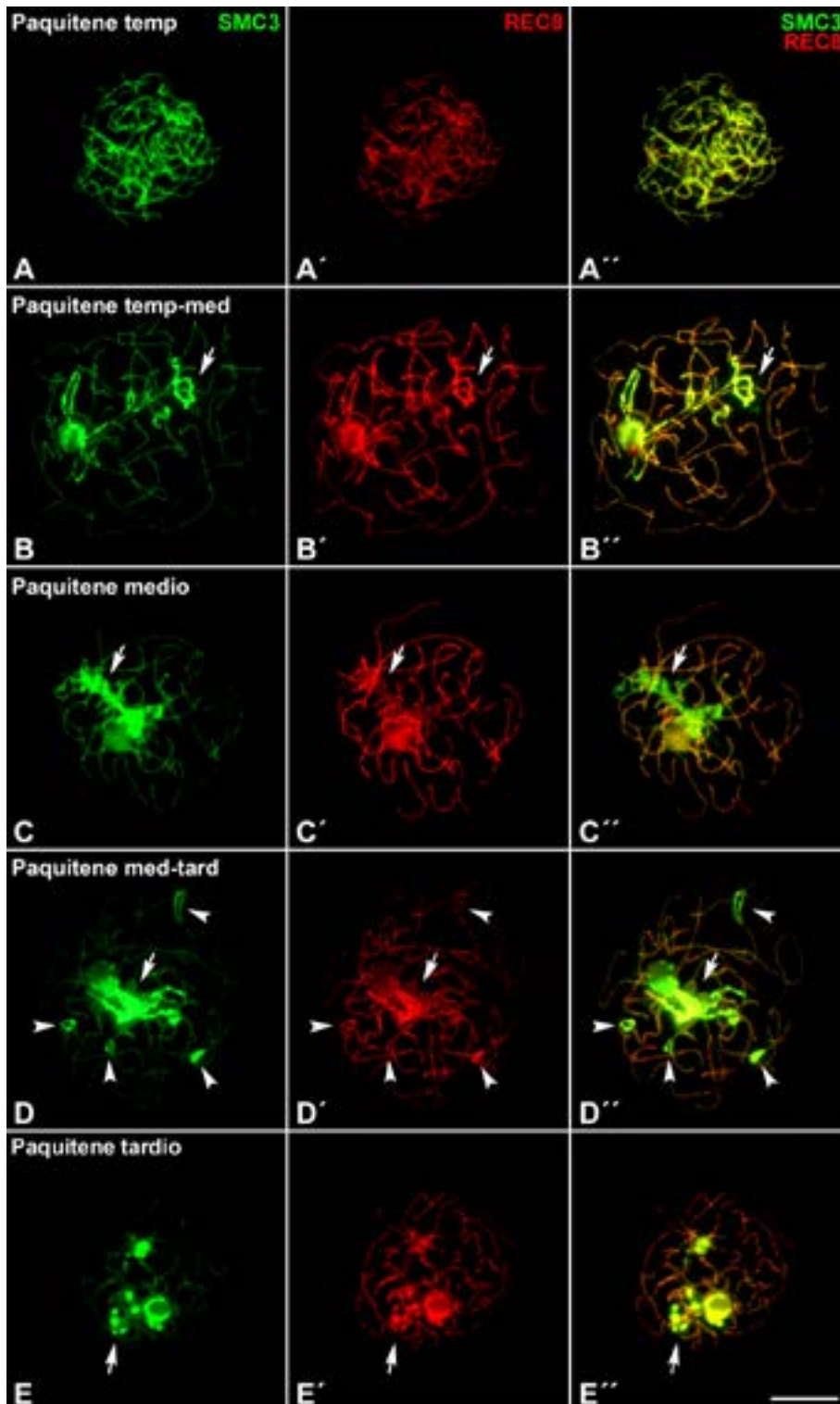


Figura 1.8. Comparación de las cohesinas SMC3 y REC8 durante la profase-I en oryza sativa. Doble inmunolocalización de las cohesinas SMC3 (verde) y REC8 (rojo) en esparcidos de espermatocitos. (A-A'') Paquitene temprano. (B-B'') Paquitene temprano-medio. (C-C'') Paquitene medio. (D-D'') Paquitene medio tardío. (E-E'') Paquitene tardío. Desde paquitene temprano-medio en adelante se muestra una intensa acumulación de SMC3 sobre los cromosomas sexuales (flechas) y las regiones asinápticas autosómicas (puntas de flecha) que con REC8 es mucho menos intensa. Barra de escala 10 μ m.

1.2.1. Localización de las cohesinas en etapas tardías de la primera profase meiótica

Como ya se ha mencionado, las etapas tardías de la profase-I, de diplotene en adelante, son muy poco abundantes. En general, las células en etapas posteriores a paquitene muestran signos de condensación de la cromatina. Se han clasificado estas etapas en diplotene, diacinesis y prometafase-I atendiendo al grado de condensación (Figura 1.9). En estas etapas, las cohesinas se localizan en el interior de la cromatina de cada cromosoma. Todas las cohesinas muestran un patrón similar, incluyendo REC8. Los cromosomas sexuales pierden la característica acumulación de cohesinas, haciendo imposible discriminarlos del resto de cromosomas. No se ha podido indentificar correctamente las células en etapas más tardías y tampoco en la segunda división meiótica.

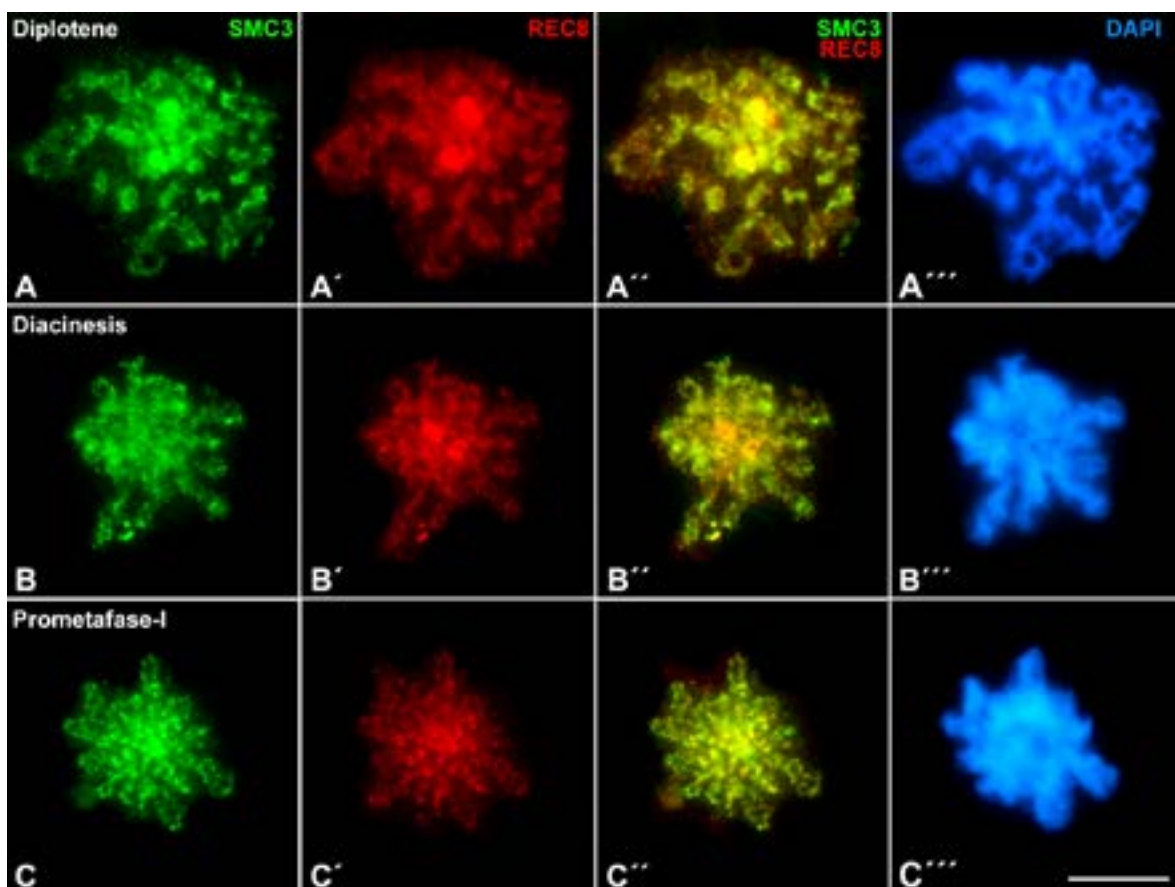


Figura 1.9. Distribución de cohesinas en etapas tardías de la profase-I en ornitorrinco. Doble inmunolocalización de las cohesinas SMC3 (verde), REC8 (rojo) y tinción diferencial de cromatina con DAPI (azul) en esparcidos de espermatocitos. (A-A''') Diplotene. (B-B''') Diacinesis. (C-C''') Prometafase-I. Las cohesinas se localizan en la región interna de la cromatina, posiblemente en la región entre las cromátidas hermanas. Barra de escala 10 µm

1.3. Análisis del complejo sinaptonémico en ornitorrinco

El CS es sin duda la estructura más característica que se ensambla a lo largo de los cromosomas durante la meiosis, y es la encargada de mediar la asociación física de los cromosomas homólogos. Sin embargo, el estudio del CS en ornitorrinco ha estado limitado

por la disponibilidad de anticuerpos contra las proteínas del mismo. Si bien en trabajos previos y en el apartado anterior de esta tesis, se ha mostrado el ciclo de localización de SYCP1, el principal constituyente de los FTs, la localización de las proteínas de los ELs no ha sido posible, ya que tanto los anticuerpos comerciales como los disponibles en diferentes laboratorios no daban señal en esta especie, o esta era claramente inespecífica.

Esta circunstancia no es extraña, ya que las proteínas del CS están poco conservadas a nivel de secuencia, aunque sí están muy conservadas en su estructura y su función (Fraune et al., 2016). Además, estudios previos han demostrado que el ornitorrinco presenta tres copias del gen que codifica para la proteína SYCP3 y que estas presentan cierto grado de divergencia entre sí y con la SYCP3 de otros mamíferos (Casey et al., 2015). Por lo tanto, para estudiar la localización de esta proteína en el ornitorrinco se decidió generar anticuerpos específicos para las tres isoformas (SYCP3, SYCP3-like, SYCP3-Y) y poder con ello localizar los ELs del CS en esta especie. Se comprobó la especificidad de los anticuerpos obtenidos mediante la técnica de *Western blot* y todos reconocían una banda que se detectaba aproximadamente en un peso molecular de 30 kDa, lo que se corresponde con el peso esperado para estas proteínas (Fraune et al., 2012) (Figura 1.10).

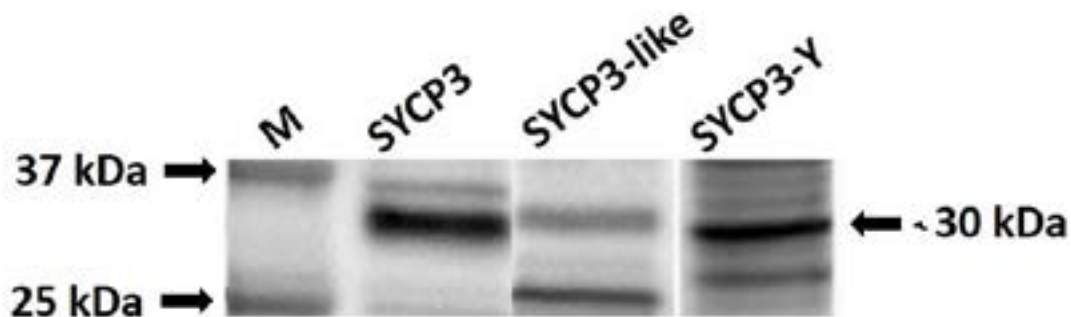


Figura 1.10. Especificidad de los anticuerpos específicos generados contra las isoformas de SYCP3 de ornitorrinco. *Western blot* sobre extractos de proteínas totales de testículo. (M) Marcador. Expresión de los anticuerpos frente a las tres isoformas de SYCP3 en testículo de ornitorrinco (SYCP3, SYCP3-like, SYCP3-Y), detectándose en un peso molecular aproximado de 30 kDa.

A fin de estudiar la localización y el ciclo de aparición de las diferentes variantes de SYCP3 se llevó a cabo una triple inmunodetección de cada una de ellas con SMC3, como referencia de la progresión de la profase-I y SYCP1, como referencia del proceso de sinapsis.

Nuestros resultados muestran que SYCP3 y SYCP3-like tienen un patrón de localización idéntico, y por lo tanto se presentan de manera conjunta. En leptotene, cuando se empiezan a formar los ECos (Figura 1.11A), no se aprecia ningún marcaje de las proteínas SYCP3 ni SYCP3-like. Esto indica que la formación de los EAs, o al menos la incorporación de SYCP3 y SYCP3-like a esta estructura está retrasada en relación al patrón habitual en mamíferos. Solo en zigotene tardío comienza a detectarse la presencia de SYCP3 y SYCP3-like, principalmente

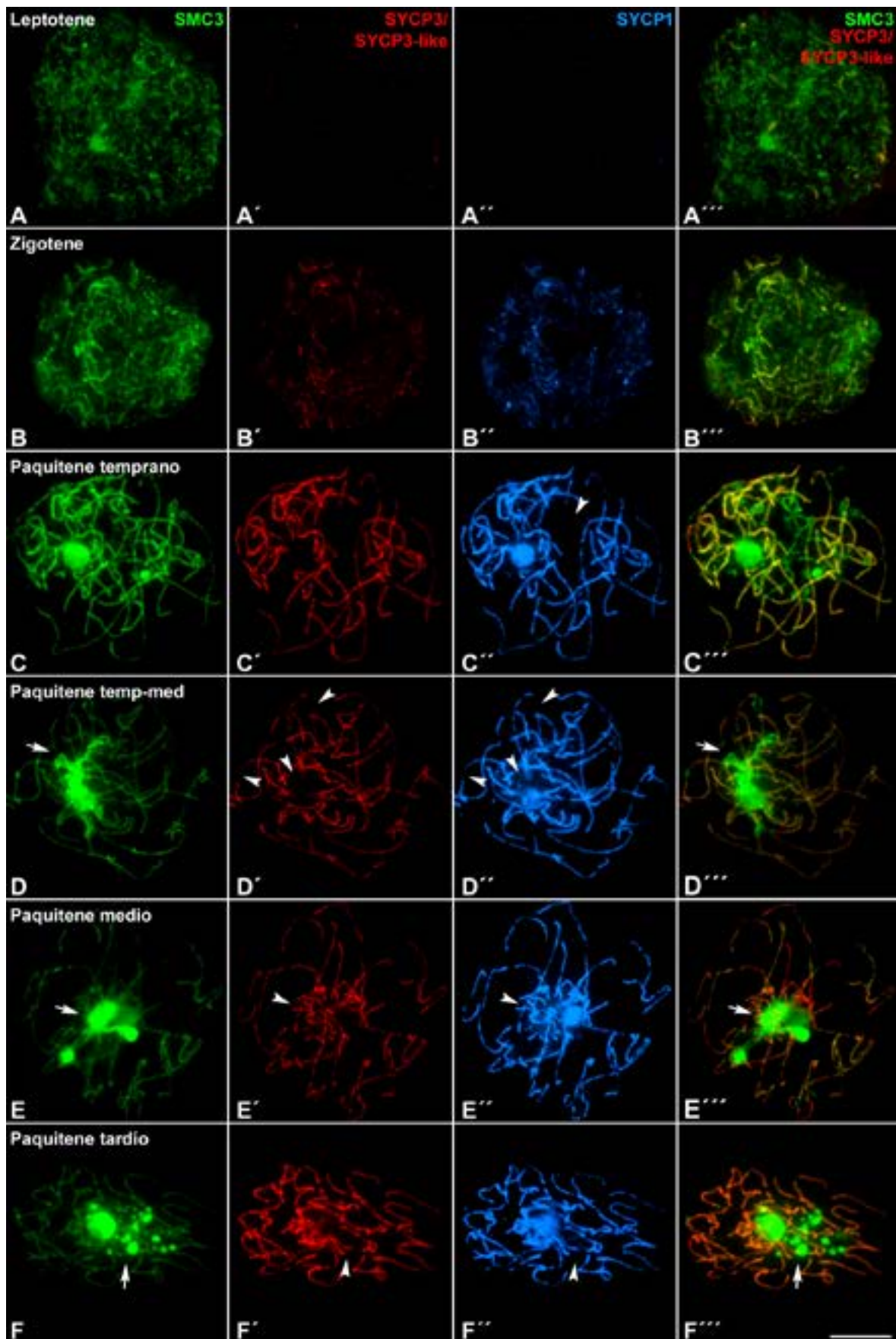


Figura 1.11. Localización de las isoformas SYCP3 y SYCP3-like durante la profase-I en ornitorrinco. Triple inmunolocalización de SMC3 (verde), SYCP3/SYCP3-like (rojo) y SYCP1 (azul) en esparcidos de espermatozoides. **(A-A''')** Leptotene. En el inicio de la formación de ECos, no hay señal de SYCP3/SYCP3-like, ni de SYCP1, ya que no ha comenzado la sinapsis. **(B-B''')** Zigotene. Comienza la sinapsis y SMC3 se muestra más continua en las regiones donde se ensambla SYCP1. Se observan fragmentos aislados de SYCP3/SYCP3-like. **(C-C''')** Paquitene temprano. Cuando la sinapsis es completa, SYCP3/SYCP3-like se observan sobre los ejes de los cromosomas, excepto en las regiones asinápticas de los cromosomas sexuales y autosomas. **(D-D''')** Paquitene temprano-medio. Etapa del inicio del engrosamiento de los ECos marcados con SMC3 sobre los cromosomas sexuales. En estas regiones no se observa presencia de SYCP3/SYCP3-like, mostrando un patrón similar a SYCP1. **(E-E''')** Paquitene medio. La acumulación de SMC3 sobre los cromosomas sexuales es mayor, pero no se detecta SYCP3/SYCP3-like ni tampoco SYCP1. Patrón que se repite en paquitene tardío **(F-F''')**. Las flechas indican los cromosomas sexuales y las puntas de flecha las regiones asinápticas de los cromosomas sexuales y autosomas. Barra de escala 10 μm .

en las mismas regiones en las que aparece SYCP1, aunque en algunos casos el ensamblaje de SYCP1 parece ser previo al de SYCP3 y SYCP3-like (Figura 1.11B y B''). A partir de paquitene ya se observa que SYCP3 y SYCP3-like se encuentran en toda la longitud de los autosomas que han completado la sinapsis (Figura 1.11C-F''). Sin embargo, es muy notorio que SYCP3 y SYCP3-like no se detectan sobre los cromosomas sexuales, ni sobre las regiones autosómicas que no han completado la sinapsis y tampoco se detectan en el nucleolo. Esta ausencia se manifiesta tanto en las etapas de paquitene temprano, cuando los ECos aún son delgados sobre los cromosomas sexuales (Fig. 1.11C-D''), como en etapas más tardías, cuando la acumulación de SMC3 es muy intensa sobre dichos cromosomas (Fig. 1.11E-F'').

La tercera isoforma, SYCP3-Y, también presenta un patrón temporal distinto al esperado. Al igual que las otras dos isoformas, esta proteína no se detecta en la etapa de leptotene (Figura 1.12A y A'), y en zigotene solo de manera muy débil (Figura 1.12B y B'). A partir de paquitene se aprecia un marcaje tenue sobre los EA/EL de los cromosomas que han completado la sinapsis. Sin embargo, se observa una intensa acumulación en las regiones asinápticas de los autosomas y en los cromosomas sexuales (Figura 1.12C-F'). Este marcaje no parece ser consecuencia de las modificaciones de los EAs de estos cromosomas ya que se inicia en la etapa de paquitene temprano, cuando el engrosamiento y la acumulación de SMC3 no ha comenzado todavía (Figura 1.12C-C'). A partir de paquitene temprano-medio en adelante, sí se observa que la acumulación de SMC3 en las regiones asinápticas va acompañada de una acumulación equivalente de SYCP3-Y en las mismas regiones (Figura 1.12D-D'' y F-F'). La acumulación se observa también en el nucleolo.

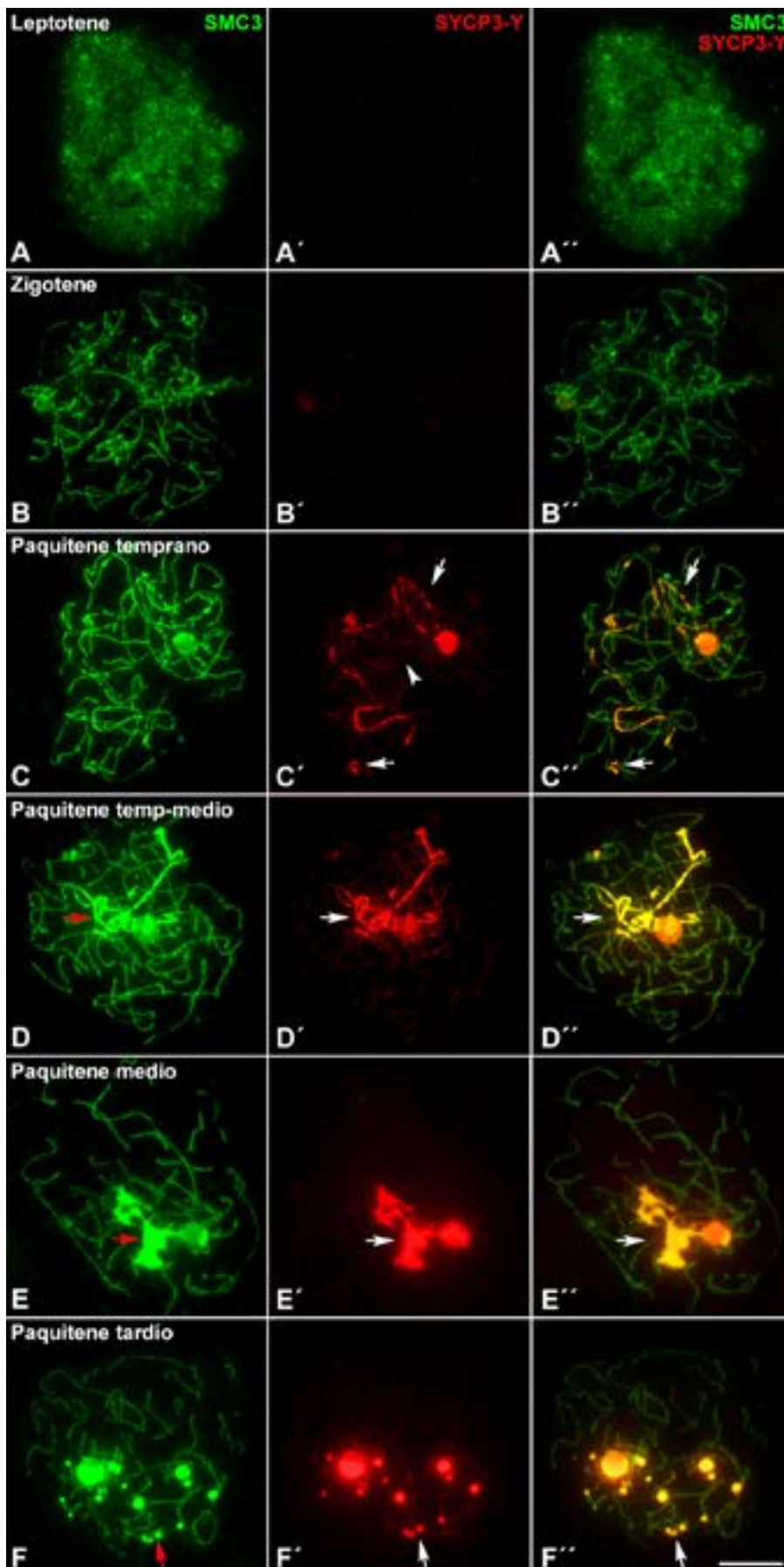


Figura 1.12. Localización de la isoforma SYCP3-Y durante la profase-I en ornitorrinco. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y SYCP3-Y (rojo) en esparcidos de espermatocitos túbulos seminíferos. **(A-A'')** Leptotene. SMC3 se encuentra como focos dispersos y no hay señal de SYCP3-Y. **(B-B'')** Zigotene. Comienza la sinapsis y SMC3 se muestra más continua en dichas regiones. No se observa un marcaje evidente de SYCP3-Y. **(C-C'')** Paquitene temprano. SMC3 se deposita en todos los cromosomas y SYCP3-Y aparece de manera tenue en los autosomas (punta de flecha) y marcando más intensamente las regiones de los cromosomas sexuales y regiones asinápticas de los autosomas (flecha). **(D-D'')** Paquitene temprano-medio. Se observa el engrosamiento del ECo con acumulación de SMC3 sobre los cromosomas sexuales y regiones autosómicas asinápticas (flecha roja). SYCP3-Y se acumula notablemente en las mismas regiones (flecha blanca). **(E-E'' y F-F'')** Paquitene medio y tardío acumulación más intensa de las proteínas SMC3 (flecha roja) y SYCP3-Y sobre los cromosomas sexuales (flecha). Barra de escala 10 μ m.

La presencia y acumulación de SYCP3-Y en las regiones asinápticas de los cromosomas sexuales y los autosomas se comprobó mediante una doble inmunolocalización con SYCP1. Se observó que ninguna de estas proteínas se detecta en leptotene (Figura 1.13A). En zigotene, el único marcaje observado es el de SYCP1 (Figura 1.13B). A partir de paquitene temprano SYCP3-Y es detectable en el núcleo. El patrón de distribución es claramente opuesto al de SYCP1: mientras esta proteína se detecta en las regiones que ha completado la sinapsis, SYCP3-Y está ausente de la mismas y muestra un patrón de localización y acumulación típico de las regiones asinápticas de los autosomas y los cromosomas sexuales (Figura 1.13C-F).

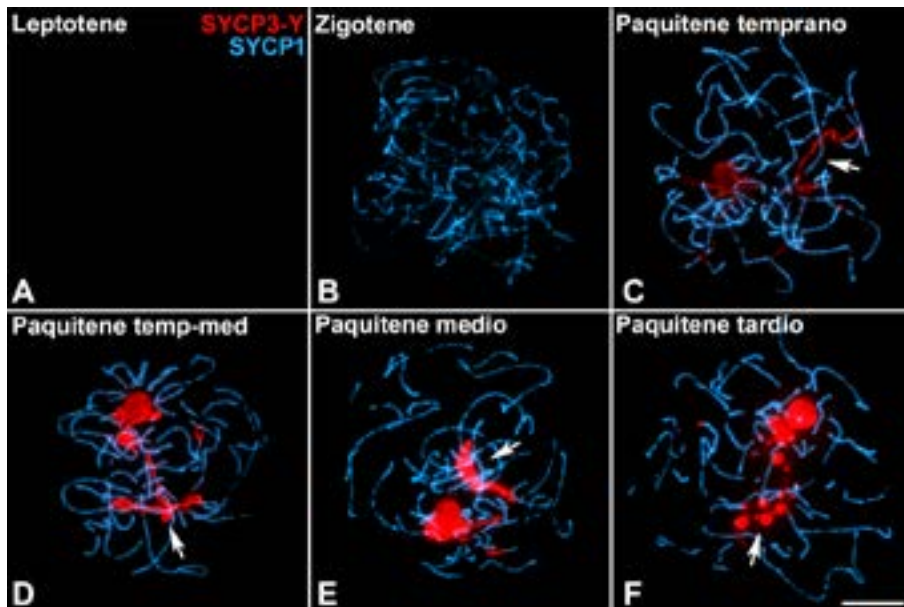


Figura 1.13. Doble inmunolocalización de SYCP3-Y (rojo) y SYCP1 (azul) en espermatocitos de ornitorrinco. **(A)** Leptotene. Ausencia de ambas proteínas. **(B)** Zigotene. SYCP1 aparece de manera discontinua, marcando las zonas que han completado la sinapsis. No hay señal de SYCP3-Y. **(C)** Paquitene temprano. La señal de SYCP1 ya es continua sobre los cromosomas. SYCP3-Y aparece principalmente sobre aquellas regiones que no se marcan con SYCP1, ya sea en los autosomas (punta de flecha) o los cromosomas sexuales (flecha). El mismo patrón se observa en paquitene temprano-medio **(D)**, paquitene medio **(E)** y paquitene tardío **(F)**. Barra de escala 10 μ m.

1.3.1. Localización de HORMAD1

Durante la meiosis de ratón, la presencia de regiones asinápticas en los cromosomas viene acompañada de la acumulación de diversas proteínas sobre los EAs de las mismas. Entre ellas se encuentran las proteínas HORMAD1 y 2. El patrón de distribución caracterizado para las mismas

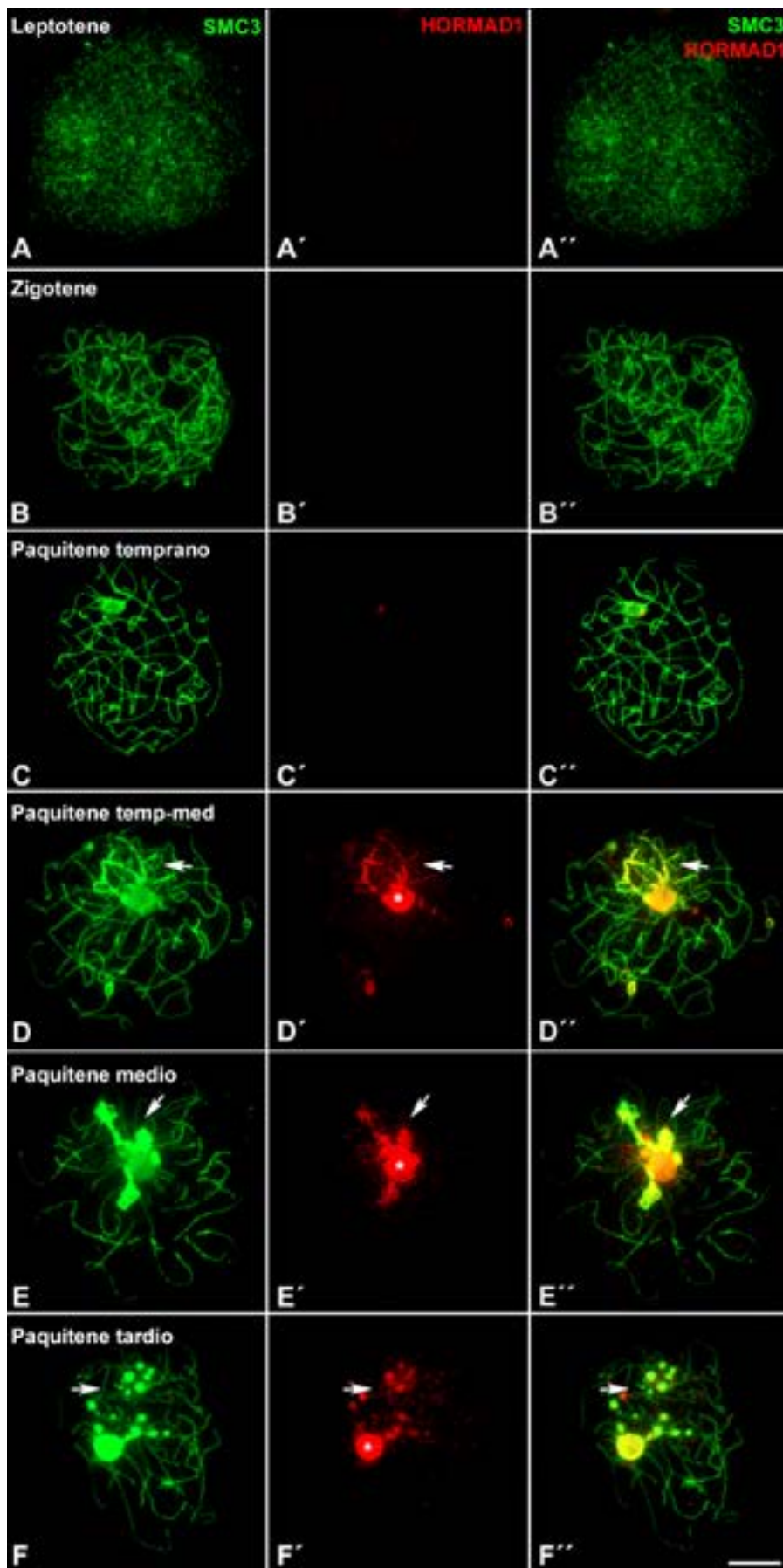


Figura 1.14. Patrón de distribución de HORMAD1 durante la profase-I en ornitorrinco. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y HORMAD1 (rojo) en esparcidos de espermatocitos. HORMAD1 no se detecta en etapas tempranas de la profase-I: leptotene (A-A''), zigotene (B-B'') ni paquitene temprano (C-C''). (D-D'') Paquitene temprano-medio. A partir de esta etapa, HORMAD1 se detecta como filamentos delgados que coinciden con la trayectoria de los ECos engrosados visualizados con SMC3 (flecha), así como acumulada de manera intensa en el nucléolo (*). este patrón serepite en paquitene medio (E-E'') y paquitene tardío (F-F''). Barra de escala 10 μ m.

en ratón indica que se localizan a lo largo de los EAs en leptotene y zigotene, y se van eliminando de los mismos a medida que progresa la sinapsis. Durante paquitene, aparecen solo tenuemente sobre las trayectorias del CS, aunque acumuladas de manera muy intensa sobre los EAs de los cromosomas sexuales. Finalmente, en diplotene, se observa nuevamente una acumulación de HORMAD1 y 2 sobre los ELs de todos los cromosomas a medida que estos dejan de estar sinapsados ([Fukuda et al., 2010](#); [Wojtasz et al., 2009](#)).

A fin de comprobar si durante la meiosis de ornitorrinco el patrón de estas proteínas es similar, se llevó a cabo la inmunodetección de estas proteínas, conjuntamente con SMC3. Sólo pudimos obtener un marcaje positivo con HORMAD1. Nuestros resultados indican que, a diferencia del ratón, en ornitorrinco HORMAD1 no se acumula de manera evidente en los cromosomas durante leptotene, zigotene o paquitene temprano (Figura 1.14A-C''). Solamente es posible apreciar la presencia de HORMAD1 en el núcleo a partir de paquitene temprano-medio. La proteína se acumula preferencialmente sobre los ECos sin sinapsar, tanto en los cromosomas sexuales como en los autosomas (Figura 1.14D). La señal de HORMAD1 inicialmente sigue la trayectoria de los ECos, pero a medida que avanza la etapa de paquitene se redistribuye para localizarse de manera más difusa, superponiéndose parcialmente con las acumulaciones de SMC3 tanto en los cromosomas sexuales como en el nucleolo (Figura 1.14E-F). No se aprecia que en etapas más tardías HORMAD1 se localice sobre los autosomas una vez que se produce el fenómeno de desinapsis.

1.4. Reparación del DNA

La recombinación entre los cromosomas homólogos es uno de los procesos exclusivos y más relevantes de la meiosis. Hasta ahora no se han publicado datos respecto a este proceso en monotremas. Por tanto, como siguiente objetivo nos planteamos la caracterización del ciclo de localización de algunas de las proteínas relacionadas con la recombinación. Para ello, se llevó a cabo la localización de varias proteínas:

- RPA, implicada en la respuesta inicial al daño generado en el DNA, protegiendo las regiones de DNA de cadena sencilla.
- RAD51 y DMC1, recombinasas que dirigen los fenómenos de invasión de la cadena del DNA dañado sobre la hebra que se usará de molde. RAD51 está presente tanto en la línea somática como en la germinal, mientras que DMC1 es específica de meiosis.
- MLH1, implicada en los últimos pasos del proceso de recombinación y específicamente en procesar los intermediarios de recombinación hacia la vía de formación de sobrecruzamientos.

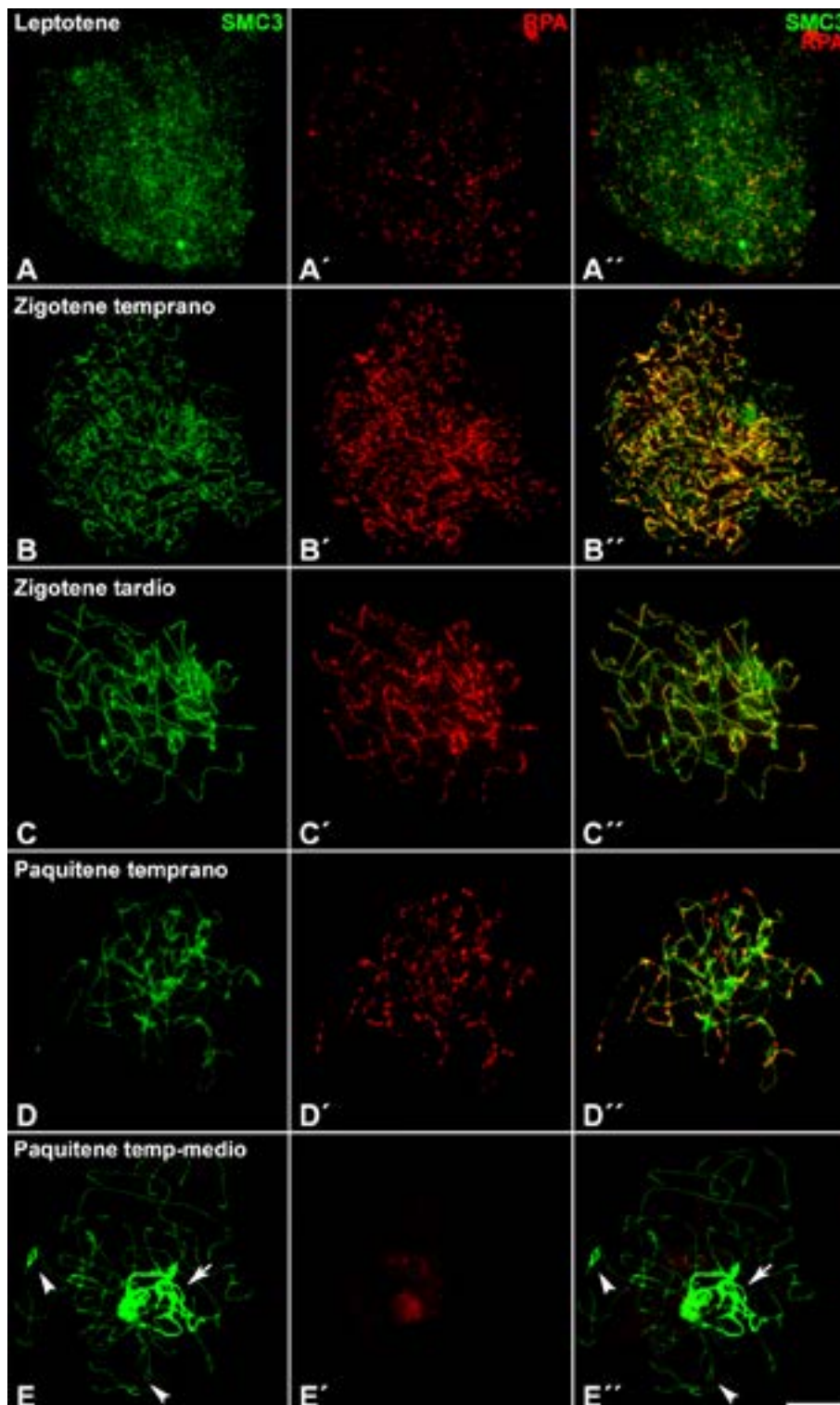


Figura 1.15. Distribución de la proteína RPA durante la profase-I en ornitorrinco. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y RPA (rojo) en espermátocitos. **(A-A'')** Leptotene. Localización de focos de RPA sobre los ECos distribuidos por todo el núcleo. **(B-B'')** Zigotene temprano. Se observa un aumento notable del número de focos de RPA. **(C-C'')** Zigotene tardío. Se mantienen los focos, muchos de ellos sobre las regiones sinapsadas. **(D-D'')** Paquitene temprano. Se produce una disminución notable de los focos de RPA. **(E-E'')** Paquitene temprano-medio. Los focos de RPA desaparecen de forma coincidente con la acumulación de SMC3 en las regiones asinápticas de los cromosomas sexuales (flecha) y autosomas (punta de flecha). Barra de escala 10 μ m.

Nuestro análisis ha revelado que algunas de estas proteínas (RPA y RAD51) tienen patrones de localización similares a los descritos en otras especies de mamíferos, mientras que en los otros casos (DMC1 y MLH1) el patrón citológico es completamente distinto. Se presentan estos dos patrones de manera separada.

1.4.1. Patrón clásico de recombinación

RPA está presente desde el inicio de la profase-I, apareciendo en leptotene como focos de pequeño tamaño dispersos por el núcleo. Los focos son poco abundantes y no se aprecia con claridad si se localizan preferencialmente sobre los ECos de los cromosomas, que en esta etapa están comenzando a formarse (Figura 1.15A-A''). En zigotene temprano el número de focos aumenta considerablemente. RPA se observa a lo largo de todos los cromosomas (Figura 1.15B-B''). En zigotene tardío muchos de los cromosomas están completando su sinapsis y el número de focos de RPA se mantiene muy elevado, aunque se aprecia que, a diferencia de la etapa anterior, RPA tiende a aparecer preferentemente en las regiones que han completado la sinapsis (Figura 1.15C-C''). En paquitene temprano el número de focos desciende ligeramente (Figura 1.15D-D'') y quedan preferentemente acumulados sobre las regiones que han completado la sinapsis. A partir de paquitene temprano-medio, cuando comienza la acumulación de SMC3 en los cromosomas sexuales, los focos de RPA desaparecen por completo (Figura 1.15E-E''). Por ello, no fue posible observar de manera específica el patrón de localización sobre los cromosomas sexuales, dado que en que la primera etapa en que podemos distinguir estos cromosomas del resto (paquitene temprano-medio), RPA desaparece casi por completo.

A continuación, analizamos el patrón de la distribución de RAD51. Al igual que RPA, RAD51 se localiza en el núcleo desde la etapa de leptotene (Figura 1.16A-A'') como focos distribuidos homogéneamente por todo el núcleo. En zigotene el número de focos aumenta ligeramente, aunque en este caso la abundancia es aparentemente similar entre zigotene temprano (Figura 1.16B-B'') y tardío (1.16C-C''). Tampoco se aprecia con tanta claridad que los focos de RAD51 aparezcan de manera más abundante en las regiones sinapsadas. El número de focos desciende en paquitene temprano (Figura 1.16D-D'') y nuevamente cuando se inicia la acumulación específica de SMC3 en los cromosomas sexuales y regiones asinápticas en paquitene temprano-medio la señal de RAD51 ya no es detectable de manera específica sobre los cromosomas (Figura 1.16E-E').

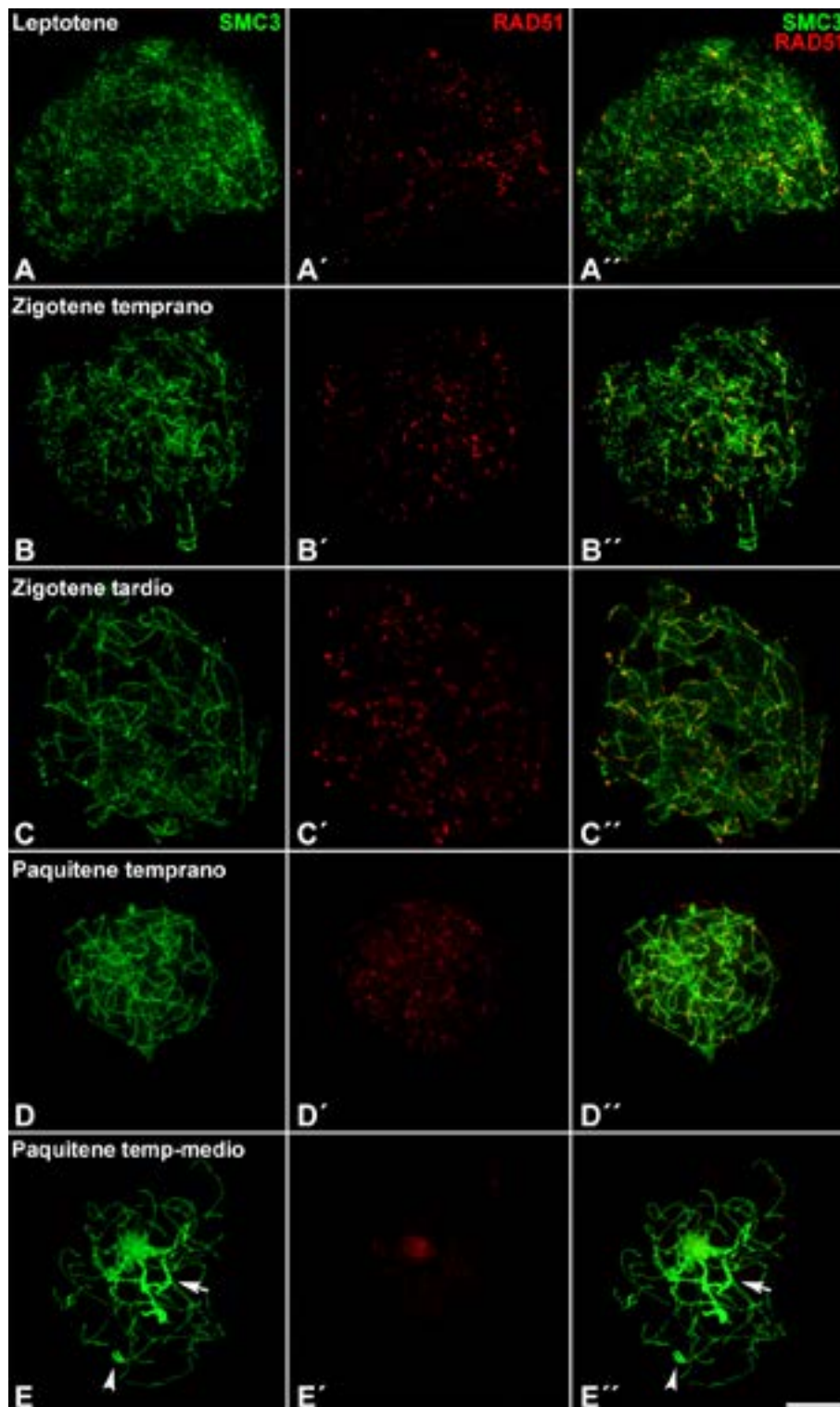


Figura 1.16. Distribución de la proteína de reparación RAD51 durante la profase-I en ornitorrinco. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y RAD51 (rojo) en espermatozoides. **(A-A'')** Leptotene. RAD51 aparece como focos dispersos sobre los ECos. **(B-B'')** Zigotene temprano y **(C-C'')** zigotene tardío. Aumento del número de focos de RPA en todos los cromosomas. **(D-D'')** Paquitene temprano. Disminución de los focos de RAD51. **(E-E'')** Paquitene temprano-medio. Ausencia de RAD51 a la vez que se produce la acumulación de SMC3 en las regiones asinápticas de los cromosomas sexuales (flecha) y autosomas (punta de flecha). Barra de escala 10 μ m.

Ambas proteínas muestran un patrón de localización similar. Para corroborar estas similitudes, se llevó a cabo una localización simultánea de RPA y RAD51 junto a SMC3. Esto nos permitió observar que la mayoría de focos de ambas proteínas se sitúan sobre los ECos y aunque en general casi todos los focos de RAD51 tienden a coincidir con los de RPA, existe un exceso de focos de RPA, que en muchos casos no van acompañados de RAD51 (Figura 1.17). Estas diferencias sugieren que si bien RPA y RAD51 se requieren para la reparación del DNA, posiblemente no lo sean simultáneamente en los mismos sitios, a la vista de la colocalización incompleta de ambas proteínas.

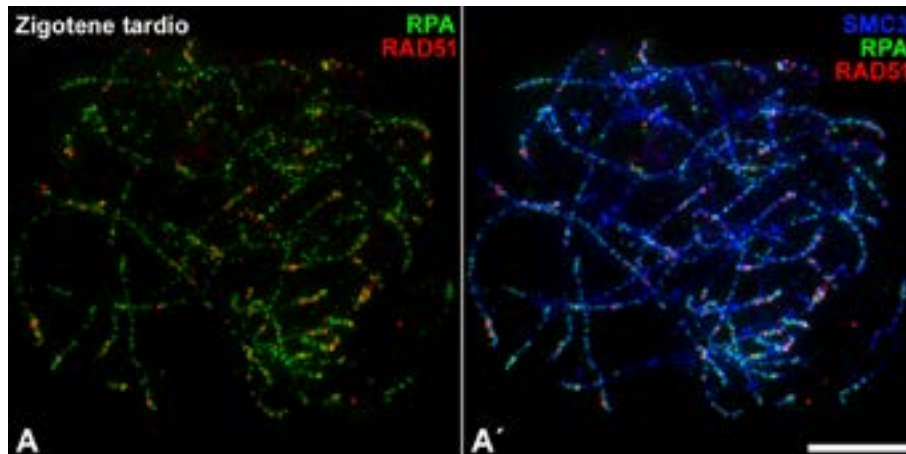


Figura 1.17. Localización simultánea de RPA y RAD51 en ornitorrincos. Triple inmunolocalización de SMC3 (azul), RPA (verde) y RAD51 (rojo) en esparcido de un espermatocito. (A-A') Zigotene tardío. Los focos naranjas representan la colocalización de ambas proteínas. Se aprecia que el número de focos verdes (solo RPA) es mucho mayor que el de focos rojos (solo RAD51). Barra de escala 10 µm.

Por otro lado, para determinar si existen diferencias en la dinámica y en la abundancia de ambas proteínas durante la profase-I, se realizó un estudio cuantitativo de los focos en las diferentes etapas (Tabla 1.1). En cuanto a RPA, el test de ANOVA muestra que hay un aumento significativo entre la etapa de leptotene y zigotene temprano, que marca el pico máximo de focos de esta proteína. El número de focos se mantiene constante durante zigotene tardío, pero en paquitene temprano se observa un descenso pronunciado. Finalmente, en paquitene temprano-medio los focos desaparecen prácticamente por completo (Figura 1.18A). RAD51 sigue una dinámica distinta, ya que el número de focos detectados en leptotene se mantiene en zigotene temprano y tardío. Solamente en paquitene temprano se puede detectar un descenso significativo del número de focos, que vuelve a descender significativamente hasta desaparecer casi por completo en paquitene temprano-medio (Figura 1.18B).

Estas variaciones en la dinámica van acompañadas de diferencias significativas en el número de focos entre ambas proteínas (test t de Student) (Figura 1.18C). Así, en leptotene ambas proteínas parten de valores similares, pero en zigotene el número de focos de RPA se hace significativamente más alto. En paquitene temprano, nuevamente los valores de ambas proteínas se hacen equivalentes. Estos resultados indican que, si bien el número de roturas de DNA detectadas al principio de la meiosis puede requerir la incorporación tanto de RPA como

de RAD51, las etapas concretas de reparación que ocurren en zigotene parecen requerir una mayor participación de RPA. Esta participación se iguala en paquitene temprano, y a partir de ese momento las dos proteínas son requeridas en la misma proporción.

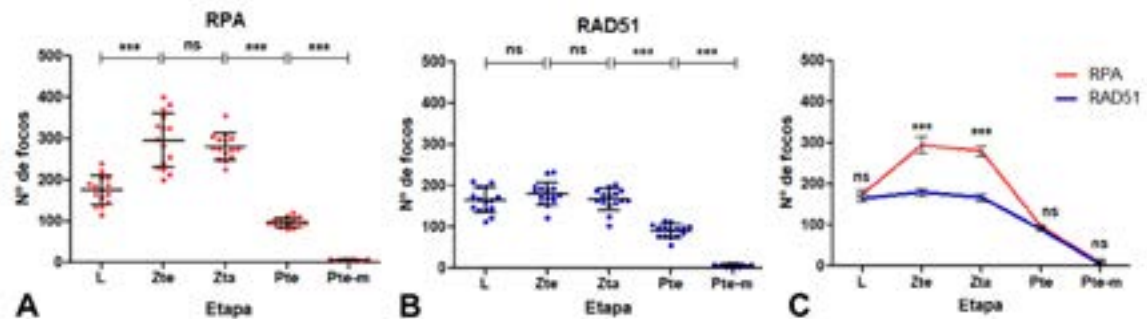


Figura 1.18. Variación del número focos de RPA y RAD51 durante la profase-I de ornitorrinco. **(A)** Gráfico del número de focos de RPA y análisis estadístico ANOVA de una vía, que muestra diferencias significativas entre todas las etapas excepto zigotene temprano y tardío. **(B)** Gráfico del número de focos de RAD51 junto al análisis estadístico ANOVA de una vía, que muestra una disminución significativa entre las etapas de zigotene tardío y paquitene temprano y entre paquitene temprano y paquitene temprano-medio. Se indican con asteriscos (*) los valores del test de ANOVA con corrección de Tukey para comparaciones múltiples entre las diferentes etapas. ns: no significativo; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$. **(C)** Representación gráfica de las medias y desviación estándar del número de focos de RPA (naranja) y RAD51 (azul). Existen diferencias significativas (test t de Student) en el número de focos entre ambas proteínas solamente en zigotene temprano y tardío. ns: no significativo; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$. L: leptotene; Zte: zigotene temprano; Zta: zigotene tardío; Pte: paquitene temprano; Pte-m: paquitene temprano medio. Número de células por etapa $n = 15$.

	Proteínas	Nº de células	Media de focos	Desviación Estándar
Leptotene	RPA	15	175,93	34,58
	RAD51	15	164,60	29,85
Zigotene temprano	RPA	15	296,47	66,31
	RAD51	15	181,20	27,95
Zigotene tardío	RPA	15	281,07	31,74
	RAD51	15	167,40	26,28
Paquitene temprano	RPA	15	97,73	11,33
	RAD51	15	90,87	15,86
Paquitene temp-medio	RPA	15	6,90	2,60
	RAD51	15	5,90	3,03

Tabla 1.1. Datos numéricos de los recuentos de focos de RPA y RAD51 en diferentes etapas de profase-I en ornitorrinco. Se indica el número de células, la media de los focos contados por cada proteína y la desviación estándar.

1.4.2. Patrón inusual de recombinación

Continuando con el estudio de la reparación del DNA, se analizó la distribución de DMC1. Lo esperable en el caso de esta proteína es que mostrara un patrón similar al de RAD51, ya que ambas actúan conjuntamente ([Brown and Bishop, 2014](#)). Sin embargo, el patrón resultó ser muy diferente. En leptotene, cuando RPA y RAD51 comienzan a aparecer, DMC1 no es detectable en el núcleo (Figura 1.19A). A partir de zigotene se detectan varios focos que, a diferencia de los observados para RAD51, son poco numerosos y más grandes en tamaño. Aunque es difícil asignar focos a cromosomas específicos, aparentemente cada foco parece corresponder a un bivalente (Figura 1.19B). El mismo patrón se observa en paquitene temprano, aunque en esta etapa podemos localizar una gran parte de los focos próximos al nucleolo (Figura 1.19C). A partir de paquitene medio los focos empiezan a disminuir, hasta desaparecer en paquitene tardío (Figura 1.19D-E).

Sorprendentemente, el patrón de localización de MLH1, que está implicada en la recombinación tardía y en la formación de quiasmas, es muy parecido al de DMC1. MLH1 no se detecta en leptotene (Figura 1.19A') y aparece en zigotene en forma de focos intensos y dispersos sobre los ejes de los cromosomas (Figura 1.19B'). Estos focos se mantienen en paquitene temprano y medio (Figura 1.19C', D') y disminuyen en paquitene tardío, aunque en esta etapa aún se pueden observar algunos focos dispersos (Figura 1.19E'). La similitud del patrón de ambas proteínas queda patente cuando se realiza una localización conjunta de ambas proteínas (Figura 1.19A''-E''). DMC1 y MLH1 tienen patrones espacio-temporales similares, aunque DMC1 desaparece primero y MLH1 persiste hasta paquitene tardío. Las señales entre ellas son próximas, pero no idénticas, es decir, no existe una colocalización de las dos proteínas, sugiriendo que en realidad están revelando componentes distintos sobre los cromosomas.

Dada la posición y el número de focos de DMC1 y MLH1, nos preguntamos si su localización podría estar relacionada con algún dominio cromosómico concreto. Para poder responder a esta pregunta realizamos una inmunodetección conjunta de MLH1 y proteínas centroméricas. En leptotene observamos los centrómeros de los cromosomas distribuidos por todo el núcleo, pero no hay señal de MLH1 (Figura 1.20A y A'). En zigotene en cambio se aprecia claramente que los focos de MLH1 que van apareciendo se sitúan asociados a los centrómeros, aunque no en todos los cromosomas (Figura 1.20B y B'). A partir de paquitene, la señal de MLH1 es más intensa y se localiza claramente asociada a los centrómeros de prácticamente todos los cromosomas, incluidos los cromosomas sexuales. En ocasiones la señales de MLH1 se visualizan como dos focos muy próximos (Figura 1.20C-D'), localizándose en paralelo al centrómero o entre medias de las dos señales centroméricas. En paquitene tardío quedan algunos puntos difusos de esta señal que terminan por desaparecer al final de la etapa (Figura 1.20E y E').

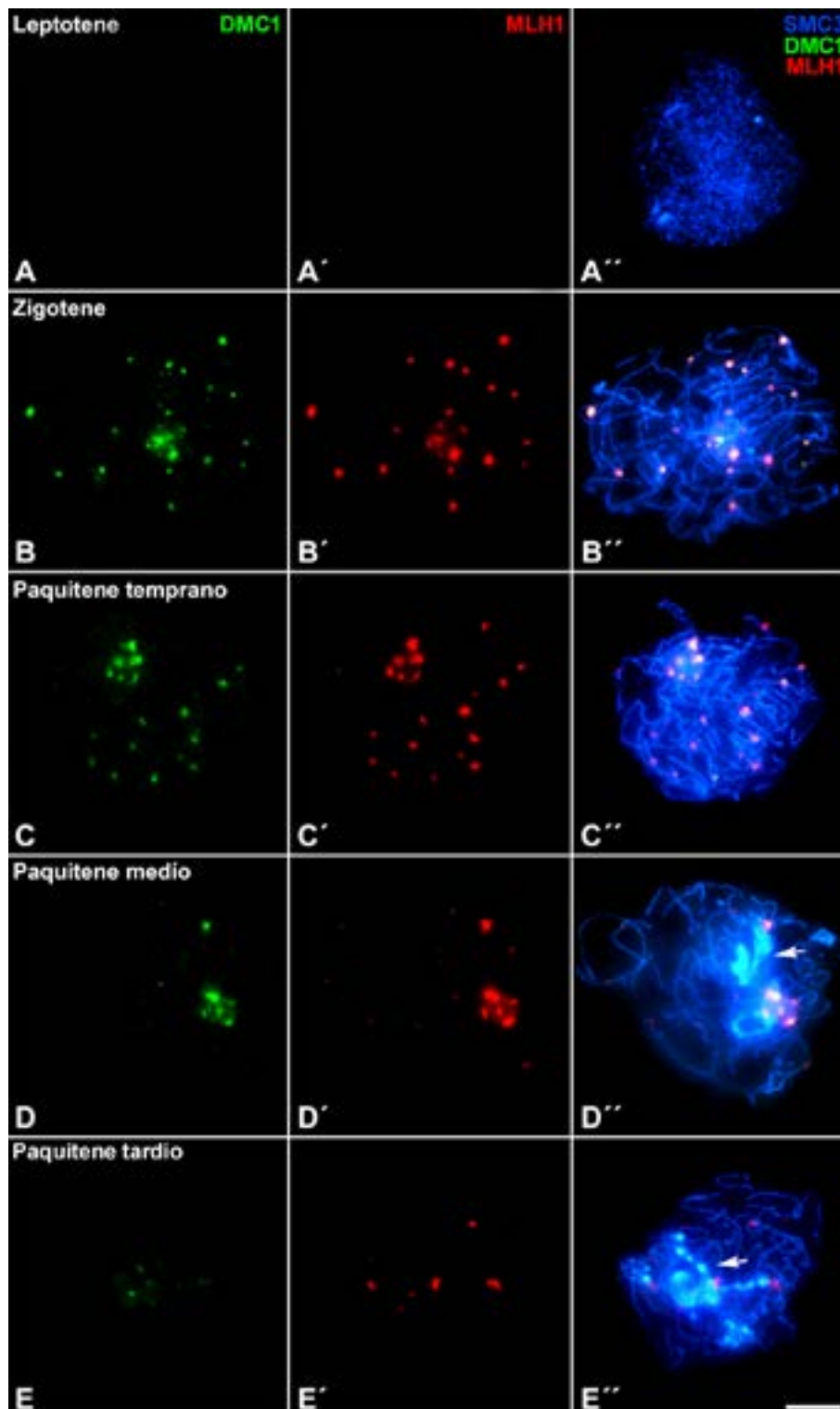


Figura 1.19. Patrón de localización de DMC1 y MLH1 durante la profase-I en ornitorrinco. Triple inmunolocalización de DMC1 (verde), MLH1 (rojo) y SMC3 (azul) en esparcidos de espermatocitos. **(A-A'')** Leptotene. DMC1 y MLH1 no son detectables. **(B-B'')** Zigotene. DMC1 aparece como grandes focos poco abundantes que coinciden con las señales de MLH1. **(C-C'')** Paquitene temprano. Muestran el mismo patrón de focos. **(D-D'')** Paquitene medio. Hay una disminución notable del número de focos. **(E-E'')** Paquitene tardío. DMC1 desaparece por completo y hay muy pocos focos de MLH1. La flecha indica los cromosomas sexuales con acumulación de SMC3. Barra de escala 10 μ m.

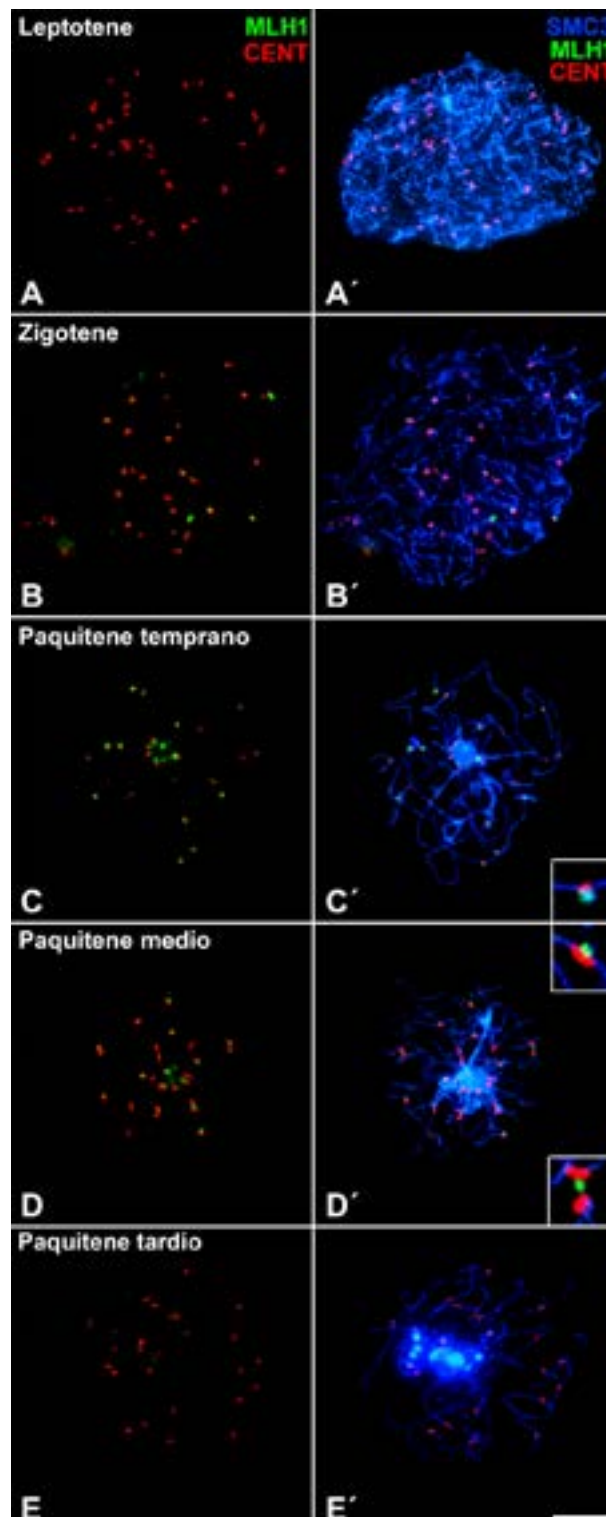


Figura 1.20. Localización de MLH1 y centrómeros en ornitorrinco. Triple inmunolocalización de MLH1 (verde), centrómero (rojo) y SMC3 (azul) en esparcidos de espermatocitos. **(A-A')** Leptotene. Los centrómeros se distribuyen homogéneamente por todo el núcleo, no hay señal de MLH1. **(B-B')** Zigotene. Aparecen focos de MLH1 próximos a los centrómeros. **(C-C')** Paquitene temprano. Cada foco de MLH1 se localiza unido a un centrómero (se muestra uno de ellos ampliado en el detalle). **(D-D')** Paquitene medio. La señal de MLH1 aparece próxima a la señal centromérica y también se localiza entre dos señales centroméricas de dos bivalentes (se muestran dos de ellos ampliados en el detalle). **(E-E')** Paquitene tardío. Hay muy pocos focos de MLH1 que terminan desapareciendo. Barra de escala 10 μ m.

1.5. Modificaciones epigenéticas

Una de las principales características de los cromosomas sexuales en mamíferos (tanto placentarios como marsupiales) es que durante la profase-I sufren un proceso de inactivación denominado MSCI. Esto se debe a que presentan una gran región diferencial entre ellos que no completa la sinapsis, lo cual desencadena una serie de modificaciones epigenéticas en los cromosomas sexuales que contribuyen a mantener silenciadas estas regiones ([Handel, 2004](#); [Hoyer-Fender, 2003](#); [Page et al., 2012](#)). Mientras estas regiones están inactivadas, en el resto del núcleo hay una actividad transcripcional intensa. En un estudio previo se ha demostrado que en la meiosis de ornitorrinco los cromosomas sexuales no están sujetos a este proceso de MSCI y no incorporan γ H2AX, unos de los principales marcadores epigenéticos de este fenómeno ([Daish et al., 2015](#)). A fin de poder profundizar en la regulación de la transcripción en la meiosis de ornitorrinco y en la posible existencia de un fenómeno de MSCI, hemos analizado la distribución de la proteína RNA polimerasa-II como marcador de referencia para la actividad transcripcional, así como un conjunto de modificaciones de histonas. Algunas de ellas están relacionadas con la activación de la transcripción, como la histona H3 acetilada en la lisina 9 (H3K9ac), mientras que otras intervienen en procesos de inactivación como γ H2AX o histona H3 di- o tri-metilada en la lisina 9 (H3K9me2 y H3K9me3). La localización de estas proteínas se ha estudiado mediante la inmunolocalización conjunta de la SMC3, como indicador de las etapas durante la profase-I.

En primer lugar, se analizó la distribución de la proteína RNA polimerasa-II. Hemos encontrado que esta proteína es detectable en el núcleo desde etapas tempranas de la profase-I, tanto en leptotene (Figura 1.21A-A''; B-B'') como en zigotene (Figura 1.21B-B''). La señal es tenue y difusa, distribuida por todo el núcleo, aunque se intensifica en determinados puntos. A partir de paquitene temprano (Figura1.21C-C'') se observa una mayor intensidad de la señal. La proteína sin embargo no aparece distribuida uniformemente, sino que se acumula de manera más intensa a lo largo de algunos bivalentes, o en puntos específicos de los mismos, así como sobre el nucleolo. Este mismo patrón se mantiene durante paquitene medio (Figura1.21D-D'') y tardío (Figura1.21E-E''). En ningún caso se observa claramente que la región ocupada por los cromosomas sexuales aparezca excluida específicamente del marcaje de RNA polimerasa-II.

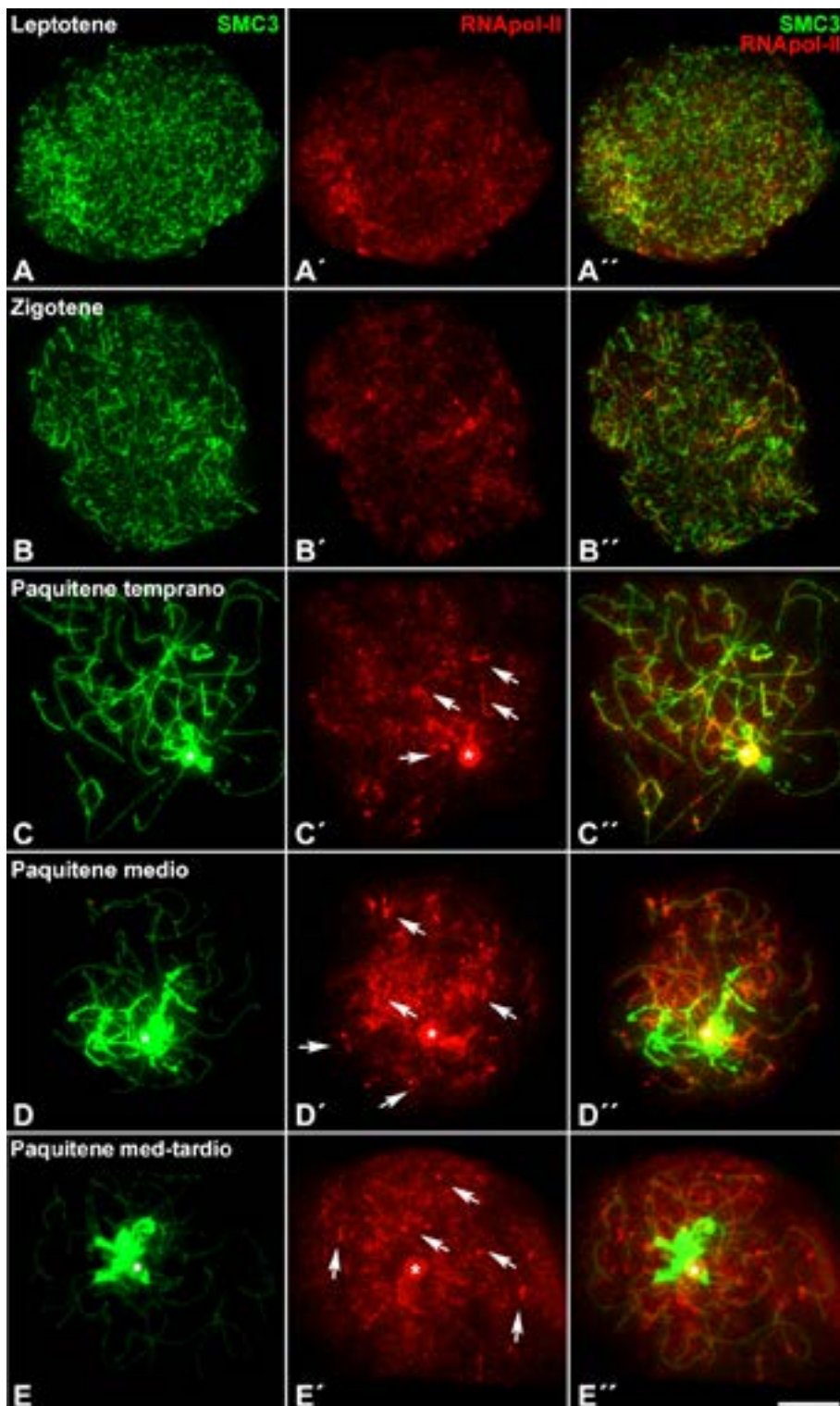


Figura 1.21. Análisis del patrón de la actividad transcripcional en ornitorrinco. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y RNA polimerasa-II (rojo) en espermátidos de espermatocitos. En leptotene (A-A'') y zigotene (B-B'') la señal de RNA polimerasa-II aparece por todo el núcleo de manera tenue y difusa. En paquitene temprano (C-C'') se produce un ligero incremento de la intensidad de la señal y se aprecia como la proteína se acumula a lo largo de algunos segmentos de cromosomas específicos (flechas) y el nucleolo (asterisco). En paquitene medio (D-D'') y medio-tardío (E-E'') el patrón se mantiene de manera similar. Barra de escala 10 μ m.

Para corroborar el patrón de la actividad transcripcional revelado por RNA polimerasa-II se estudió el patrón de H3K9ac, que es una marca epigenética habitualmente relacionada con la actividad transcripcional (Figura 1.22). Encontramos un patrón muy similar, aunque no idéntico. H3K9ac aparece distribuida por todo el núcleo de forma uniforme desde etapas tempranas hasta paquitene tardío. En este caso no hay una gran diferencia en la intensidad del marcaje entre leptotene (Figura 1.22A-A''), zigotene (Figura 1.22B-B'') y las diferentes subetapas de paquitene (Figura 1.22C-E''). Solamente se pudo apreciar que a diferencia de la RNA polimerasa-II, H3K9ac no se detecta en la región del nucleolo, algo esperable, ya que esta estructura es pobre en cromatina. Los cromosomas sexuales, al igual que en el caso de la RNA polimerasa-II, no aparecen específicamente excluidos del marcaje con esta histona.

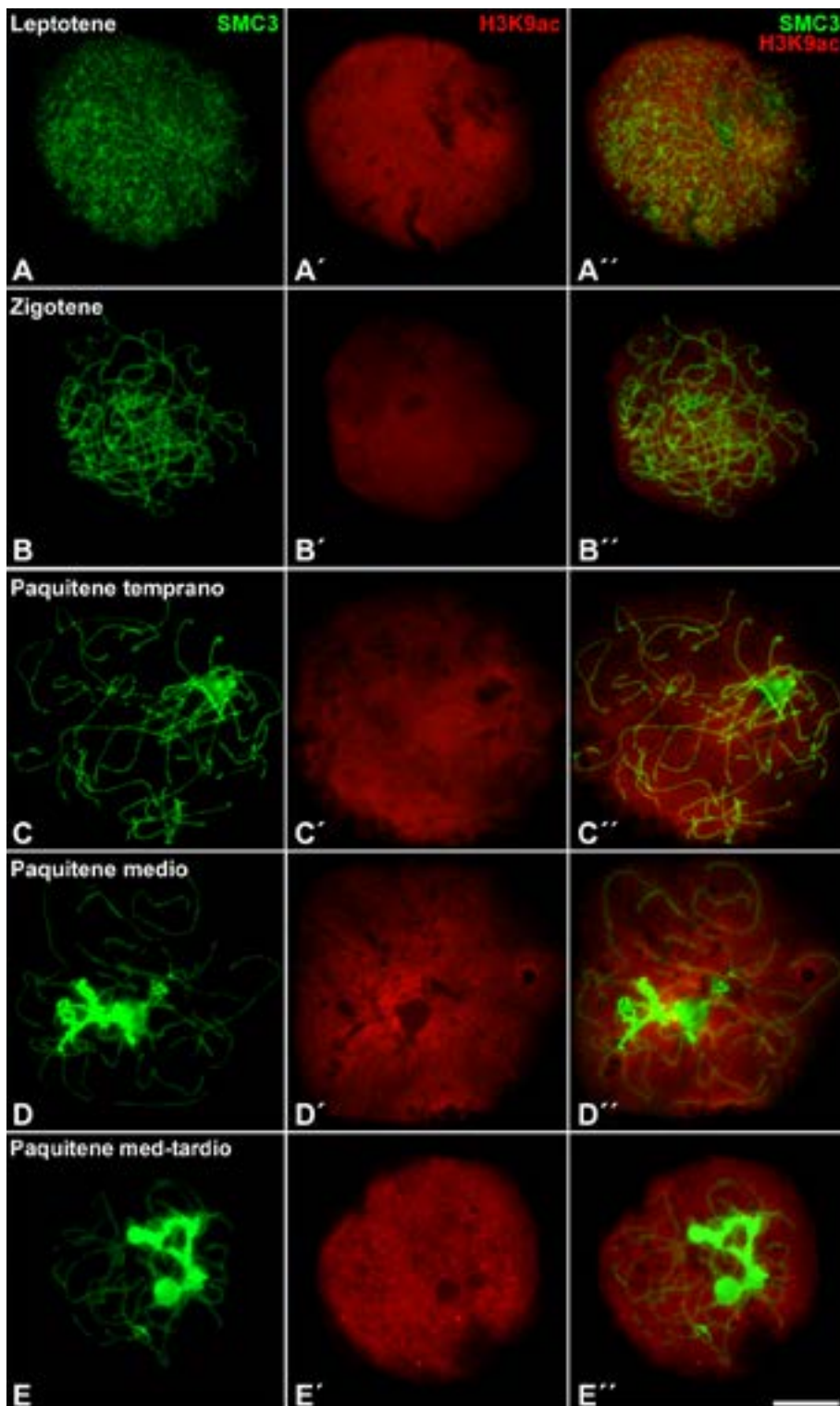


Figura 1.22. Distribución de la histona H3K9ac durante la profase-I en ornitorrinco. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y H3K9ac (rojo) en esparcidos de espermatocitos. (A-A'') Leptotene. (B-B'') Zigotene. (C-C'') Paquitene temprano. (D-D'') Paquitene medio. (E-E'') Paquitene medio-tardío. H3K9ac aparece desde etapas tempranas hasta etapas tardías de la profase-I de forma homogénea en todo en núcleo. Se ausenta de la región del nucleolo pero no de la región donde aparecen los cromosomas sexuales. Barra de escala 10 μ m.

En relación a los marcadores relacionados con la represión de la actividad transcripcional, y específicamente al fenómeno de MSCI, una de las proteínas más relevantes para su estudio es γ H2AX. Se trata de la forma de la histona H2AX fosforilada en la serina 129. Esta fosforilación se produce en la cascada de señalización del daño del DNA y es uno de los principales factores implicados en la formación del cuerpo sexual y por lo tanto en desencadenar y mantener el proceso MSCI ([Mahadevaiah et al., 2001](#); [Turner et al., 2004](#)). En un estudio previo se había reportado que los cromosomas sexuales del ornitorrinco no presentan señal de γ H2AX y se concluyó que en estos cromosomas no ocurre el fenómeno de MSCI típico de los cromosomas sexuales en mamíferos placentarios y marsupiales ([Daish et al., 2015](#)). A fin de corroborar estos resultados, en nuestro estudio hemos empleado dos anticuerpos diferentes contra γ H2AX. En ninguno de los dos casos hemos podido encontrar una señal clara de esta proteína a lo largo de la primera división meiótica, no ya en los cromosomas sexuales, sino en general en los espermatoцитos primarios. Este resultado es sorprendente e indica que la ruta de señalización de daño en el DNA, en esta especie no transcurre por la vía de fosforilación de H2AX, un mecanismo que está altamente conservado en la evolución, desde levaduras a plantas y animales. También se intentó localizar la respuesta al daño en el DNA utilizando un anticuerpo que reconoce epítomos fosforilados por ATM y ATR (de los cuales γ H2AX es una de las principales dianas) pero no se obtuvo señal alguna en la meiosis de ornitorrinco. Esto plantea diferentes interrogantes acerca ausencia de este marcador en la meiosis de ornitorrinco, pero no significa que no haya producción de DSBs (como queda patente por la localización de RPA y RAD51). Más bien pone de manifiesto una respuesta diferente a este daño.

Se continuó el estudio de la inactivación transcripcional analizando algunas modificaciones epigenéticas de la histona H3. La primera de ellas es H3K9me3, que en mamíferos euterios es un marcador típico de heterocromatina y además se acumula en el cuerpo sexual durante algunas etapas de la profase-I en ratón ([de Vries et al., 2012](#)). En ornitorrinco hemos observado que esta proteína se encuentra distribuida por todo el núcleo de manera uniforme desde etapas tempranas, tanto en leptotene como en zigotene (Figuras 1.23A-A'' y B-B'') y este patrón se mantiene inalterado en las diferentes subetapas de paquitene (Figuras 1.23C-C'', D-D'' y E-E''). No se aprecian acumulaciones destacables en ninguna de las regiones centroméricas de los cromosomas y tampoco sobre los cromosomas sexuales. Solamente se aprecia una ligera exclusión de esta marca sobre el nucleolo.

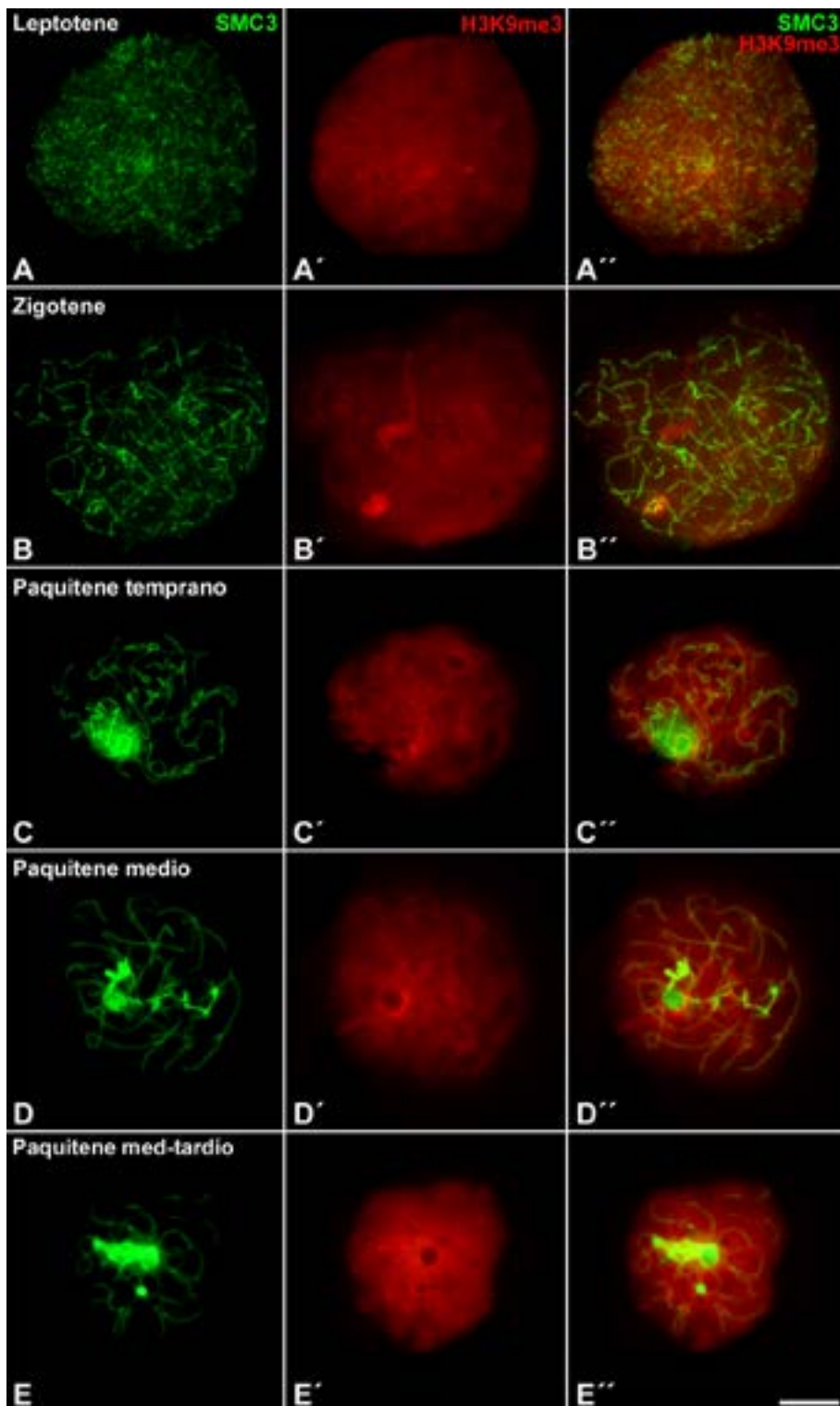


Figura 1.23. Distribución de la histona H3K9me3 durante la profase-I en ornitorrinco. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y H3K9me3 (rojo en esparcidos de espermatoocitos. (A-A'') Leptotene. (B-B'') Zigotene. (C-C'') Paquitene temprano. (D-D'') Paquitene medio. (E-E'') Paquitene medio-tardío. H3K9me3 aparece desde etapas tempranas hasta etapas tardías de la profase-I de forma homogénea en todo en núcleo. Se ausenta de la región del nucleolo. Barra de escala 10 μ m.

Por último, se estudió el patrón de H3K9me2, que al igual que H3K9me3, es una marca epigenética de carácter represivo. H3K9me2 aparece de forma muy tenue en la etapa de leptotene (Figura 1.24A-A'') pero en zigotene la señal se incrementa (Figura 1.24B-B''). En paquitene temprano H3K9me2 aparece ya de manera intensa (Figura 1.24C-C''). La señal se acumula preferencialmente alrededor de los ECos de todos los cromosomas. En paquitene temprano-medio, se observa que la intensidad de señal de la histona disminuye en el núcleo, pero tiende a acumularse sobre las regiones asinápticas de los cromosomas sexuales y los autosomas (Figura 1.24D-D''). La acumulación de H3K9me2 sobre los cromosomas sexuales permanece claramente visible hasta paquitene tardío (Figura 1.24E-E'') a medida que la señal se va haciendo más débil en el conjunto del núcleo. Por tanto, aunque los cromosomas sexuales en ornitorrinco carecen de la mayoría de las modificaciones epigenéticas relacionadas con MSCI encontradas en otros mamíferos, principalmente en ratón, sí muestran algunas características distintivas, posiblemente relacionadas con la presencia de regiones asinápticas.

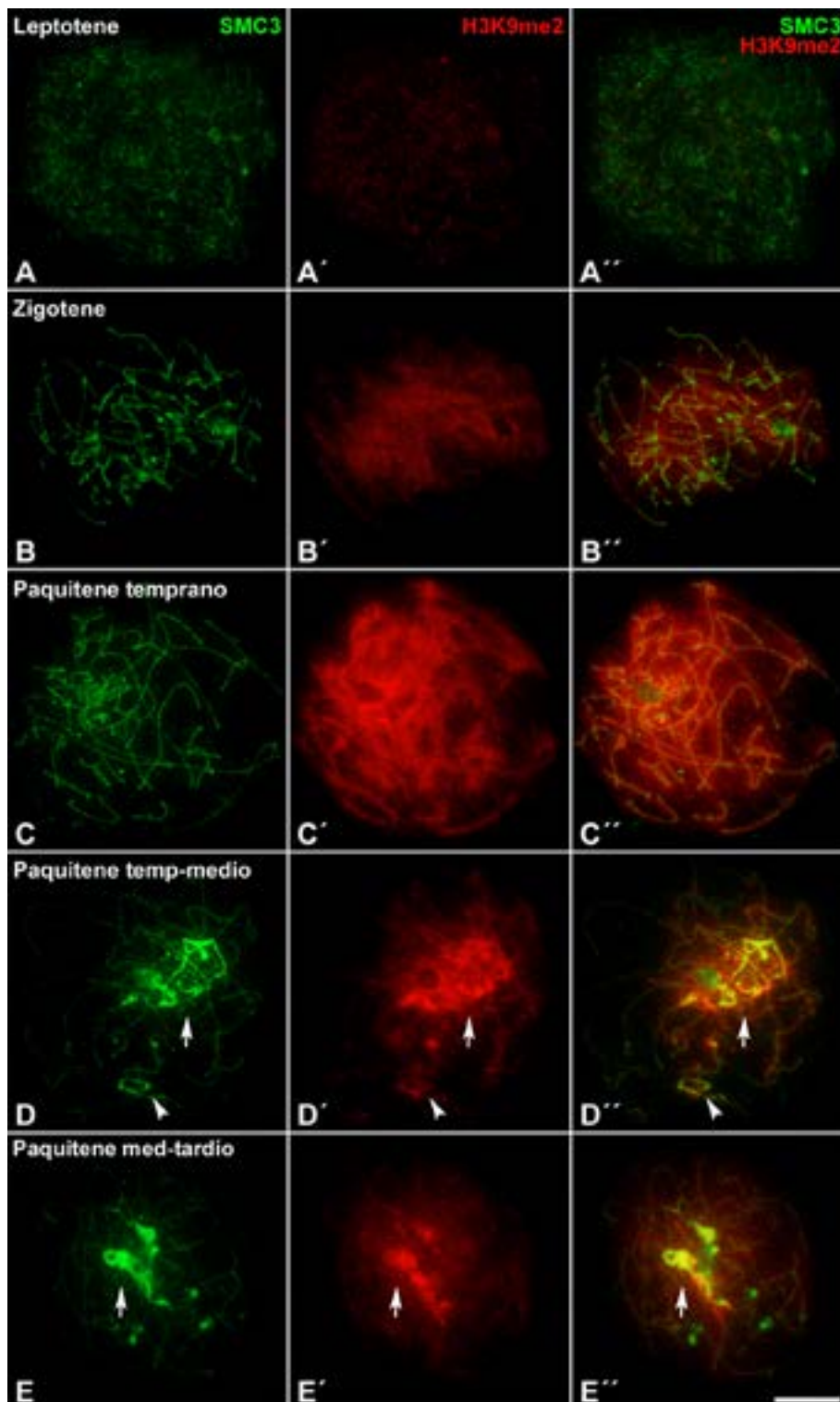


Figura 1.24. Distribución de la histona H3K9me2 durante la profase-I en ornitorrinco. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y H3K9me2 (rojo) en esparcidos de espermatocitos. **(A-A'')** Leptotene. La señal de H3K9me2 se muestra tenue en todo el núcleo. **(B-B'')** Zigotene. La señal de la histona se intensifica pero de manera poco específica. **(C-C'')** Paquitene temprano. H3K9me2 se incrementa por todo el núcleo y parece seguir la trayectoria de prácticamente todos los cromosomas. **(D-D'')** Paquitene temprano-medio. La señal se atenúa en todo el núcleo, pero se concentra en las regiones asinápticas de los cromosomas sexuales (flecha) y los autosomas (punta de flecha). **(E-E'')** Paquitene medio-tardío. H3K9me2 permanece más intensa sobre la región de la cadena cromosómica de los sexuales (flecha). Se ausenta de la región del nucleolo. Barra de escala 10 μ m.



Equidna de hocico corto

Tachyglossus aculeatus (Tachyglossidae)

Fotografía tomada en Healesville Sanctuary (Healesville, Victoria, Australia)

“Pensaron que estaba loca, absolutamente loca”

Barbara McClintock (1902-1992)

2

Comportamiento meiótico de los cromosomas del equidna

En este segundo apartado se realizará el estudio de una segunda especie de monotremas, el equidna de hocico corto (*Tachyglossus aculeatus*), que presenta un número cromosómico $2n = 63$, con 27 bivalentes y 9 cromosomas sexuales (5X y 4Y) (Rens et al., 2007). En relación a esta especie no existen estudios previos sobre la meiosis, de modo que se realizó un análisis completo de los procesos específicos de la meiosis, aunque limitado por la disponibilidad de anticuerpos contra las proteínas de esta especie. En este apartado se intentará explicar la dinámica de los cromosomas en el equidna y se mostrarán las principales diferencias con el ornitorrinco, especialmente en lo relativo a los cromosomas sexuales.

2.1. Progresión de la sinapsis durante la profase-I

Siguiendo la dinámica del capítulo anterior, se ha estudiado la secuencia de apareamiento y sinapsis de los cromosomas durante la profase-I. Para ello tomamos nuevamente la cohesina SMC3 como patrón de referencia para poder localizar los ECos que se ensamblan a lo largo de los cromosomas. Para facilitar la comprensión del proceso de sinapsis se realizó una doble inmunolocalización con la proteína SYCP1.

La proteína SMC3 se observa al comienzo de la profase-I en leptotene como finos filamentos discontinuos distribuidos ampliamente por todo el núcleo, indicando el inicio de la formación de los ECos en los cromosomas (Figura 2.1A). Además, en esta etapa no es detectable la señal de SYCP1 (Figura 2.1A'). A partir de zigotene temprano, la señal de SMC3 se aprecia como filamentos más largos y continuos (Figura 2.1B), correspondiendo con las regiones donde se muestra SYCP1, indicando de esta forma el inicio de la sinapsis en algunas regiones del núcleo. Sin embargo, hay determinadas regiones donde solo hay señal de SMC3, que corresponden a las regiones que aún no han iniciado la sinapsis (Figura 2.1B' y B''). En una etapa un poco más avanzada, zigotene tardío, se observa una proporción de cromosomas sinapsados mayor que en la etapa anterior, mostrando filamentos largos y continuos con señal de ambas proteínas (Figura 2.1C-C'').

La siguiente etapa corresponde al paquitene, que queda definida cuando la sinapsis es máxima en los cromosomas. Los ECos se muestran continuos y homogéneos, entremezclados entre sí, pero distribuidos por todo el núcleo y se aprecia una colocalización de las proteínas SMC3 y SYCP1 en la mayoría de los cromosomas (Figura 2.1D). Hay varias regiones que no muestran SYCP1, indicando que la sinapsis no se llega a completar en algunos cromosomas (Figura 2.1D'), que aparecen distribuidos extensamente por todo el núcleo y mezclados con el resto de los cromosomas que sí han sinapsado. Estos cromosomas presentan una morfología similar al resto de autosomas,

siendo difícil de distinguir sin la presencia de SYCP1 (Figura 2.1D''). De acuerdo a la caracterización del cariotipo previamente publicada (Rens et al., 2007), el equidna presenta en sus cromosomas sexuales grandes regiones sin homología, donde es de esperar que no puedan completar la sinapsis. Por esto, y siguiendo los resultados previos obtenidos en el primer apartado, podemos interpretar que estas regiones asinápticas extendidas por todo el núcleo corresponderían a la cadena de cromosomas sexuales.

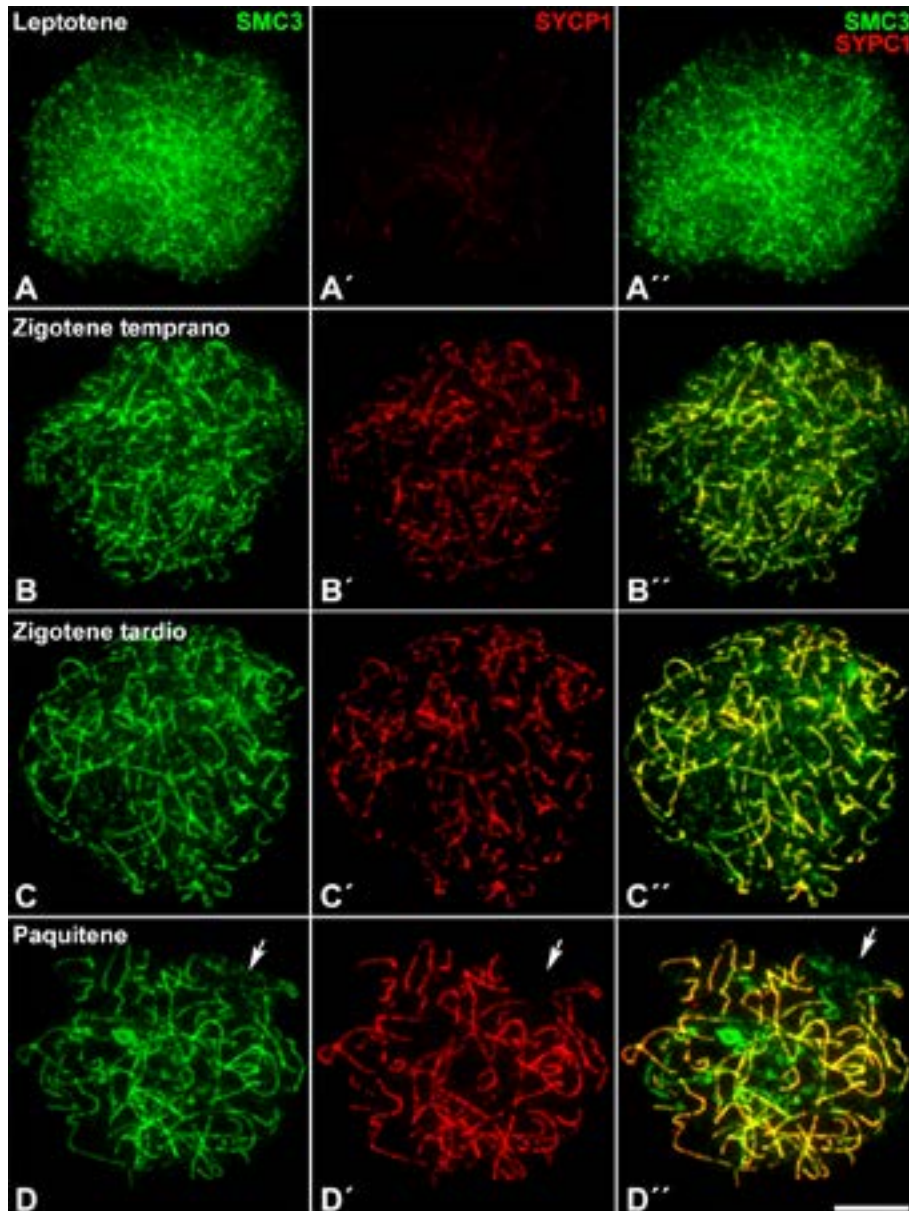


Figura 2.1. Secuencia sináptica de los cromosomas homólogos en equidna. Doble inmunolocalización de las proteínas SMC3 (verde) y SYCP1 (rojo) en espermátocitos. (A-A'') Leptotene. Los ECos se observan como filamentos finos y cortos en el núcleo. No hay señal de SYCP1. (B-B'') Zigotene temprano. Los ECos se muestran más continuos. Comienza a observarse la señal de SYCP1 en algunos cromosomas. (C-C'') Zigotene tardío. Se observan los ECos más continuos y hay un aumento de la señal de SYCP1, que aparece ya en la mayoría de los cromosomas homólogos. La mayoría de cromosomas presenta una doble señal de las proteínas. No obstante, quedan regiones donde no se ha completado el proceso de sinapsis, marcadas exclusivamente con SMC3. (D-D'') Paquitene. Se completa la sinapsis en todos los autosomas y quedan excluidas algunas regiones asinápticas que no incluyen SYCP1, correspondientes a los cromosomas sexuales (flecha). Barra de escala 10 μ m.

La característica más notable que hace distinción con el ornitorrinco, es que en el equidna no hay cambios morfológicos remarcables en los ejes cromosómicos, ni acumulaciones de cohesinas en la cadena de cromosomas sexuales como sí observábamos claramente en el ornitorrinco (Figura 2.1D). Esto dificultó la división del paquitene en diferentes subetapas. Por lo tanto, se ha considerado como una única etapa, caracterizada por la sinapsis completa entre los autosomas y la ausencia de SYCP1 (putativamente) sobre los cromosomas sexuales.

Etapas más tardías de profase-I de paquitene en adelante no se pudo estudiar con claridad el proceso de desinapsis de los cromosomas homólogos (ver apartado 2.2.1).

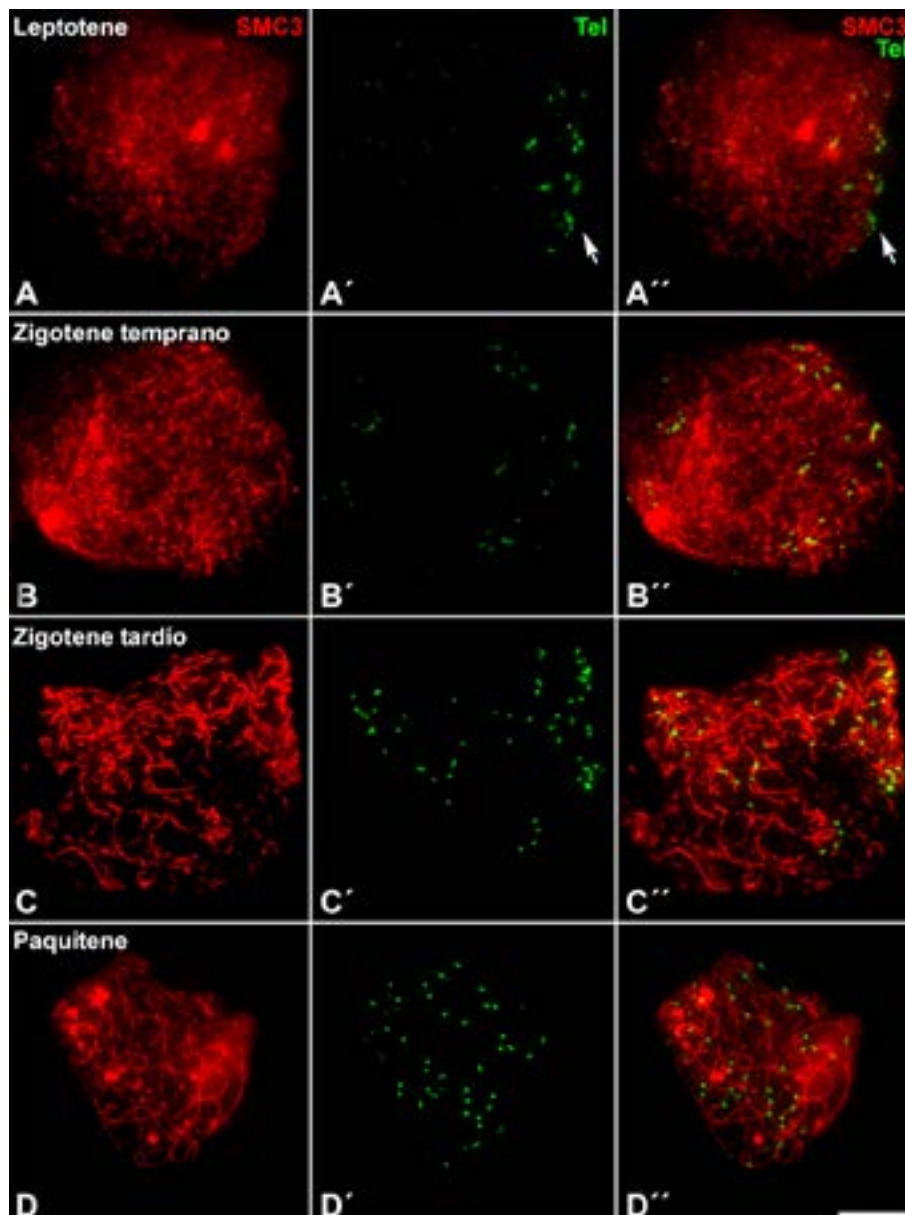


Figura 2.2. Localización de secuencias teloméricas en equidna. Inmunolocalización de SMC3 (rojo) e hibridación de secuencias teloméricas (verde) en esparcidos de espermatocitos. **(A-A'')** Leptotene. Polarización de la mayoría de los telómeros en una región concreta de la envoltura nuclear. **(B-B'')** Zigotene temprano. Extensión del área de la envoltura nuclear donde se disponen los telómeros. **(C-C'')** Dispersión progresiva de los telómeros en diferentes regiones del núcleo. **(D-D'')** Paquitene. Completada la sinapsis la polarización en bouquet se pierde por completo. Barra de escala 10 μ m.

En la mayoría de mamíferos durante la transición entre leptotene y zigotene, los extremos de los cromosomas se localizan juntos en un punto de la EN, dando lugar a una organización en bouquet (Zickler and Kleckner, 1998). En algunas células se ha llegado a intuir una polarización de los extremos de los ECos, aunque no se ha podido demostrar solo con el marcaje de SMC3. A fin de distinguir esta configuración en los espermatocitos de equidna, se realizó una hibridación *in situ* con una sonda específica de telómero. Los resultados muestran que están concentrados en una región del núcleo (Figura 2.2A'), mostrándose una polarización parecida al bouquet, aunque ligeramente dispersa. En zigotene temprano la polarización es aparentemente más desorganizada, ya que los extremos no se concentran en una misma región nuclear. (Figura 2.2B-B'). En zigotene tardío, se muestra cómo esta estructura se va desorganizando quedando menos telómeros agrupados (Figura 2.2C-C'). Esto indica que, al igual que en otras especies de mamíferos, la configuración de bouquet es transitoria y a medida que progresa la sinapsis, los extremos de los cromosomas se desplazan, apartándose de dicha zona. Conforme avanzamos a paquitene, los telómeros adquieren una distribución uniforme por todo el núcleo (Figura 2.2D-D').

2.2. Comparación del patrón de distribución de cohesinas durante la profase-I

De modo análogo al ornitorrinco, se estudió la distribución de diferentes cohesinas a lo largo de la profase-I. En primer lugar, se ha estudiado la localización de las dos isoformas de la proteína SMC1: SMC1 α y SMC1 β . Ambas isoformas muestran un patrón similar entre sí y a su vez con SMC3. En leptotene se aprecian puntos y filamentos cortos y finos (Figura 2.3D). En zigotene comienza la asociación física entre los cromosomas homólogos, cuyos ECos se muestran como filamentos más largos y definidos (Figura 2.3E), hasta que se hacen continuos en paquitene (Figura 2.3F). SMC1 por tanto no muestra diferencias morfológicas entre los cromosomas, siendo nuevamente indistinguibles los cromosomas sexuales con este marcaje.

A continuación, se han estudiado STAG3 y REC8, que, al igual que SMC1 β , son específicas de meiosis. La distribución es similar al resto de cohesinas previamente analizadas. En las etapas de leptotene se muestra el inicio de la formación de los ECos como finos filamentos (Figura 2.3G-J). La etapa de zigotene se caracteriza por la asociación por parejas de los ECos, dando lugar a ejes más gruesos en las regiones cromosómicas sinapsadas (Figura 2.3H-K). La sinapsis completa de los homólogos se produce en paquitene y se observan ECos continuos y entrelazados por todo el núcleo (Figura 2.3I-L). Con estas cohesinas tampoco hay una diferencia citológica que permita localizar los cromosomas sexuales.

Las cinco cohesinas estudiadas (SMC3, SMC1 α , SMC1 β , STAG3 y REC8) muestran un patrón de distribución a lo largo del eje cromosómico muy similar, sin diferencias remarcables entre ellas, siendo indistinguible la localización precisa de los cromosomas sexuales. Sin embargo, la ausencia

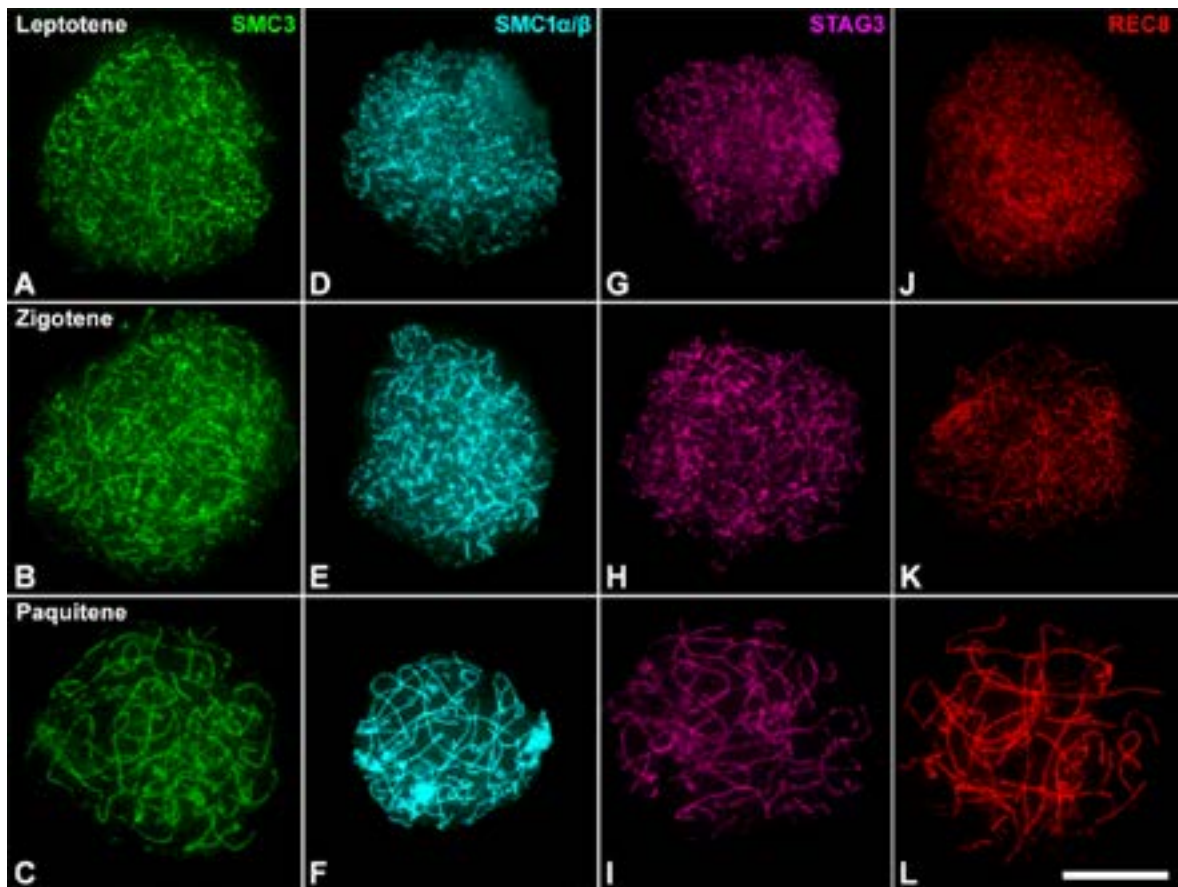


Figura 2.3. Distribución de las cohesinas durante la profase-I en equidna. Inmunolocalización de cinco cohesinas diferentes, SMC3 (verde), SMC1 α y SMC1 β (cian), STAG3 (magenta), REC8 (rojo) en esparcidos de espermatocitos. (A, D, G y J) Leptotene. Las cohesinas forman filamentos uniformes distribuidos por todo el núcleo. (B, E, H y K) Zigotene. Los filamentos comienzan a asociarse en las zonas de sinapsis. (C, F, I y L) Paquitene. Se completa la sinapsis y los ejes se vuelven continuos. No se aprecian diferencias en los patrones de distribución de las diferentes cohesinas. Barra de escala 10 μ m.

de acumulaciones de cohesinas sobre las regiones asinápticas de la cadena de cromosomas sexuales o los autosomas es una diferencia relevante con lo previamente descrito en ornitorrinco.

2.2.1. Localización de las cohesinas en etapas tardías de la primera profase meiótica

Las etapas tardías de la profase-I, de diplotene en adelante, son muy escasas en las preparaciones, probablemente por ser muy rápidas, por ello ha sido imposible analizar los procesos de estas etapas, como la desinapsis o la segregación de los cromosomas. En las pocas células que se han podido analizar, se aprecia una condensación de la cromatina (Figura 2.4A'') y una ordenación de los cromosomas en forma estrellada. Estas células podrían encontrarse en una etapa de diacinesis-prometáfase-I, atendiendo a su grado de condensación. Todas las cohesinas muestran un patrón similar, localizándose en el interior de la cromatina. Nuevamente, los cromosomas sexuales son indistinguibles en esta etapa. En esta especie tampoco se han podido identificar las células en etapas más avanzadas de la meiosis.

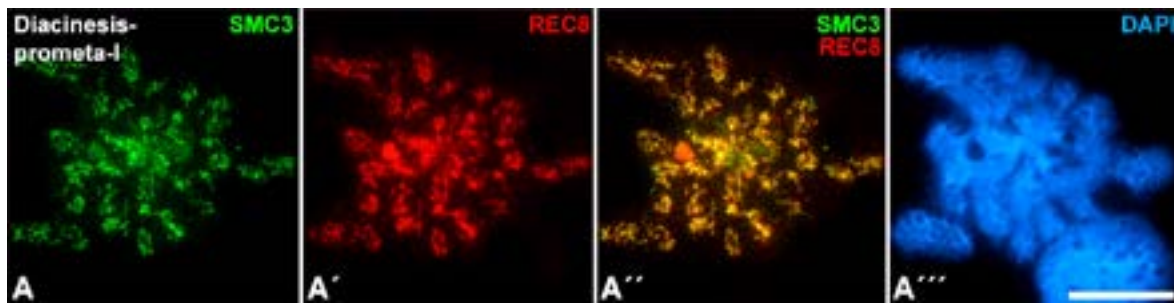


Figura 2.4. Distribución de cohesinas en etapas tardías de la profase-I en equidna. Doble inmunolocalización de las cohesinas SMC3 (verde), REC8 (rojo) y tinción de cromatina con DAPI (azul) en esparcidos de espermatocitos. (A-A''') Diacinesis-prometáfase-I. (A-A') Localización de las SMC3 y REC8 en interior de la cromatina. (A'') Colocalización de ambas cohesinas indicando un patrón similar. (A''') Estructura de la cromatina condensada. Barra de escala 10 μm .

2.3. Análisis del complejo sinaptonémico en equidna

La dinámica de ensamblaje del CS es totalmente desconocida en esta especie. En una primera aproximación utilizamos los diferentes anticuerpos comerciales para intentar localizar los componentes de los EAs, pero no obtuvimos resultados consistentes. A fin de poder abordar este estudio, se utilizaron los anticuerpos generados frente a las diferentes isoformas de SYCP3 de ornitorrinco. Los resultados fueron positivos, aunque los anticuerpos dan una la señal más tenue que la encontrada en el ornitorrinco.

En primera instancia, se realizó una doble inmunolocalización de SMC3 para seguir el ECo, junto a las dos primeras isoformas de SYCP3 de ornitorrinco (SYCP3 y SYCP3-like), ya que ambas muestran el mismo patrón. Podemos observar que en leptotene (Figura 2.5A) no se aprecia marcaje con los anticuerpos contra SYCP3 y SYCP3-like, indicando que no se ha iniciado aún la formación de los EAs, o que al menos estas proteínas no se han incorporado a esta estructura (Figura 2.5A'). En zigotene, comprobamos que aparece una tenue señal discontinua de SYCP3 y SYCP3-like, localizándose en su mayoría en los segmentos de los cromosomas que han iniciado la sinapsis. Por último, en paquitene podemos comprobar que la señal de los anticuerpos contra SYCP3 y SYCP3-like se incorporan a toda la longitud de los bivalentes (Figura 2.5C'), colocalizando prácticamente en su mayoría con SMC3, aunque cuando las dos señales se muestran de forma simultánea, el marcaje de SMC3 es mucho más intenso que SYCP3 y SYCP3-like (Figura 2.5C''). Por otro lado, hay algunas regiones cromosómicas en que el marcaje con SMC3 no parece ir acompañado de marcaje con los anticuerpos contra SYCP3 y SYCP3-like. Es posible que estas regiones correspondan con cromosomas que no han completado la sinapsis y aunque no es posible distinguirlos con seguridad, parte de estas regiones correspondan putativamente a los cromosomas sexuales.

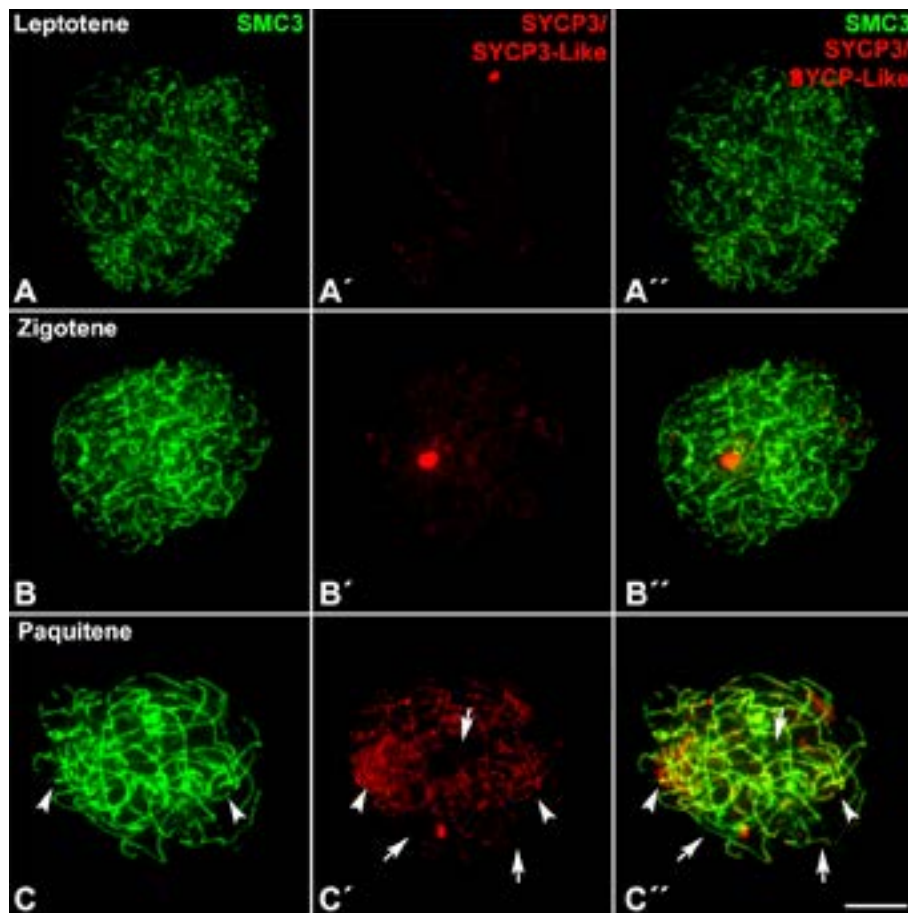


Figura 2.5. Marcaje con anticuerpos contra las proteínas SYCP3 y SYCP3-like de ornitorrinco durante la profase-I en equidna. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y SYCP3 y SYCP3-like (rojo) en esparcidos de espermatocitos. (A-A'') Leptotene. Ausencia de SYCP3/SYCP3-like cuando se empiezan a formar los ECos. (B-B'') Zigotene. Comienzo de la sinapsis y formación sutil del SC. (C-C'') Paquitene. Los cromosomas aparecen sinapsados y la señal de SYCP3 y SYCP3-like es continua a lo largo los ejes cromosómicos, correspondiendo a la formación del CS (punta de flecha), mientras que en las regiones de los asinápticas de los cromosomas sexuales no hay señal de SYCP3/SYCP3-like (flecha). Barra de escala 10 μm .

Con el fin de obtener más detalles sobre la organización del CS se llevó a cabo el marcaje con el anticuerpo contra la isoforma de SYCP3-Y del ornitorrinco de manera conjunta con SMC3. En etapas tempranas de la profase-I no se observa señal del anticuerpo anti-SYCP3-Y, dato que concuerda con las otras dos isoformas y con un retraso en la formación de los EAs (Figura 2.6A'). En zigotene temprano se observa una señal muy débil (Figura 2.6B') que se hace un poco más intensa en la etapa de zigotene tardío, cuando los filamentos marcados con SMC3 se hacen más largos y continuos (Figura 2.6C). Se observan dos tipos de señal, una más tenue en la mayoría de los cromosomas y otra más intensa en algunos cromosomas (Figura 2.6C'). Este marcaje diferencial de unos pocos cromosomas se mantiene en paquitene (Figura 2.6D, D' y E, E').

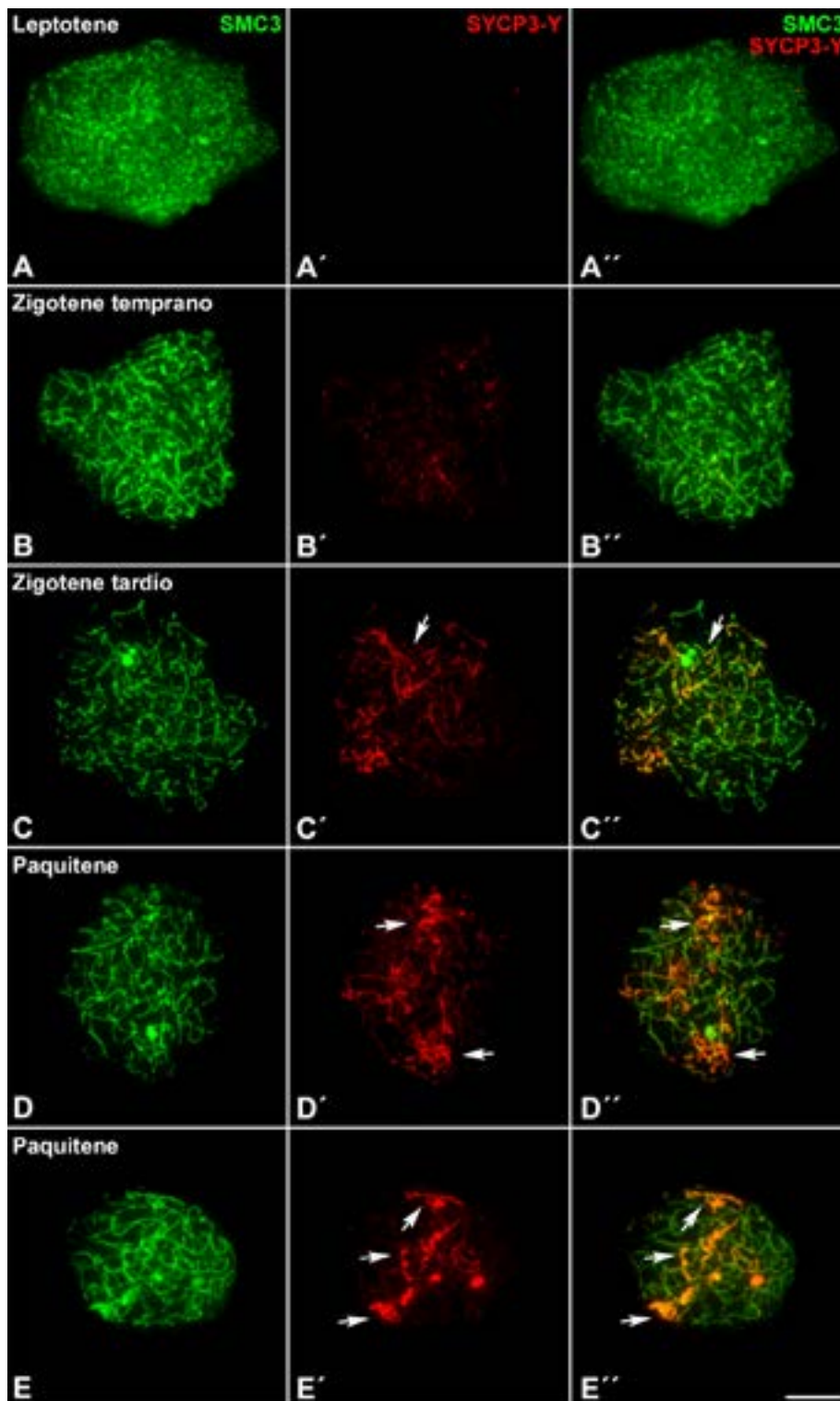


Figura 2.6. Marcaje con el anticuerpo contra la isoforma SYCP3-Y de ornitorrinco durante la profase-I en equidna. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y SYCP3-Y (rojo) en esparcidos de espermatocitos. **(A-A'')** Leptotene. SMC3 se encuentra como focos dispersos y no hay señal de SYCP3-Y. **(B-B'')** Zigotene temprano. Comienza la sinapsis y SMC3 se muestra más continua en dichas regiones. Se observa tenuemente un marcaje con el anticuerpo contra SYCP3-Y. **(C-C'')** Zigotene tardío. Los ECos son más continuos, la señal SYCP3-Y se muestra tenue en los autosomas y se intensifica en algunos cromosomas. Paquitene **(D-D'' y E-E'')**. La sinapsis es completa en los autosomas donde la señal de SYCP3-Y es tenue. Algunas regiones cromosómicas quedan marcadas más intensamente con esta proteína (flecha). Barra de escala 10 μ m.

Dado que en ornitorrinco el marcaje de SYCP3-Y se localizaba fundamentalmente sobre las regiones asinápticas de los autosomas y los cromosomas sexuales, nos preguntamos si esta circunstancia sería similar en el equidna. Para comprobar esta posibilidad se realizó la inmunolocalización de SYCP1 junto al marcaje con el anticuerpo contra SYCP3-Y. Los resultados obtenidos corroboran que en la etapa de paquitene, cuando se ha completado la sinapsis en los autosomas, la señal de SYCP3-Y más intensa corresponde a aquellas regiones cromosómicas donde no hay señal de SYCP1, es decir en regiones asinápticas. Asumiendo que los cromosomas sexuales deben mostrar largas regiones en asinapsis, estos resultados parecen indicar que el anticuerpo contra SYCP3-Y puede ser un marcador de la cadena de cromosomas sexuales. A la vista de estos resultados, la cadena cromosómica se extiende aparentemente mucho más que en el ornitorrinco. Nuevamente, dado que todos los cromosomas están muy enmarañados resulta imposible distinguir su recorrido (Figura 2.7).

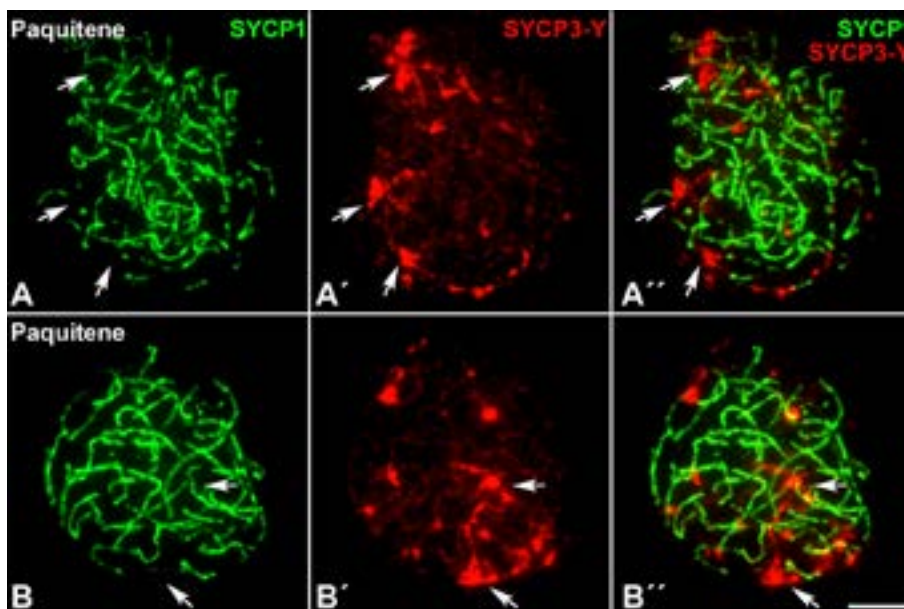


Figura 2.7. Doble inmunolocalización de SYCP1 (verde) y SYCP3-Y (rojo) en espermatocitos de equidna. En la etapa de paquitene el marcaje de SYCP1 es continuo sobre los ejes sinapsados (**A** y **B**) y la localización del anticuerpo contra SYCP3-Y se muestra intensa sobre aquellas regiones asinápticas, probablemente correspondientes a los cromosomas sexuales (flecha) (**A'** y **B'**), ambas proteínas muestran un patrón complementario (**A''** y **B''**). Barra de escala 10 µm.

2.4. Reparación del DNA

En el estudio de la reparación y recombinación del DNA en equidna, fue posible la caracterización de dos de las proteínas que intervienen en eventos de recombinación temprana. La proteína RPA está presente en etapas tempranas de la profase-I, con una gran cantidad de focos distribuidos por todo el núcleo en leptotene (Figura 2.8A-A''). En zigotene temprano se aprecia que se mantiene el número de focos de RPA sobre los ejes de los cromosomas (Figura 2.8B-B'') que tiende a descender en zigotene tardío (Figura 2.8C-C''). A partir de paquitene el número de focos de esta proteína disminuye hasta desaparecer casi en su totalidad.

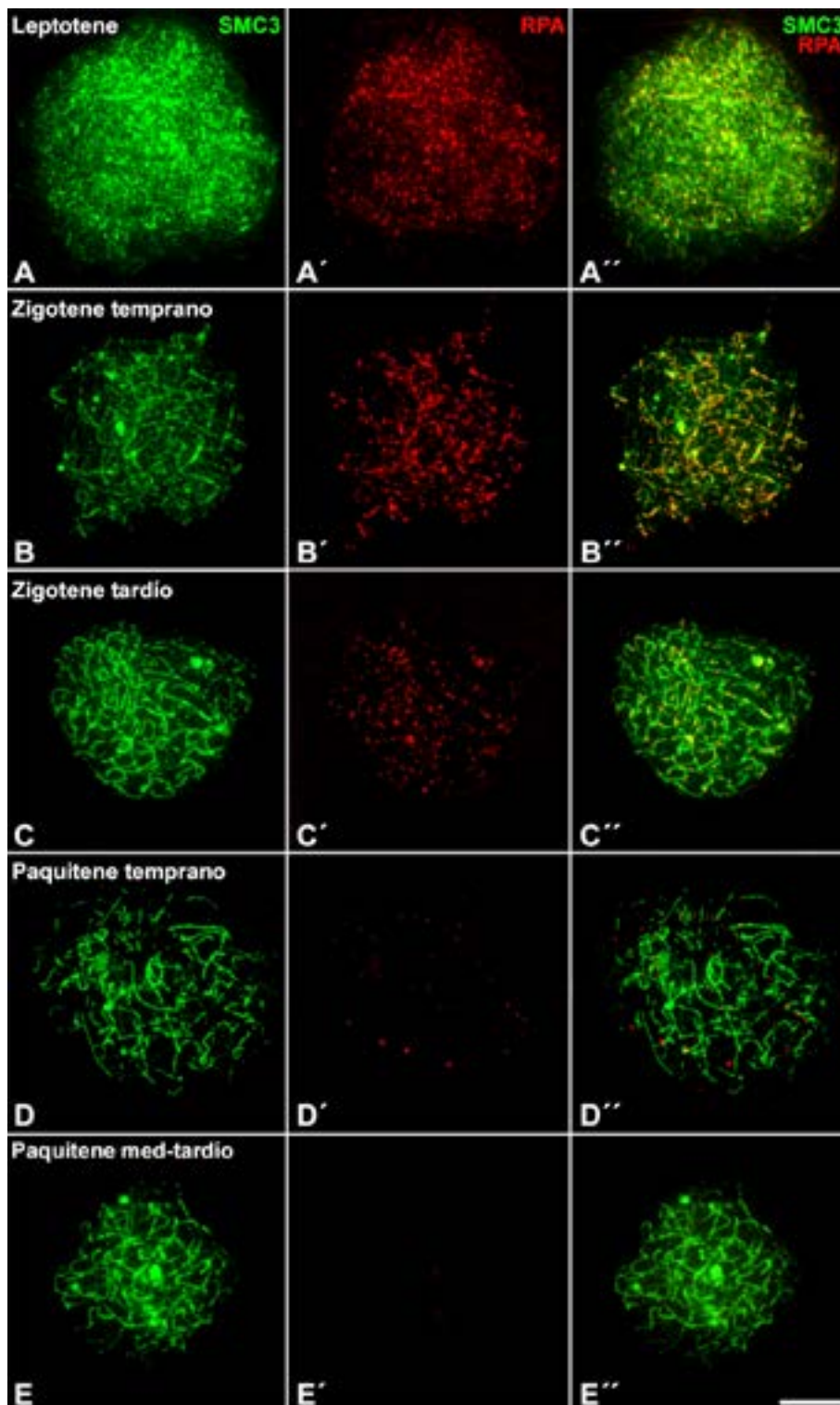


Figura 2.8. Distribución de RPA durante la profase-I en equidna. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y RPA (rojo) en esparcidos de espermatocitos. **(A-A'')** Leptotene. Los focos de RPA se distribuyen sobre los ECos por todo el núcleo. **(B-B'')** Zigotene temprano. Se mantiene una gran cantidad de focos de RPA. **(C-C'')** Zigotene tardío. Se produce una disminución de focos de RPA. **(D-D'')** Paquitene temprano. RPA prácticamente ha desaparecido del núcleo, aunque se siguen observando algunos focos dispersos. **(E-E'')** Paquitene medio-tardío. Los focos de RPA han desaparecido completamente. Barra de escala 10 μ m.

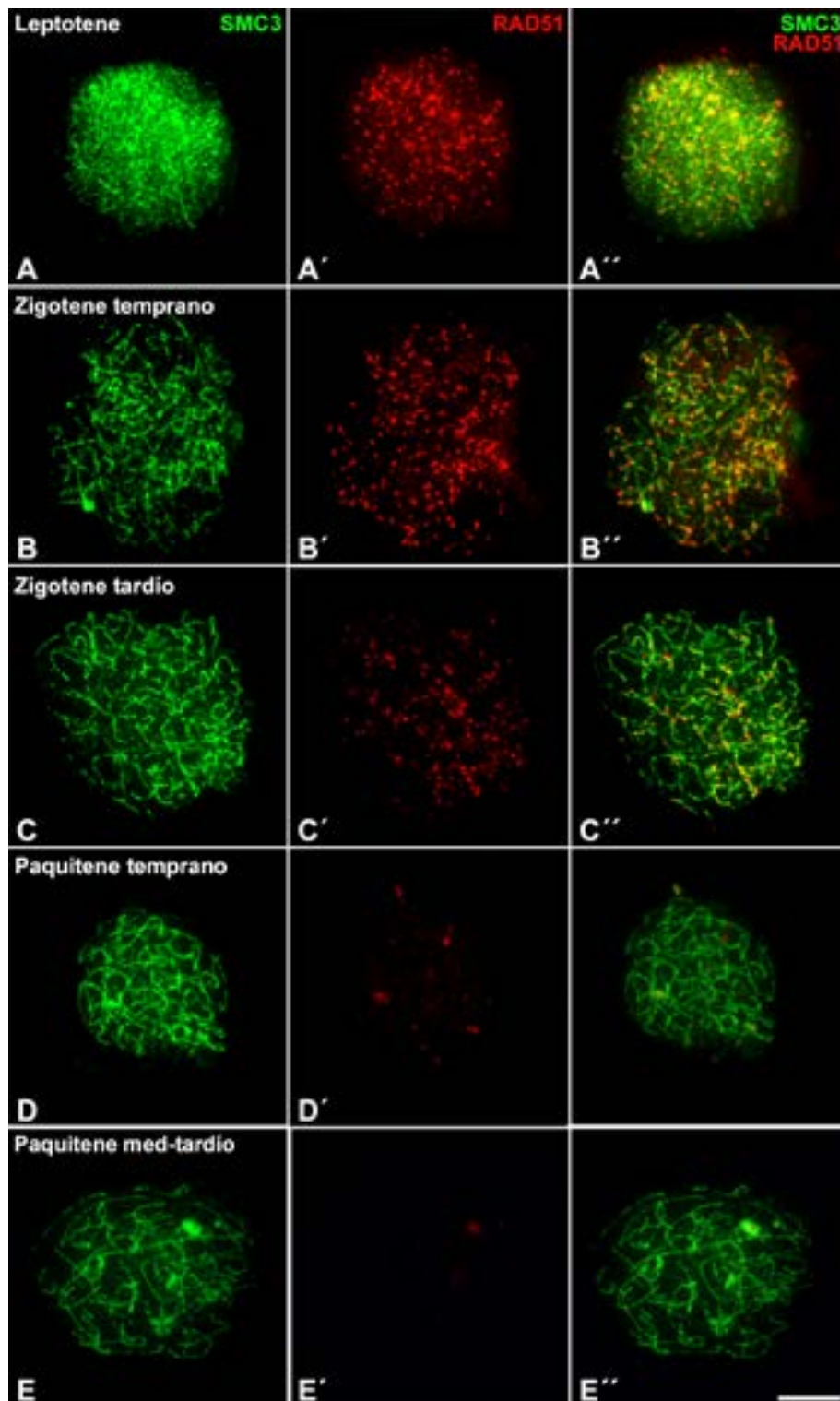


Figura 2.9. Distribución de RAD51 durante la profase-I en equidna. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y RAD51 (rojo) en esparcidos de espermatocitos. **(A-A'')** Leptotene. Localización de gran cantidad focos de RAD51 sobre los ECos por todo el núcleo. **(B-B'')** Zigotene temprano. Se produce una disminución de focos RAD51. **(C-C'')** Zigotene tardío. El número de focos de RPA disminuyen ligeramente. **(D-D'')** Paquitene temprano. Disminución casi total del número de focos de RAD51, aunque se siguen observando algunos dispersos **(E-E'')** Paquitene medio-tardío. Ausencia de RAD51 en todo el núcleo. Barra de escala 10 μm .

Gracias a este marcaje se pudieron distinguir dos etapas diferentes de paquitene: una más temprana, donde aún persisten focos de RPA (Figura 2.8D-D''), y una etapa más tardía donde ya se han resuelto los eventos de recombinación y han desaparecido por completo los focos de RPA (Figura 2.8E-E''). Entre las dos no se aprecian diferencias en la morfología de los ECos.

Con respecto a los cromosomas sexuales, no hemos podido tener resultados precisos de recombinación. Se intentó la inmunolocalización de RPA y SMC3 junto con el anticuerpo contra SYCP3-Y, con el fin de observar si era posible localizar focos de recombinación sobre la putativa cadena de cromosomas sexuales, pero resultó imposible distinguir qué focos correspondían con los autosomas y cuáles con los cromosomas sexuales.

A continuación, se estudió el ciclo de localización de RAD51. En leptotene, hay una gran cantidad de focos RAD51 distribuida por todo el núcleo (Figura 2.9A-A''). El número de focos es muy abundante también en zigotene temprano, cuando comienza la sinapsis. En los ejes más elongados y continuos se aprecian los focos intensos de RAD51, correspondiendo a las partes sinapsadas (Figura 2.9B-B''). En zigotene tardío el número de focos desciende ligeramente localizándose sobre los ejes de los cromosomas (Figura 2.9C-C''). En paquitene se observó una acusada disminución de RAD51. Basándonos en el número de focos se ha distinguido una etapa de paquitene temprano, en la que aún se observan algunos focos (Figura 2.8D-D''), y un paquitene más avanzado, en el que ya no se observa ninguno (Figura 2.9E-E'').

Dado que el patrón de RPA y RAD51 es similar, se llevó a cabo una triple inmunolocalización junto a SMC3 para realizar un análisis más detallado de la distribución espacio-temporal de estas dos proteínas. Se observaron dos diferencias principales. La primera de ellas es en la etapa de zigotene, pues aun cuando ambas proteínas muestran gran cantidad de focos, el número de RPA es más elevado que RAD51 (Figura 1.10A-A'). Así, mientras la mayoría de focos de RAD51 coinciden con otros de RPA, existen focos de RPA solos. La segunda diferencia notable corresponde a que RAD51 perdura más en el tiempo: RPA desaparece casi en su totalidad en paquitene temprano, mientras que RAD51 permanece con mayor número de focos (Figura 1.10B-B'). El patrón de estas proteínas permite por tanto llevar a cabo una discriminación más adecuada de las etapas de zigotene y paquitene.

Con respecto a la recombinación de los cromosomas sexuales, debido a la falta de características morfológicas que permitan diferenciarlos, no se pudo establecer si muestran algún tipo de diferencia. No obstante, dado que no se observó una persistencia de RPA o RAD51 en el núcleo, todo parece indicar que los cromosomas sexuales finalizan los fenómenos de reparación de DNA junto con el resto de cromosomas.

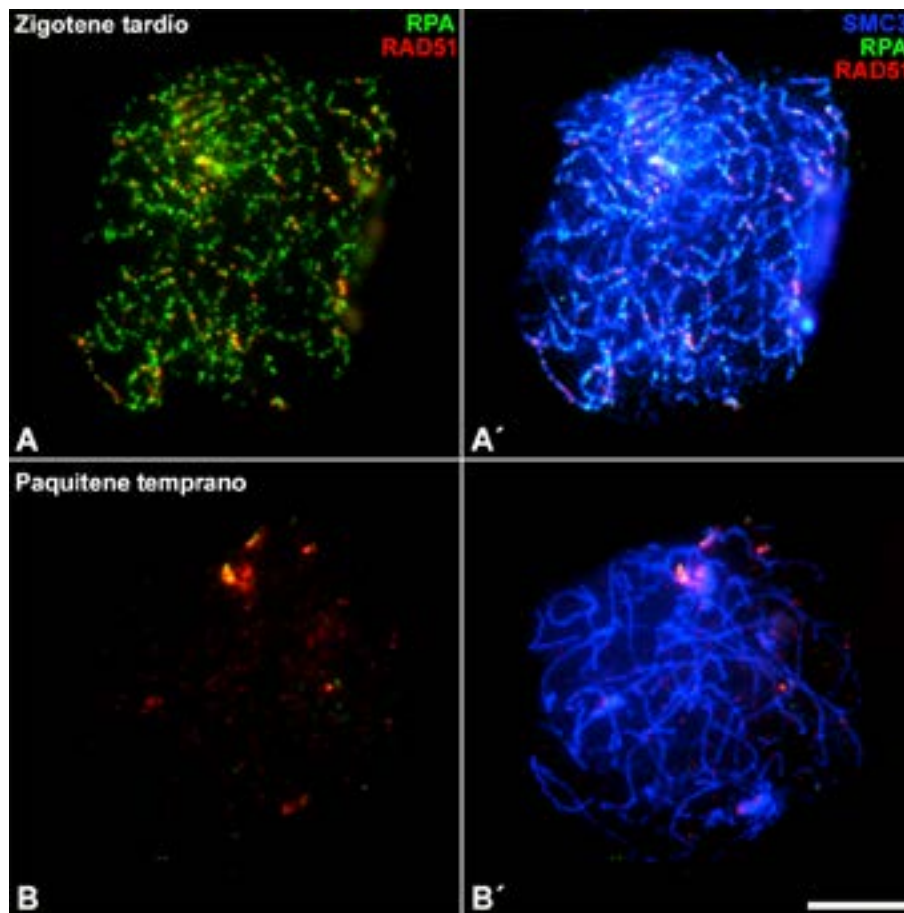


Figura 2.10. Localización simultánea de RPA y RAD51 en equidna. Triple inmunolocalización de SMC3 (azul), RPA (verde) y RAD51 (rojo) en esparcidos de espermatocitos. **(A-A')** Zigotene tardío. Existe una gran cantidad de focos de RPA y RAD51, pero el número de RPA es más elevado que RAD51 **(B-B')** Paquitene temprano. Se produce una disminución notable de ambas proteínas, RPA desaparece casi en su totalidad, mientras que RAD51 permanece con mayor número de focos. Barra de escala 10 μ m.

Para finalizar el estudio de la dinámica de RPA y RAD51 de los cromosomas del equidna, se realizó un estudio cuantitativo de los focos en las diferentes etapas analizadas. RPA muestra el pico más alto de focos en leptotene y zigotene temprano. El descenso de focos de RPA comienza en zigotene tardío, con diferencias estadísticamente significativas (test de ANOVA), y una caída abrupta de focos entre zigotene y paquitene temprano, donde se produce una reducción del 95% con respecto a la etapa anterior. Finalmente, en una etapa posterior RPA desaparece por completo (Figura 2.11A). RAD51 sigue una dinámica parecida pero no idéntica: el pico de focos se encuentra en leptotene y desde esta etapa comienzan a descender más progresivamente que en el caso de RPA, con diferencias significativas entre cada fase y la posterior (test de ANOVA). Nuevamente el descenso más acusado de los focos ocurre en la transición de zigotene tardío a paquitene temprano. Por último, la proteína desaparece en paquitene (Figura 2.11B).

Aunque la dinámica de ambas proteínas es similar, existen diferencias significativas en el número absoluto de focos entre ambas proteínas (test t de Student). En leptotene y toda la etapa de zigotene donde estas diferencias son mayores, cursando RPA con un mayor número de focos. Tras el descenso acusado de ambas proteínas, en paquitene temprano, el número de

focos de RAD51 es ligeramente superior al de RPA. Esto es congruente con una permanencia más prolongada de RAD51 (Figura 2.10) y por ello se observan más focos activos en esta etapa.

Estos resultados, indican que el equidna las roturas de DNA ocurren en etapas muy tempranas de la profase-I y que ambas proteínas actúan en su reparación. Conforme avanza la meiosis las roturas son reparadas de manera progresiva y el número de focos va descendiendo, si bien requiere una intervención mayor de RPA, excepto en paquitene temprano (Figura 2.11C).

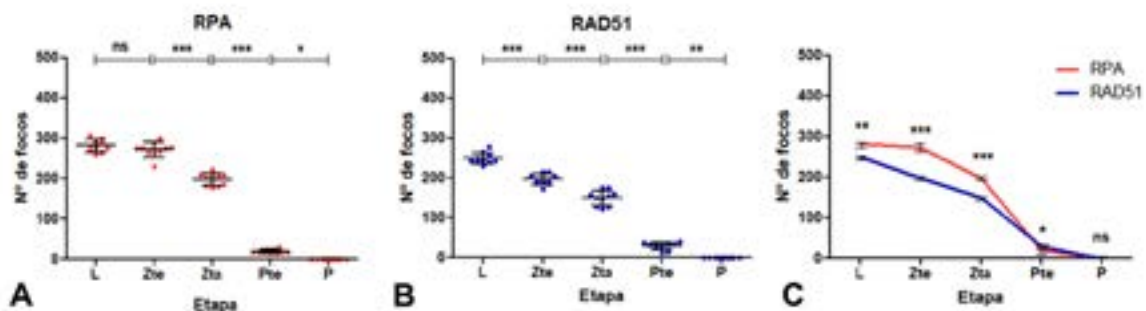


Figura 2.11. Representación gráfica de los focos de RPA y RAD51 durante la profase-I en equidna. (A) Gráfico del número de focos de RPA y análisis estadístico ANOVA de una vía, que muestra diferencias significativas entre todas las etapas excepto leptotene y zigotene temprano (ns). (B) Gráfico del número de focos de RAD51 junto al análisis al análisis estadístico ANOVA de una vía, que muestra una disminución paulatina y significativa entre las etapas. Se indican con asteriscos (*) los valores del test de ANOVA con corrección de Tukey para comparaciones múltiples entre las diferentes etapas (ns: no significativo; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$). (C) Representación gráfica de las medias y desviación estándar del número de focos de RPA (naranja) y RAD51 (azul) con diferencias significativas (test t de Student) entre ambas proteínas en todas las etapas excepto en paquitene temprano-medio donde desaparecen los focos por completo (ns: no significativo; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$). (L: leptotene; Zte: zigotene temprano; Zta: zigotene tardío; Pte: paquitene temprano; Pte-m: paquitene temprano-medio). (Número de células por etapa = 10).

	Proteínas	Nº de células	Media de focos	Desviación Estándar
Leptotene	RPA	10	282,70	15,73
	RAD51	10	249,40	14,13
Zigotene temprano	RPA	10	272,40	18,20
	RAD51	10	196,70	13,91
Zigotene tardío	RPA	10	198,20	15,52
	RAD51	10	150,10	18,84
Paquitene temprano	RPA	10	20,50	4,79
	RAD51	10	29,60	9,03
Paquitene	RPA	10	0	0
	RAD51	10	0	0

Tabla 2.1. Datos numéricos de los recuentos de focos de RPA y RAD51 en diferentes etapas de profase-I en equidna. Se representa el número de células, la media de los focos contados y la desviación estándar.

La dinámica de estas proteínas es diferente a lo encontrado en el ornitorrinco, ya que en aquel caso ambas proteínas muestran una trayectoria ascendente y después descendente. Sin embargo, en el equidna el máximo número de focos se encuentra en leptotene por lo que en las etapas analizadas la dinámica de ambas proteínas es siempre descendente.

2.5. Modificaciones epigenéticas

Como se ha expuesto anteriormente, uno de los procesos característicos en los cromosomas sexuales de mamíferos es el MSCI. Estudios previos ([Daish et al., 2015](#)) y nuestros resultados mostrados en el apartado anterior muestran que en los cromosomas sexuales de ornitorrinco no parecen estar sujetos a este proceso, dado que no hay incorporación de γ H2AX. Sin embargo, en el estudio de modificaciones epigenéticas observamos que algunas parecen estar preferencialmente acumuladas en las regiones asinápticas. A fin de comprobar si esta situación se repite de la misma manera en el equidna, se ha llevado a cabo el análisis del mismo conjunto de modificaciones epigenéticas estudiadas para el ornitorrinco. La localización de estas proteínas se ha estudiado mediante la inmunolocalización conjunta con SMC3, como indicador de las etapas durante la profase-I.

En primera instancia se ha analizado la RNA polimerasa-II, relacionada con la actividad transcripcional. Esta proteína se detecta ya desde la etapa de leptotene (Figura 2.12A-A''). Podemos apreciar tanto en leptotene, como en zigotene (Figura 2.12B-B'' y C-C'') y en paquitene (Figura 2.12D-D'') un patrón homogéneo por todo el núcleo, donde destacan determinados focos localizados sobre los bivalentes. A parte de estas señales discretas marcadas más intensamente no se distinguió alguna otra región de cromosomas con un marcaje diferente por esta proteína ni tampoco ningún área excluida de marcaje.

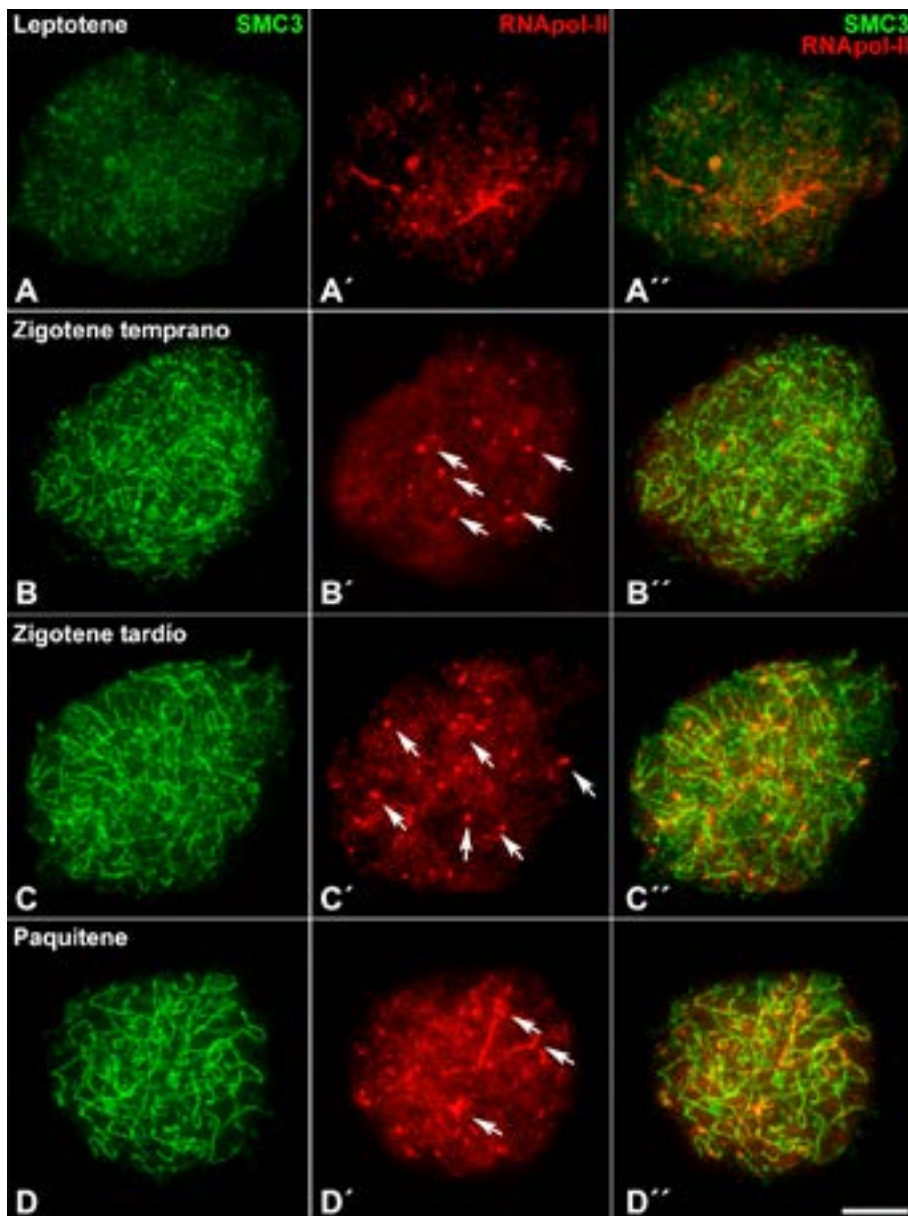


Figura 2.12. Análisis del patrón de la actividad transcripcional en equidna. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y RNA polimerasa-II (rojo) en esparcidos de espermatocitos. En leptotene (**A-A''**) y zigotene temprano (**B-B''**) la señal de RNA polimerasa-II aparece por todo el núcleo de manera tenue y difusa. En zigotene tardío se aprecia una acumulación sobre algunos segmentos específicos de los cromosomas. En zigotene tardío (**C-C''**) se observa un ligero aumento de la intensidad de la señal y se mantiene la acumulación de señales discretas. En paquitene (**D-D''**) el patrón se mantiene de forma similar. Las flechas indican los puntos intensos sobre los cromosomas. Escala 10 μm .

Para corroborar el marcaje de la RNA polimerasa-II y observar si había indicios de la actividad transcripcional en el equidna se completó el estudio con la histona H3K9ac, ya que esta modificación epigenética es afín a las regiones donde se produce actividad transcripcional (Figura 2.13). No encontramos un patrón muy diferente del observado con la RNA polimerasa-II, pero sí ligeras diferencias. Nuevamente la señal de esta histona aparece en etapas tempranas hasta paquitene, distribuido por todo el núcleo, pero no aparecen focos intensos acumulados sobre los bivalentes (Figura 2.13A-D). Sí se observaron variaciones de la intensidad en algunas regiones del núcleo. Con el fin de identificar si dichas regiones podrían corresponder con zonas de los cromosomas

que no han completado la sinapsis, se realizó una localización conjuntamente con SYCP1. Tanto en leptotene (Figura 2.13A-A''), como en zigotene (Figura 2.13B-C''), las regiones menos intensas de la H3K9ac no se pudieron relacionar con regiones concretas. En paquitene (Figura 2.13D) el marcaje de la histona muestra regiones más tenues que parecen corresponder en algunos casos con las regiones ausentes de SYCP1, es decir regiones en las que no se ha completado la sinapsis, algunas de las cuales podrían corresponder a los cromosomas sexuales. Otras zonas de intensidad tenue no están claramente localizadas en regiones asinápticas (Figura 2.13D-D'').

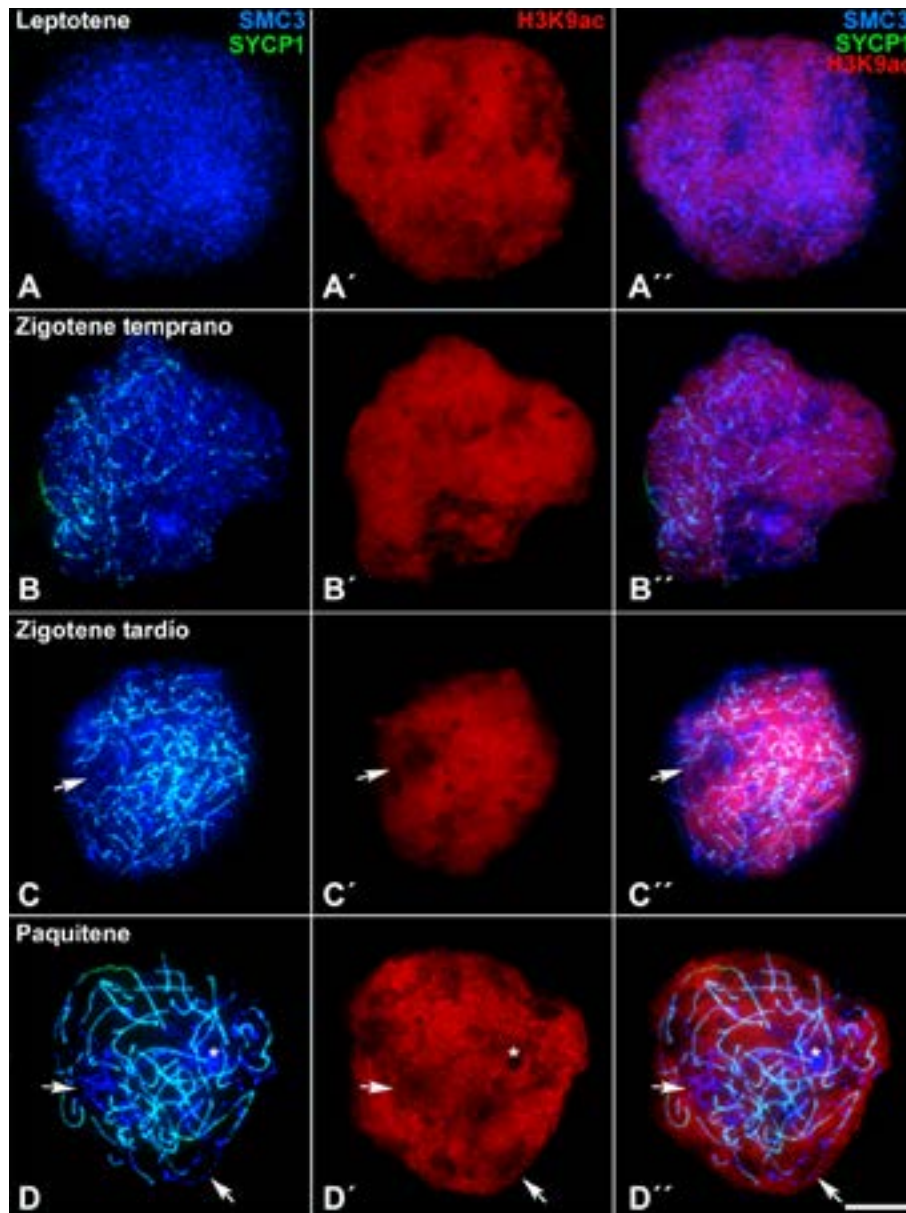


Figura 2.13. Distribución de la histona H3K9ac durante la profase-I en equidna. Triple inmunolocalización de SMC3 (azul), SYCP1 (verde) y H3K9ac (rojo) en esparcidos de espermatocitos. (A-A'') Leptotene. (B-B'') Zigotene. (C-C'') Zigotene tardío. H3K9ac aparece desde etapas tempranas, hay regiones menos intensas con este marcaje. Paquitene (D-D''). Parece disminuir H3K9ac en regiones que hay ausencia de SYCP1 (flecha). La histona se ausenta de la región del nucléolo (*). Escala 10 µm.

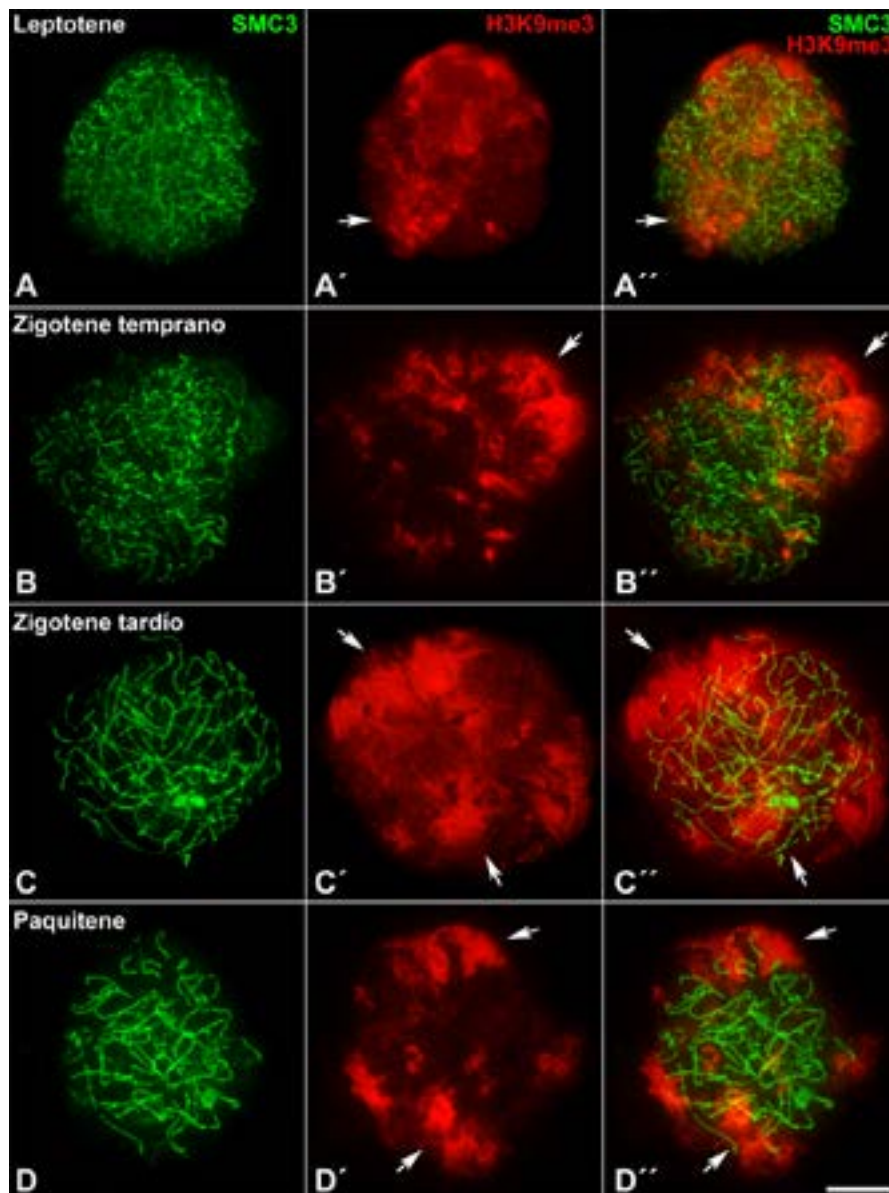


Figura 2.14. Distribución de la histona H3K9me3 durante la profase-I en equidna. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y H3K9me3 (rojo) en esparcidos de espermatocitos. En leptotene (A-A'') la señal de la histona aparece de forma tenue, aunque se localiza por todo el núcleo, marcando más intensamente algunas regiones. En zigotene temprano (B-B''), en zigotene tardío (C-C'') y paquitene (D-D'') la señal incrementa de intensidad en algunas regiones (flecha) pareciendo coincidir con los filamentos más finos marcados con SMC1. Escala 10 μ m.

Al igual que en el caso del ornitorrinco, tampoco encontramos una señal específica de γ H2AX durante profase-I en equidna. Esto indica que la ausencia de esta modificación epigenética parece conservada en los monotremas.

En cuanto al resto de modificaciones de histona, la primera analizada para este estudio es la H3K9me3, como marcador típico de heterocromatina. Hemos encontrado que el marcaje con esta histona aparece desde etapas tempranas en el leptotene hasta paquitene distribuido por todo el núcleo, pero con diferentes intensidades. En leptotene (Figura 2.14A-A'') se observan algunas regiones del núcleo con una señal tenue y otras con una señal más intensa que se localiza

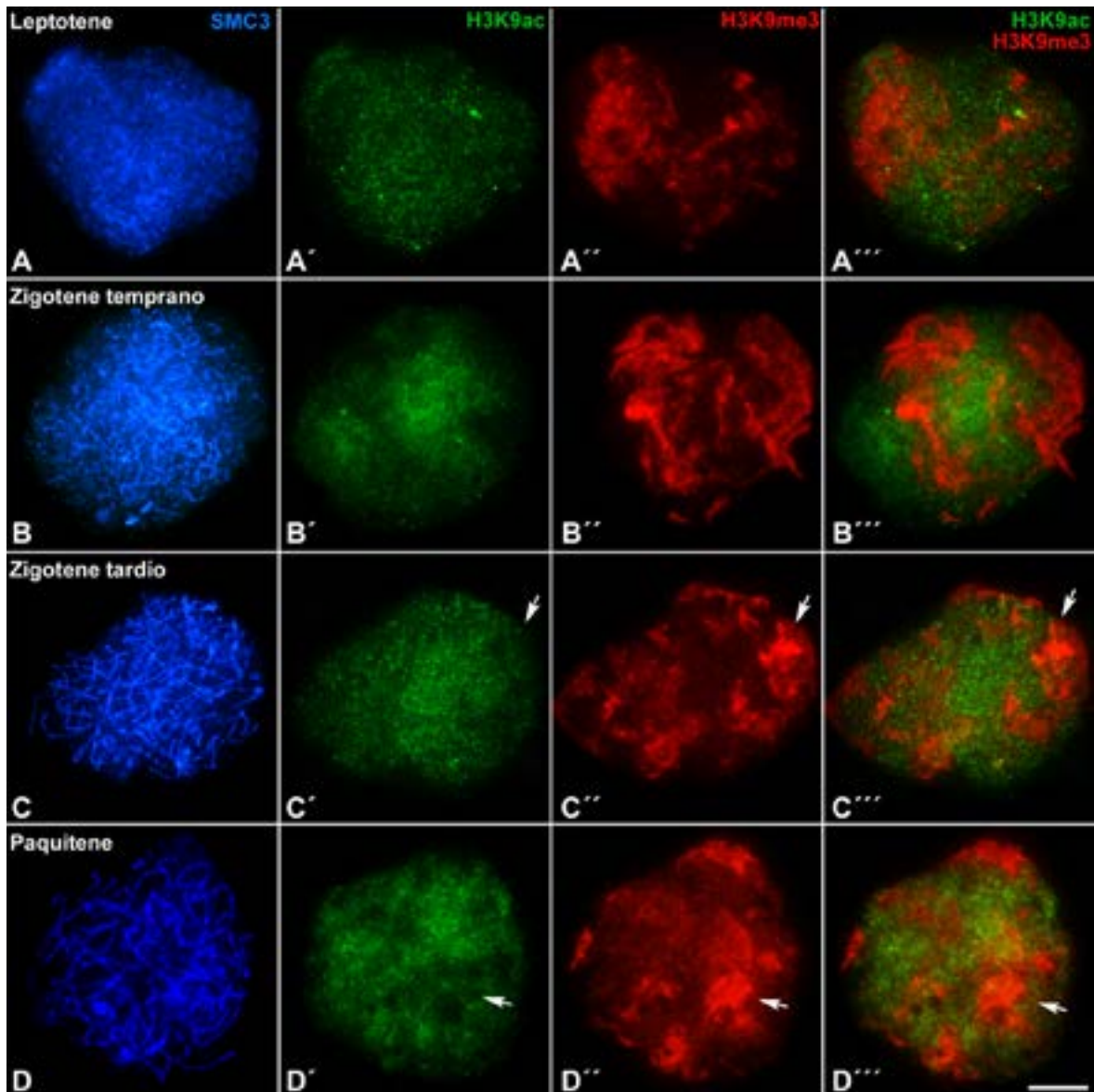


Figura 2.15. Distribución de las histonas H3K9ac y H3K9me3 durante la profase-I en equidna. Triple inmunolocalización de SMC3 (azul), H3K9ac (verde) y H3K9me3 (rojo) en esparcidos de espermatocitos. (A-A''') Leptotene. (B-B''') Zigotene. (C-C''') Zigotene tardío. Paquitene (D-D'''). En todas las etapas ambas histonas muestran un patrón opuesto y complementario, aunque no totalmente excluyente (flecha). Escala 10 μ m.

tanto en regiones centrales como de la periferia del núcleo. En zigotene parece focalizarse más a las regiones donde los filamentos de SMC3 aparecen más finos, posiblemente donde aún no se ha producido la sinapsis (Figura 2.14B-B''; C-C''). La etapa de paquitene parece mostrar el mismo patrón al coincidir la señal más intensa de H3K9me3 con las regiones donde los cromosomas quedan asinapsados (Figura 2.14D-D'').

Para corroborar este patrón se realizó una triple inmunolocalización de H3K9me3, SMC3 y H3K9ac (Figura 2.15). Encontramos que ambas proteínas muestran un patrón opuesto, de modo que a partir de zigotene cuando la histona H3K9ac muestra señal tenue en una determinada región, H3K9me3 se intensifica en dicha región (Figura 2.15B-B''' y C-C''').

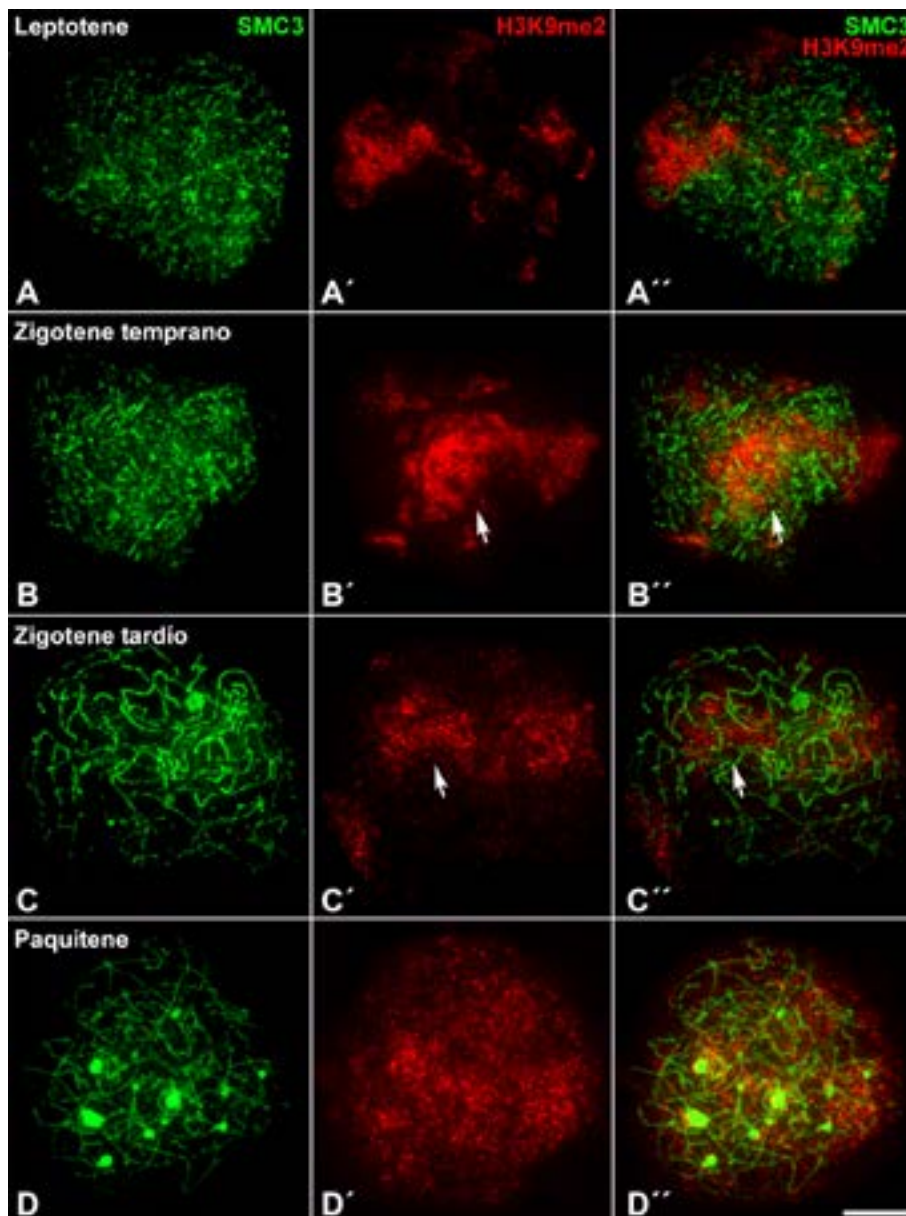


Figura 2.16. Distribución de la histona H3K9me2 durante la profase-I en equidna. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y H3K9me2 (rojo) en esparcidos de espermatocitos. (A-A'') Leptotene. La señal de H3K9me2 se muestra irregular sobre el núcleo. (B-B'') Zigotene temprano y (C-C'') Zigotene tardío. El marcaje continúa siendo irregular, marcando más intensamente algunas regiones. (D-D'') Paquitene. La señal se distribuye por todo el núcleo, sin un patrón determinado. Escala 10 μm .

Igualmente, en paquitene (Figura 2.15D-D'') ambas histonas muestran un patrón opuesto y complementario, aparentemente relacionado con la condición asináptica de los cromosomas.

Por último, estudiamos el patrón de distribución de H3K9me2. Esta modificación histónica aparece en el núcleo desde leptotene de forma irregular marcando únicamente algunas zonas (Figura 2.16A-A''). En zigotene la señal parece ser más extensa abarcando una mayor región del núcleo, aunque existen algunas regiones más intensas que otras (Figura 2.16B-B'' y C-C''). En paquitene el marcaje se hace más homogéneo por todo el núcleo, con ligeras diferencias de intensidad, pero sin ningún patrón claro (Figura 2.16D-D'').

Por ende, las dos especies de monotremas estudiados muestran modificaciones epigenéticas que pueden acumularse en los cromosomas sexuales, aunque no parecen estar relacionadas con la inactivación de la transcripción, sino con la presencia de regiones asinápticas. Además, los patrones epigenéticos son diferentes en el ornitorrinco y el equidna y a la vez difieren de los patrones encontrados en otros mamíferos.



Ualabí de pantano

Wallabia bicolor (Macropodidae)

Fotografía tomada en las colonias *the University of Melbourne* (Melbourne, Victoria, Australia)

*“Salí de casa con la sonrisa puesta,
hoy me he levantado contento de verdad,
el sol de la mañana brilla en mi cara,
una brisa fresca me ayuda a despertar.*

(...)

*Yo digo salta, salta conmigo,
digo salta, salta conmigo,
salta, salta conmigo”.*

Salta, Tequila (1981)

3

Comportamiento meiótico de los cromosomas del ualabí de pantano y características morfológicas de sus cromosomas sexuales

En los apartados anteriores se ha presentado el caso más complejo de configuración de evolución de cromosomas sexuales en mamíferos, en el que existen múltiples translocaciones de los cromosomas sexuales y los autosomas, dando lugar a la formación de una compleja y larga cadena cromosómica. Sin embargo, como se explicó en la introducción, la evolución de los cromosomas puede conducir a configuraciones más simples de los cromosomas sexuales, generadas por translocaciones simples de un autosoma a uno de los cromosomas sexuales originales. A fin de analizar uno de estos casos, se eligió como especie de estudio el ualabí del pantano, un marsupial perteneciente a la Familia Macropodidae, Orden Diprotodontia. Los marsupiales se caracterizan por una diferenciación completa de los cromosomas X e Y, con pérdida de la PAR. Sin embargo, esta especie representa una excepción al patrón de la mayoría de marsupiales, ya que el cromosoma X se ha fusionado con un autosoma y se ha establecido un sistema de cromosomas sexuales múltiples XY_1Y_2 , en que el cromosoma X es el resultado de la fusión, el cromosoma Y_1 es el cromosoma Y original y el cromosoma Y_2 es el autosoma fusionado (Figura 3.1). En este apartado se detallará el comportamiento meiótico de los cromosomas de esta especie, con especial interés en la formación de estructuras específicas de apareamiento en sus cromosomas sexuales.

3.1. Cariotipo y configuración trivalente de los cromosomas sexuales

El ualabí de pantano presenta una dotación cromosómica $2n = 11$ en los machos, constituida por cuatro pares autosómicos, todos ellos submetacéntricos y tres cromosomas sexuales: XY_1Y_2 . Este sistema deriva de una translocación del cromosoma 2 al cromosoma X en un ancestro de esta especie ([Deakin, 2018](#)). El cromosoma Y original (Y_1) es metacéntrico y de muy pequeño tamaño, mientras que el cromosoma X es submetacéntrico y de gran tamaño. El cromosoma Y_2 y muy largo (Figura 3.1A, B). Los cromosomas sexuales forman una configuración de trivalente donde el segmento autosómico del cromosoma X y el cromosoma Y_2 se aparean en toda su longitud, mientras que el segmento diferencial del X (correspondiente al cromosoma X ancestral) queda asináptico. El cromosoma Y_1 , por su parte, queda libre o asociado al cromosoma X, dependiendo de la etapa celular. Dado que el cromosoma Y_1 está totalmente diferenciado y no posee región PAR, se desarrollan mecanismos alternativos de asociación (ver más adelante). De este modo, existe una coexistencia entre un mecanismo convencional de apareamiento entre cromosomas y un mecanismo alternativo propio de los marsupiales, constituyendo un sistema atípico y excepcional.

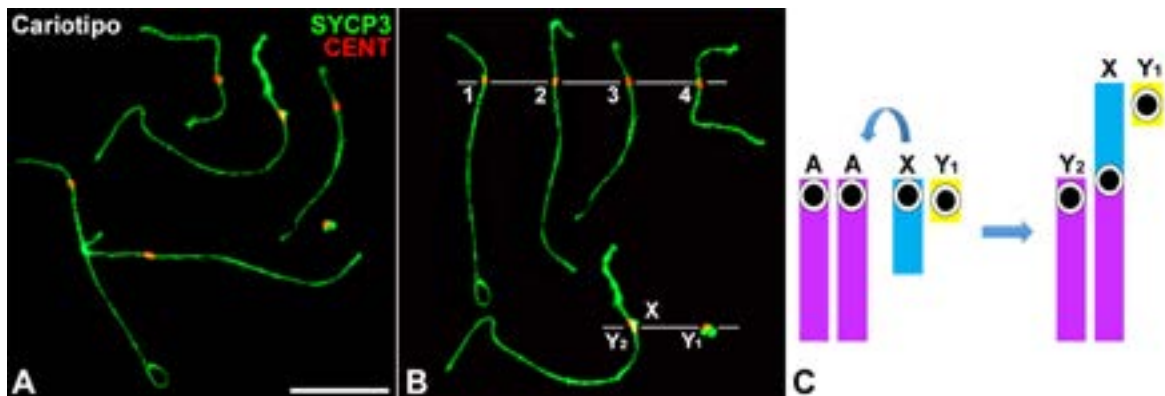


Figura 3.1. Cariotipo meiótico de *Wallabia bicolor*. Doble inmunolocalización donde se muestra SYCP3 (verde) y centrómero (rojo). **(A)** Esparcido de un espermatocito en paquítene temprano donde se aprecian con claridad los bivalentes autosómicos y el trivalente formado por los cromosomas sexuales (XY_1Y_2). **(B)** Cariotipo meiótico. Los bivalentes autosómicos están ordenados según a longitud del CS; todos ellos son submetacéntricos. En la parte inferior se muestran los cromosomas sexuales X- Y_2 sinapsados por la región PAR dejando libre la región no apareante del X y por último el cromosoma Y_1 que es submetacéntrico, al igual que X. El Y_2 es telocéntrico. **(C)** Esquema representativo de la formación del trivalente sexual, mediante la translocación de un par autosómico (A) al cromosoma X, los centrómeros quedan representados como círculos negros. Barra de escala 10 μm

Una observación detallada de la organización del trivalente sexual revela que alrededor de la región centromérica del cromosoma X y el Y_2 el apareamiento de los cromosomas parece anómalo y las señales del centrómero aparecen frecuentemente desplazadas o incluso dobles (Figura 3.1A, B). Con el fin de definir esta región de los cromosomas con mayor detalle se utilizó el microscopio de alta resolución confocal STED (Figura 3.2). Observamos claramente la trayectoria de los ELs de los bivalentes autosómicos, que muestran un enrollamiento sobre sí mismos con un giro helicoidal (Figura 3.2B). Este mismo enrollamiento se aprecia entre segmento autosómico del cromosoma X y el Y_2 . Sin embargo, lo más relevante es que las señales centroméricas de ambos cromosomas aparecen claramente desplazadas, indicando que hay un heteromorfismo de los cromosomas en esta región. Esto se ve reflejado además en la presencia de un segmento de EA correspondiente al cromosoma Y_2 que se desvía de la trayectoria de ambos ejes, probablemente correspondiente a un pequeño brazo corto de este cromosoma y que no se asocia con el cromosoma X. Finalmente, se puede observar que la región diferencial del cromosoma X muestra un engrosamiento muy evidente y una gran acumulación de SYCP3, que en algunos casos parece corresponder a la formación de varios filamentos paralelos.

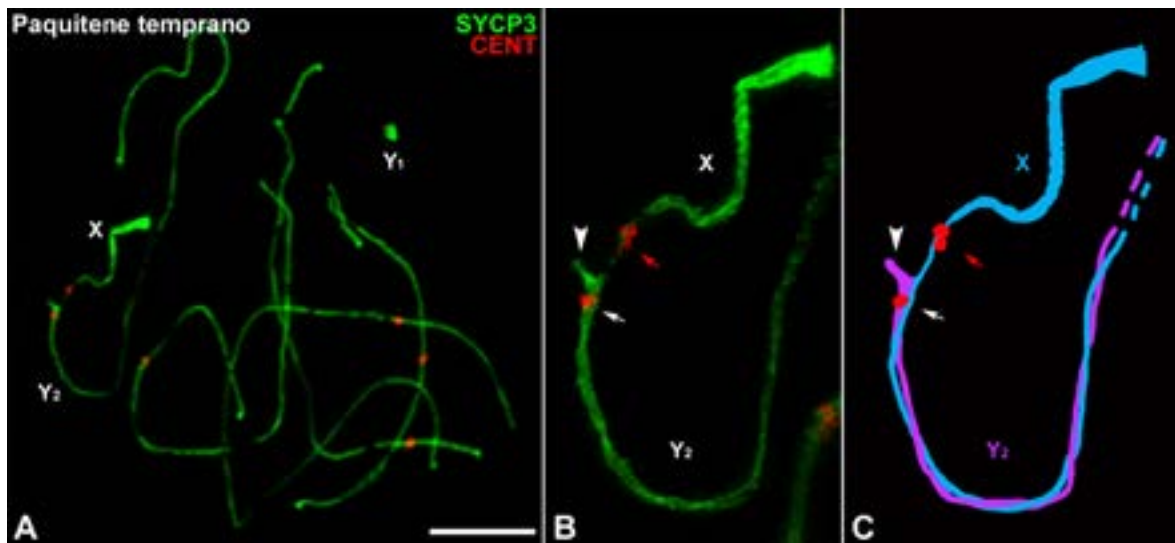


Figura 3.2. Caracterización estructural de los cromosomas del ualabí de pantano. Doble inmunolocalización de las proteínas SYCP3 (verde) y centrómero (rojo) en esparcidos de espermatocitos. (A) Célula en paquitene temprano, observada con microscopía confocal. Se muestra la sinapsis de todos los cromosomas autosómicos y la localización de X-Y₂ separada de Y₁. (B) Detalle de los cromosomas X-Y₂ visualizado mediante microscopía confocal STED. Los LEs de ambos cromosomas muestran un enrollamiento y giro helicoidal. Se diferencian el centrómero del cromosoma X (flecha roja) y el centrómero del cromosoma Y₂ (flecha blanca). Observamos un brazo pequeño del cromosoma Y₂ separado del resto del eje cromosómico (punta de flecha). (C) Esquema de la ampliación mostrada en B, en azul se representa el cromosoma X y en morado el cromosoma Y₂, en rojo los centrómeros. Barra de escala 10 μm .

3.2. Caracterización de la secuencia de apareamiento de los cromosomas sexuales durante la sinapsis en profase-I

A continuación, se estudió con detalle la secuencia de apareamiento y sinapsis de los cromosomas durante la profase-I, así como las diferentes configuraciones que pueden adquirir los cromosomas sexuales, especialmente las formas de asociación del cromosoma Y1 con la región diferencial del cromosoma X. Para ello en primer lugar se ha llevado a cabo la inmunolocalización de SYCP3 y proteínas centroméricas en esparcidos de espermatocitos. En leptotene observan pequeñas hebras de SYCP3 discontinuas que van formando el EA de cada cromosoma (Figura 3.3A), los centrómeros aparecen distribuidos por todo el núcleo sobre los EA. Durante zigotene temprano tiene lugar la asociación de los EAs de cromosomas homólogos dando lugar al proceso de sinapsis. El avance de la sinapsis no se produce al mismo ritmo entre todos los bivalentes, por lo que es habitual encontrar en la misma célula bivalentes más sinapsados que otros (Figura 3.3B). Hacia el final de zigotene (Figura 3.3C) la sinapsis ha avanzado de manera extensiva en todos los cromosomas, quedando sólo algunas regiones más bien distales sin completar el proceso. Los cromosomas sexuales se pueden distinguir claramente del resto a partir de zigotene medio. El cromosoma Y₁ aparece como univalente y habitualmente muy alejado del cromosoma X, incluso en lados opuestos del núcleo. Su EA aparece delgado y se dispone en forma de herradura (Figura 3.3C'). Por su parte el segmento autosómico del cromosoma X ha completado la sinapsis con el cromosoma Y₂ y muestra un engrosamiento evidente de SYCP3 en la parte correspondiente a la región diferencial, que en esta etapa aparece habitualmente estirada (Figura 3.3C').

En paquitene temprano (Figura 3.3D) los autosomas han completado la sinapsis en toda la longitud y se mantienen sinapsados durante el resto de paquitene sin cambios en su organización (Figura 3.3E-G). En el caso de los sexuales, la unión solo se produce en el sensegmento autosómico del cromosoma X y el Y_2 . Por otro lado, la asociación X- Y_1 se produce de manera retrasada, ya que en paquitene temprano ambos cromosomas aún se encuentran separados y sin contacto. Hemos podido observar una modificación morfológica en los EAs de estos cromosomas, incluso antes de que se complete su asociación (Figura 3.3D'). Por una parte, se hace mucho más patente el engrosamiento del EA del cromosoma X, que además tiende a aparecer curvado. Es importante resaltar que el engrosamiento del EA no afecta a la región del cromosoma X más próximo al centrómero. El EA del cromosoma Y_1 aparece más condensado que en etapas anteriores, adquiriendo esta vez una forma de triángulo. Conforme avanzamos en la etapa de paquitene, los cromosomas sexuales se van acercando y se van haciendo más pronunciadas las modificaciones del EA despareado del segmento diferencial del cromosoma X, que en algunos casos aparecen como engrosamientos focalizados a lo largo del EA. En una primera fase, que hemos identificado como paquitene temprano-medio, los cromosomas aparecen juntos sin que se aprecie contacto físico entre sus EAs (Figura 3.3E). En una etapa más avanzada, es decir en paquitene medio (Figura 3.3F) se produce el contacto entre el segmento diferencial del X y el Y_1 X- Y_1 a través unas finas fibras de SYCP3 que conectan los EAs de ambos cromosomas. Esta unión puede producirse en una sola región que puede ser distal o intersticial, o puede tener dos puntos de conexión, es decir una unión distal e intersticial al mismo tiempo (Figura 3.3F').

Una vez que los EAs de los cromosomas establecen un contacto físico, en etapas subsiguientes se produce una acumulación de SYCP3 de manera más irregular, en la que se hace difícil distinguir la trayectoria de los cromosomas sexuales (Figura 3.3G'). Esta acumulación representa casi con toda seguridad la estructura denominada placa densa (PD) que ha sido caracterizada en la meiosis de otras especies de marsupiales, y que se forma principalmente por componentes de los ELs del CS como SYCP3. A partir de esta etapa no se pueden distinguir con precisión los cromosomas, ya que tanto el cromosoma X, que describe varios bucles, como el Y_1 se entrelazan y permanecen asociados a la placa intensamente marcada por SYCP3.

Finalmente, en diplotene se produce la desinapsis de los cromosomas homólogos (Figura 3.3H). Hemos observado que habitualmente la primera región en iniciar la desinapsis es la región centromérica de los cromosomas X- Y_2 . A medida que esto ocurre los ELs de cada cromosoma quedan de nuevo individualizados. La PD adquiere una morfología irregular y el EA asináptico del cromosoma X se entremezcla con la misma (Figura 3.3H'). Al final de esta etapa los espermatocitos entran en un estado difuso caracterizado por la descondensación de la cromatina y la pérdida casi total del marcaje de SYCP3, mostrándose líneas discontinuas en los ELs de los cromosomas (ver siguiente epígrafe). Este estado aparece en frecuencia muy baja indicando que son fases muy efímeras. Este tipo de etapas se han visto en otros marsupiales previamente estudiados, como *Thylamys elegans* (Page et al., 2006b)

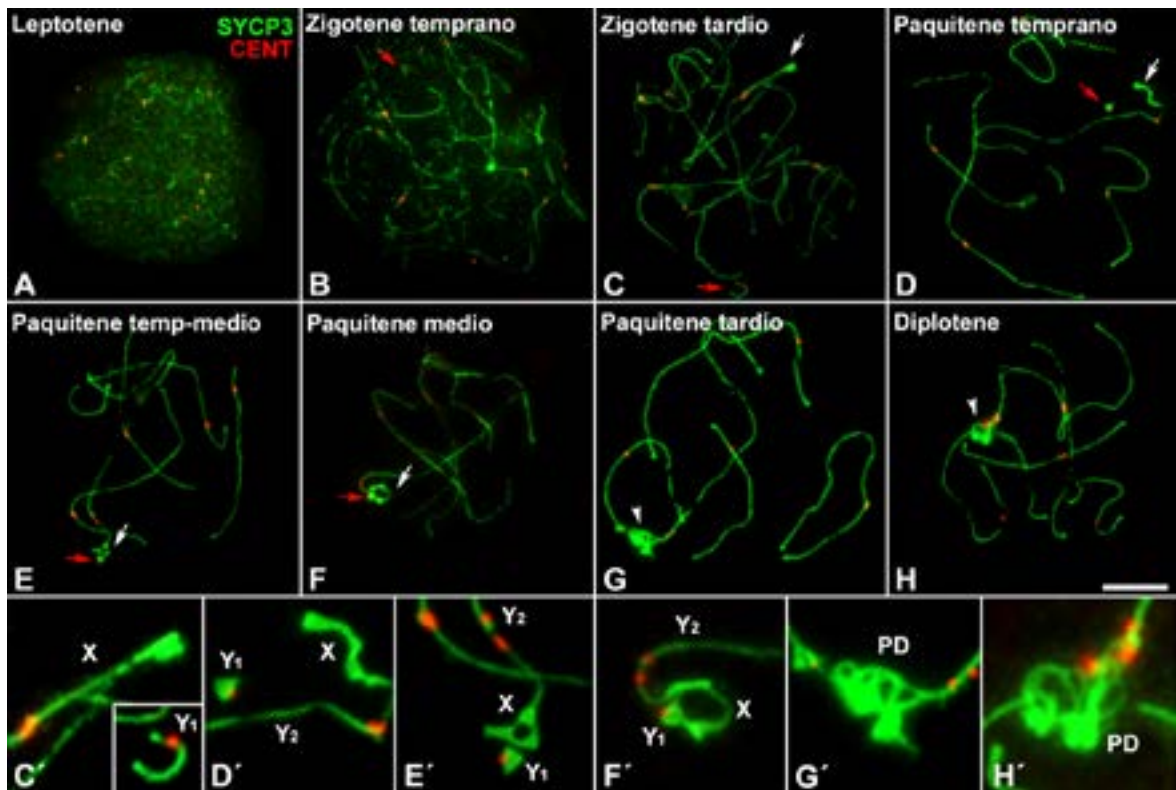


Figura 3.3. Secuencia sináptica de los cromosomas homólogos en el ualabí de pantano durante la profase-I. Doble inmunolocalización donde se muestra SYCP3 (verde) y las proteínas centroméricas (rojo) en esparcidos de espermatocitos. **(A)** Leptotene. Se observan filamentos cortos y finos de SYCP3 y los centrómeros distribuidos por todo el núcleo. **(B)** Zigotene temprano. Algunos EAs ya han comenzado la sinapsis, pero gran parte de los cromosomas se encuentran en asinapsis. Se distingue el cromosoma Y_1 (flecha roja). **(C)** Zigotene tardío. Avance en el proceso de sinapsis y visualización del cromosoma Y_1 (flecha roja) alejado del complejo cromosómico X- Y_2 que está completando su sinapsis (flecha blanca). **(D)** Paquitene temprano. La proteína SYCP3 está formando los ELs a lo largo de toda la longitud de los bivalentes. Mientras que la sinapsis es completa en todos los autosomas, los EAs desaparecidos del segmento diferencial del X y el cromosoma Y_1 están engrosados pero no hay contacto entre ellos. **(E)** Paquitene temprano medio. El segmento más distal del cromosoma X sufre modificaciones morfológicas, como expansiones de la proteína SYCP3. El cromosoma Y_1 está próximo, pero sin contacto. **(F)** Paquitene medio. Asociación de los cromosomas X e Y_1 por diferentes puntos de conexión. **(G)** Paquitene tardío. Formación de la placa densa (PD) (punta de flecha) en las regiones diferenciales del cromosoma X e Y_1 . **(H)** Diplotene. Se observa el comienzo de desinapsis de los ELs de los autosomas. La PD abarca una mayor región los EAs de los cromosomas X e Y_1 que aparecen difusos y enmarañados. **(C'-H')** Detalles de los cromosomas sexuales desde zigotene tardío a diplotene. Barra de escala 10 μ m.

A fin de caracterizar con mejor resolución si las conexiones entre los cromosomas representan simplemente una superposición de las señales de SYCP3 en el esparcido, se ha llevado a cabo un estudio de microscopía confocal STED (Figura 3.4A-D). Con ello, se ha podido visualizar que los puntos de contacto están realmente mediados por filamentos delgados de SYCP3, tanto en las uniones distales (Figura 3.4A y B) como en las intersticiales (Figura 3.4C). También se observan asociaciones en dos puntos de los cromosomas sexuales (Figura 3.4D). Por otro lado, con el objetivo de establecer cuál de estas tres uniones era más frecuente, se realizó un recuento de las mismas en 150 células en la etapa de paquitene medio, visualizadas en células tratadas mediante la técnica de aplastado, que mantiene la configuración tridimensional original de la célula y por tanto la disposición de los cromosomas en el núcleo (Figura 3.4 E-G). Se ha observado que la unión más habitual es la que tiene lugar con un punto de unión, el porcentaje es claramente mayor con un 63,3%, frente a las configuraciones con dos puntos de unión que

representan el 36,7%. Finalmente, cuando observamos un solo tipo de unión, las interacciones distales son más abundantes que las intersticiales.

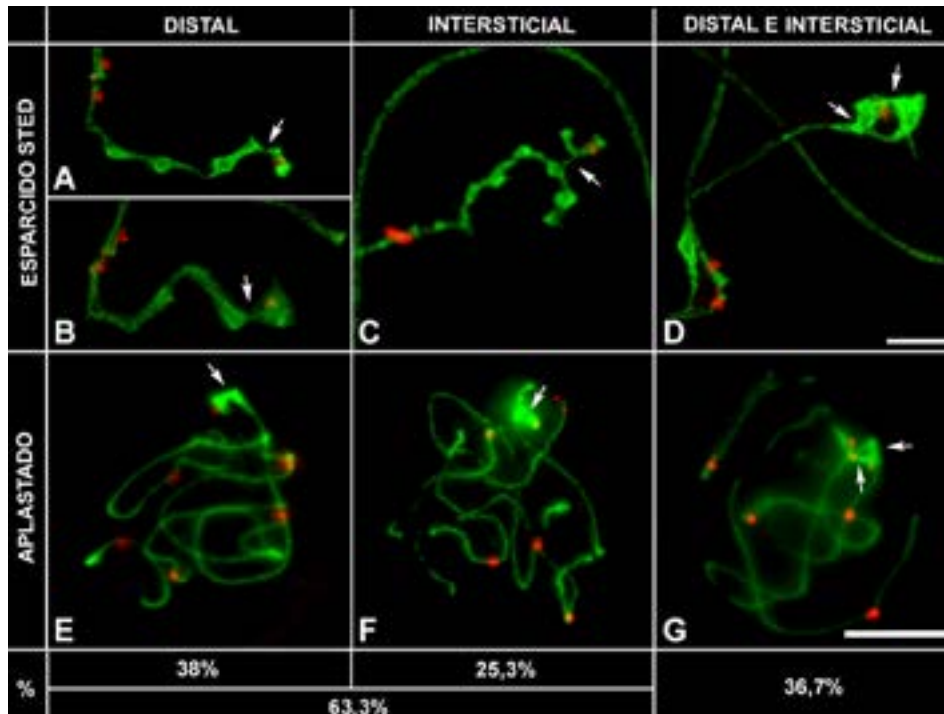


Figura 3.4. Tipos de uniones entre los cromosomas sexuales X-Y₁. En verde se muestra el marcaje de SYCP3 y en rojo las proteínas centroméricas. (A-D) Ampliación observada con microscopía confocal STED de los cromosomas sexuales de espermatocitos procesados mediante la técnica de esparcido. (E-G) Esparcidos procesados mediante la técnica de aplastado. (A, B y E) Uniones distales. (C y F) Uniones intersticiales. (D y G) Uniones en dos puntos, uno distal y otro interstitial. Las flechas indican el punto de unión. En la parte inferior se muestra la proporción (%) de las diferentes uniones de los cromosomas sexuales. n=150 células. Barra de escala en esparcidos 2,5 μm y en aplastados 10 μm.

3.2.1. Ensamblaje del complejo sinaptonémico durante la sinapsis

A fin de averiguar si las interacciones entre los cromosomas sexuales involucran la formación de un CS completo, se ha estudiado de manera conjunta el patrón de localización de las proteínas SYCP3 y SYCP1. La secuencia de apareamiento y sinapsis de los cromosomas es idéntica a la descrita más arriba. Sin embargo, con la localización de la proteína SYCP1 se pueden observar claramente las regiones en las que la asociación de los cromosomas conlleva el ensamblaje de los FTs del CS. En leptotene (Figura 3.5A) no hay presencia de la proteína SYCP1. El ensamblaje de los FTs y el EC se inicia en la etapa de zigotene (Figura 3.5B), revelado por la aparición de un marcaje con SYCP1. Además, los EAs marcados con SYCP3 se hacen más continuos y comienzan a asociarse. Durante paquitene (Figura 3.5C, D y E) los cromosomas homólogos están completamente sinapsados en toda su longitud. En este caso las señales de SYCP3 y SYCP1 son coincidentes sobre los autosomas y la región de apareamiento entre el segmento autosómico del cromosoma X y el cromosoma Y₂. No se apreció marcaje de SYCP1 en las regiones de asociación del segmento diferencial del cromosoma X con el Y₁, ni cuando estos cromosomas interactúan inicialmente a través de filamentos de SYCP3, ni cuando la asociación esta medida por la PD (Figura 3.5D y E).

Hay que destacar que se encontró en algunos espermatoцитos marcaje con SYCP1 en regiones de los EAs desapareados, principalmente del cromosoma X, identificándose como una deposición inespecífica (Figura 3.5D).

El CS se mantiene estable durante toda la etapa de paquitene y comienza su desensamblaje en diplotene, después los espermatoцитos entran en una etapa, denominada difusa, bastante efímera donde el marcaje del CS (SYCP3 y SYCP1) se muestra como líneas discontinuas en todos los autosomas. Los cromosomas sexuales aparecen muy delgados y fragmentados, aunque permanece la PD en forma de ovillo, marcada intensamente por SYCP3 (Figura 3.5F).

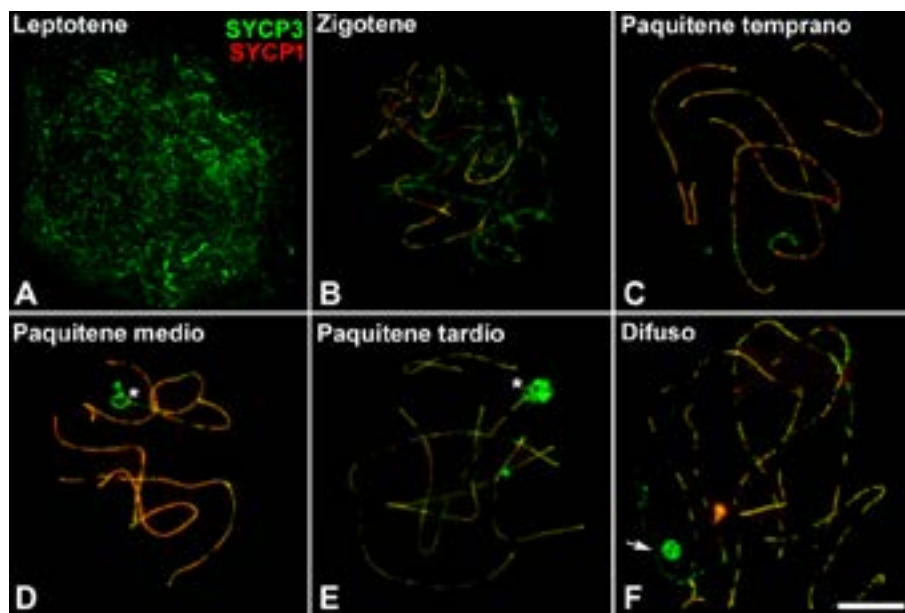


Figura 3.5. Secuencia de sinapsis de los cromosomas en ualabí de pantano durante la profase-I. Doble inmunolocalización de las proteínas SYCP3 (verde) y SYCP1 (rojo) en espermatoцитos. **(A)** Leptotene. SYCP3 forma hebras dispersas correspondientes a EAs. **(B)** Zigotene. Comienza la sinapsis y las regiones sinapsadas muestran un marcaje conjunto de SYCP3 y SYCP1. **(C)** Paquitene temprano. Los autosomas están completamente sinapsados, SYCP1 se dispone en toda su longitud, sin embargo está ausente de los cromosomas sexuales X-Y1. **(D y E)** Paquitene medio y tardío. Se forma la PD marcada intensamente por SYCP3, y con ausencia de SYCP1 salvo en regiones internas de EA desapareados (*). **(F)** Estado difuso. Fragmentación y dispersión de CS y los cromosomas sexuales quedan asociados por medio de la PD (flecha blanca). Barra de escala 10 µm.

3.3. Patrón de recombinación

Como en las especies analizadas anteriormente, se realizó un estudio de la localización de proteínas relacionadas con la recombinación meiótica: RPA, RAD51, DMC1 y MLH1. Desafortunadamente no obtuvimos resultados positivos ni con DMC1 ni con MLH1.

RPA se observa desde la etapa de leptotene (Figura 3.6A) con gran cantidad de focos asociados a los EAs en formación. Su número va aumentando hasta alcanzar el máximo en la etapa de zigotene (Figura 3.6B), donde se acumula preferencialmente en las regiones ya sinapsadas de los autosomas. En paquitene temprano (Figura 3.6C) la cantidad de focos sigue siendo abundante a lo largo de los cromosomas autosómicos. Cabe destacar que el cromosoma X presenta una gran

cantidad de focos en su región asináptica. Igualmente, el cromosoma Y presenta uno o dos focos de RPA sobre su EA. En etapas posteriores, paquitene medio (Figura 3.6D) los focos de RPA van disminuyendo de manera evidente. No obstante, podemos seguir visualizando focos en todos los cromosomas, incluidos los cromosomas sexuales que se encuentran asociados mediante la PD. La reducción de puntos es mayor en etapas tardías de profase-I, visualizándose pocos puntos en paquitene tardío (Figura 3.6E) y desapareciendo prácticamente por completo de todos los cromosomas en diplotene (Figura 3.6F).

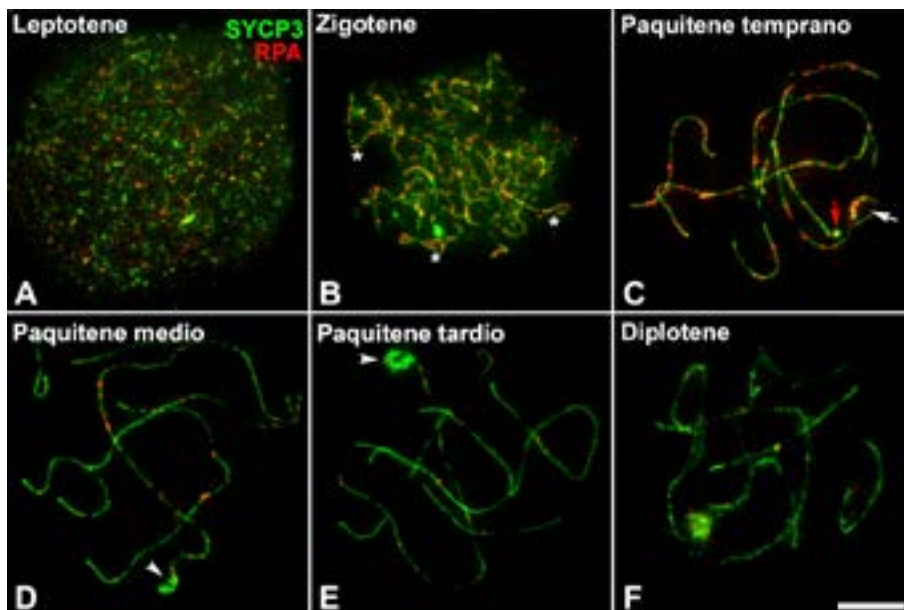


Figura 3.6. Distribución de la proteína de reparación RPA durante la profase-I en ualabí de pantano. Doble inmunolocalización de SYCP3 (verde) y RPA (rojo) en esparcidos de espermatoцитos. (A) Leptotene. Aparecen focos de RPA sobre los EAs, que aumentan en cantidad en zigotene (B) acumulándose principalmente en las regiones sinapsadas (*). La cantidad de focos es bastante elevada también durante paquitene temprano (C) y el cromosoma X muestra una gran cantidad de estos focos en la región asináptica (flecha blanca). A su vez, el cromosoma Y₁ presenta uno o dos focos (flecha roja). En paquitene medio y tardío (D y E) la cantidad de focos disminuye y aún se puede visualizar algunos en los cromosomas sexuales asociados a la PD (punta de flecha). En diplotene (F) desaparecen casi del todo. Barra de escala 10 μm.

En segundo lugar, analizamos la localización de RAD51. La señal comienza a aparecer en leptotene (Figura 3.7A) en gran cantidad y en forma de pequeños focos distribuidos homogéneamente por todo el núcleo, que pueden estar asociados a los filamentos finos de SYCP3 que están formando los EAs. En zigotene (Figura 3.7B) los focos se localizan tanto en las regiones sinapsadas como en las no sinapsadas de los cromosomas. En paquitene temprano (Figura 3.7C) se produce una reducción clara de la cantidad de focos en los autosomas. En cambio, se observa una gran cantidad en la región asináptica del cromosoma X. En el cromosoma Y₁ se observan uno, dos o incluso tres focos. En paquitene medio y tardío (Figura 3.7D y E) los focos persisten y en ocasiones se puede ver autosomas donde ha desaparecido toda la señal de RAD51 o puede encontrarse algún foco desconectado de los ELs. Los focos de RAD51 desaparecen en diplotene (Figura 3.7F), donde el CS comienza a fragmentarse.

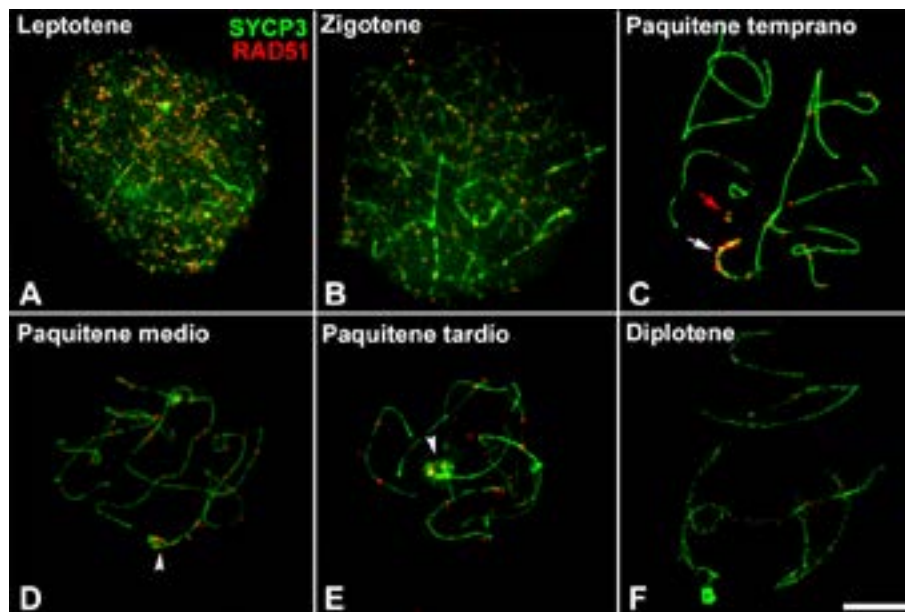


Figura 3.7. Distribución de la proteína de reparación RAD51 durante la profase-I en ualabí de pantano. Doble inmunolocalización de SYCP3 (verde) y RPA (rojo) en esparcido de espermatozoides. (A) Leptotene. Aparecen focos de RAD51 sobre los EAs, al igual que en zigotene (B), acumulándose principalmente en las regiones sinapsadas. La cantidad de focos comienza a descender durante paquitene temprano (C). El cromosoma X muestra una gran cantidad de estos focos en la región asináptica (flecha blanca) y el cromosoma Y₁ muestra también varios focos (flecha roja). En paquitene medio y tardío (D y E), la cantidad de focos es similar a la etapa anterior y aun se puede visualizar algunos en los cromosomas sexuales asociados a la PD (punta de flecha). En diplotene (F) RAD51 desaparece. Barra de escala 10 µm.

3.4. Inactivación de los cromosomas sexuales

En estudios previos se ha demostrado que los cromosomas sexuales de los marsupiales sufren un fenómeno de MSCI, similar al que ocurre en los mamíferos placentarios (Franco et al., 2007; Namekawa et al., 2007). A fin de corroborar estos resultados y ampliarlos, hemos llevado a cabo la localización de diversas proteínas implicadas en el MSCI durante la meiosis en el ualabí. En primer lugar, hemos estudiado la localización de γ H2AX, que como ya se ha explicado anteriormente, es un marcador excelente en el proceso MSCI y de la formación del cuerpo sexual.

En las primeras etapas de la profase (leptotene y zigotene temprano), la señal de γ H2AX se localiza sobre algunas regiones cromosómicas indicando la producción de DSBs (Figura 3.8A-B), pero no marca el núcleo completo de manera intensa como se ha descrito en varias especies de mamíferos placentarios (Baumann et al., 2011; de la Fuente et al., 2007; de la Fuente et al., 2012; Jin and Kim, 2017; Mahadevaiah et al., 2001; Page et al., 2012). En zigotene tardío la sinapsis se encuentra avanzada y podemos encontrar bivalentes unidos en toda su longitud y otros que aún tienen regiones sin sinapsar. La señal de γ H2AX se reduce en las regiones sinapsadas y permanece con mayor intensidad en las regiones que no han completado la sinapsis. En esta etapa es posible distinguir los cromosomas sexuales. Por un lado, se aprecia que la sinapsis entre el segmento autosómico del cromosoma X y el cromosoma Y₂ se encuentra frecuentemente retrasada (Figura 3.8C) y que el segmento que no ha completado la sinapsis aparece marcado con la señal de γ H2AX. Por otro lado, se puede apreciar

que el cromosoma Y_1 , que se mantiene distanciado del cromosoma X, también presenta un marcaje intenso de γ H2AX (Figura 3.8C y C'). En paquitene temprano (Figura 3.8 D y D') todos los autosomas y el cromosoma Y_2 se encuentran completamente sinapsados y sin marcaje de γ H2AX, hecho que continuará así en las etapas sucesivas. Mientras, el segmento diferencial del cromosomas X y el cromosoma Y_1 permanecen asinápticos y sus EAs comienzan a hacerse más gruesos y a mostrar las modificaciones descritas anteriormente. Al mismo tiempo, la señal de γ H2AX se concentra sobre ellos, mostrando un contorno irregular. En la etapa previa al contacto entre los cromosomas X e Y_1 (Figura 3.8E y E') la señal de γ H2AX es única y engloba ya a los dos cromosomas que están muy próximos. Finalmente, en paquitene medio (Figura 3.8F y F'), una vez que se establece la conexión entre el segmento diferencial del cromosoma X y el cromosoma Y_1 , el marcaje de γ H2AX adquiere un contorno bien delimitado, formando un cuerpo sexual completamente definido. Esta señal se mantiene en paquitene tardío (Figura 3.8G y G'), una vez que la PD está formada, y en diplotene (Figura 3.8H y H'), cuando comienza el desensamblaje del CS. Como se ha mencionado anteriormente, el segmento sináptico entre el cromosoma X y el Y_2 es el primero en mostrar evidencias de desinapsis (Figura 3.8H).

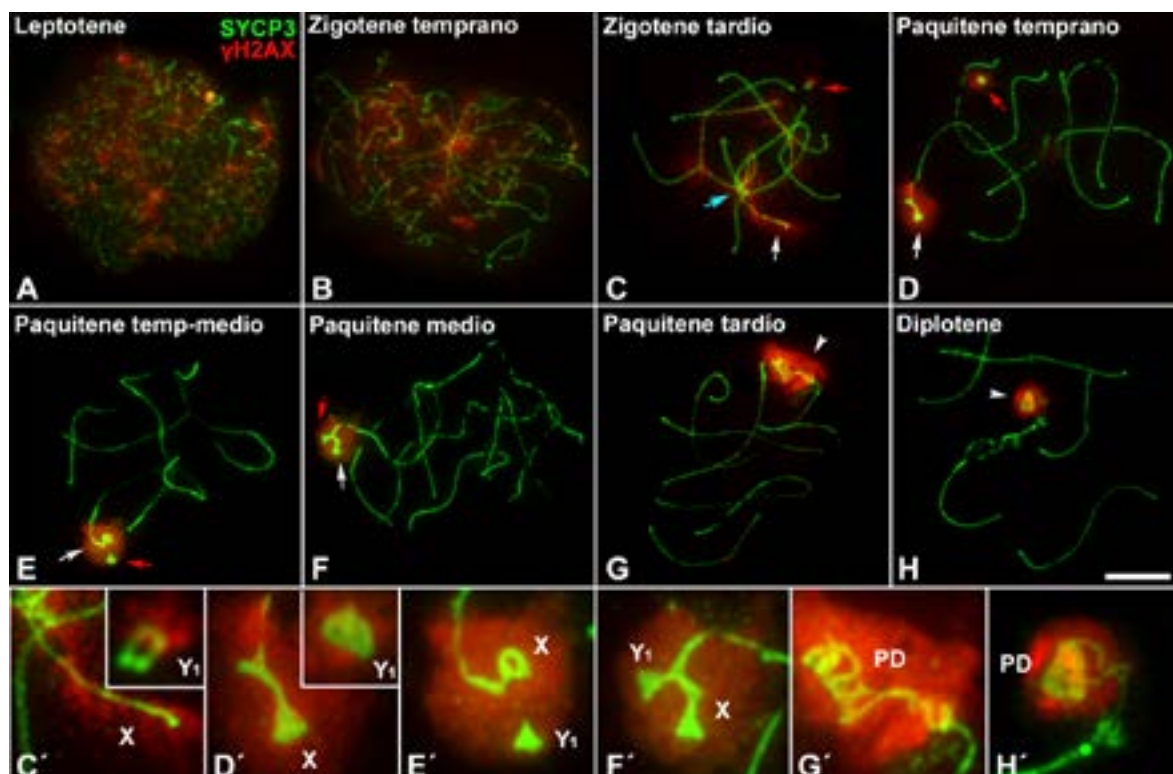


Figura 3.8. Patrón de localización de la proteína γ H2AX durante la profase-I en ualabí de pantano. Inmunolocalización de SYCP3 (verde) y γ H2AX (rojo) en esparcido de espermatocitos. Los cromosomas sexuales quedan indicados con flecha blanca el X y roja el Y_1 . (A) Leptotene y (B) zigotene temprano. γ H2AX se localiza por todo el núcleo de manera poco intensa, y se acumula especialmente en algunas regiones cromosómicas dispersas por el núcleo. (C) Zigotene tardío. γ H2AX marca las regiones cromosómicas que no han completado la sinapsis, principalmente el segmento diferencial del cromosoma X, el cromosoma Y_1 y el segmento que no ha completado la sinapsis del Y_2 (flecha azul). (D) Paquitene temprano. Desaparece el marcaje de γ H2AX sobre los autosomas, pero se observa una señal intensa e irregular sobre el segmento diferencial del cromosoma X y el cromosoma Y_1 . (E) Paquitene temprano-medio. El cromosoma Y_1 y el segmento diferencial del X se encuentran próximos, aunque sin contacto, pero la señal de γ H2AX aparece englobándolos a ambos. (F) Paquitene medio. El cromosoma Y_1 y el segmento diferencial del X han establecido un contacto por medio de filamento de SYCP3, mientras la señal de γ H2AX engloba a ambos cromosomas y presenta un contorno bien definido, formando un cuerpo sexual típico. (G) Paquitene tardío y (H) diplotene. Se forma la PD (punta de flecha) y se mantiene marcaje de γ H2AX sobre el cuerpo sexual. (C'-H') Detalles de los cromosomas sexuales desde zigotene tardío a diplotene. Barra de escala 10 μ m.

El patrón de localización de γ H2AX sobre los cromosomas sexuales se analizó también sobre preparaciones de espermaticitos obtenidas mediante la técnica de aplastado. Esto permitió observar una serie de características del proceso de apareamiento de los cromosomas sexuales que no habían sido reveladas en el análisis de esparcidos. Mediante esta técnica podemos ver los cromosomas en zigotene (Figura 3.9A) dispuestos en la típica configuración de *bouquet*, con sus telómeros polarizados hacia una región específica del núcleo. Las regiones que ya han apareado se muestran como pequeños segmentos terminales engrosados, en los que el marcaje de SYCP3 se muestra más grueso que las regiones desapareadas. La señal de γ H2AX está distribuida por todo en núcleo como hemos visto anteriormente, marcando más intensamente aquellas regiones donde los cromosomas no han completado la sinapsis.

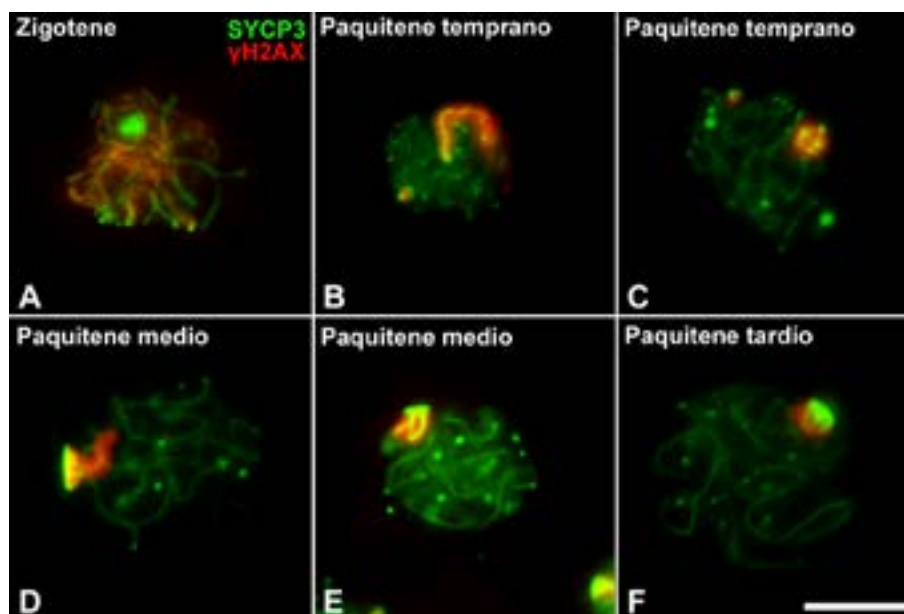


Figura 3.9. Localización de la proteína γ H2AX en ualabí de pantano. Inmunolocalización de SYCP3 (verde) y γ H2AX (rojo) durante profase-I en aplastados de espermaticitos. (A) Zigotene. SYCP3 marca las estructuras axiales que están polarizadas en configuración de bouquet, las regiones apareadas aparecen más gruesas que las que no lo están. γ H2AX está distribuida por todo en núcleo, marcando más intensamente algunas regiones. (B y C) Paquitene temprano. La sinapsis de los autosomas es completa y la señal γ H2AX se localiza en el trivalente sexual. (D y E) Paquitene medio. El cromosoma X se dobla sobre sí mismo y el Y queda inmerso en la PD marcada por SYCP3. La señal de γ H2AX se localiza sobre estos dos cromosomas y se extiende a lo largo del eje del cromosoma X. (F) Paquitene tardío. Tanto el cromosoma X, como el Y_1 permanecen asociados a la PD, que sigue marcada intensamente por γ H2AX. Barra de escala 10 μ m.

En paquitene temprano (Figura 3.9B) la polarización de los telómeros se ha perdido y los autosomas aparecen sinapsados en toda su longitud. γ H2AX se muestra como una nube intensa sobre el segmento del cromosoma X que no aparee, así como un segmento del cromosoma Y_2 , indicando que este cromosoma tiene la sinapsis más retrasada que el resto de los autosomas. Llama la atención la disposición del segmento diferencial del cromosoma X, que se encuentra estirado, y cuyo telómero no apareante se encuentra habitualmente muy alejado de la región centromérica, donde se encontraría el telómero proximal del cromosoma Y_2 (Figura 3.9C). El cromosoma Y_1 habitualmente ocupa una posición muy alejada o incluso opuesta sobre la superficie interna del núcleo. La configuración estirada del segmento diferencial del cromosoma X se puede observar

a veces incluso hasta la etapa en la que se inicia el contacto con el cromosoma Y_1 (Figura 3.9D). A partir de esta etapa se empieza a formar la PD, que con esta técnica presenta un aspecto mucho más similar al descrito previamente para otras especies de marsupiales. Se observa como una deposición de SYCP3 sobre la superficie interna del núcleo, con forma de disco, en la que quedan embebidos los extremos del cromosoma Y_1 y el extremo libre del cromosoma X (Figura 3.9E y F). La señal de γ H2AX se hace mucho más compacta en esta etapa y permanece así durante paquitene tardío (Figura 3.9F) y diplotene.

La incorporación de γ H2AX sobre los cromosomas sexuales, indica la formación de un cuerpo sexual y la presencia de un proceso de inactivación transcripcional (MSCI) de estos cromosomas. Para corroborar este fenómeno examinamos la actividad transcripcional del núcleo, mediante la localización de la RNA polimerasa-II. En etapas tempranas de la profase-I esta proteína es casi indetectable en el núcleo (Figura 3.10A y B) independientemente de la condición de sinapsis o asinapsis de los cromosomas. La señal comienza a detectarse al comienzo de paquitene, pero aún es débil y difusa, rodeando el CS de los bivalentes autosómicos que han completado la sinapsis (Figura 3.10C). En paquitene medio (Figura 3.10D) la intensidad del marcaje se incrementa de manera notable en todo el núcleo a excepción de la región ocupada por el segmento asináptico del cromosoma X y el cromosoma Y_1 . En etapas sucesivas, se muestra el mismo patrón, incrementándose la intensidad de la señal en paquitene tardío y diplotene (Figura 3.10E y F). De este modo se comprueba que la única región que queda sin este marcaje durante toda la profase-I es la comprendida por el segmento diferencial del cromosoma X y el cromosoma Y_1 , lo que indica que están sujetos a un fenómeno de inactivación (MSCI).

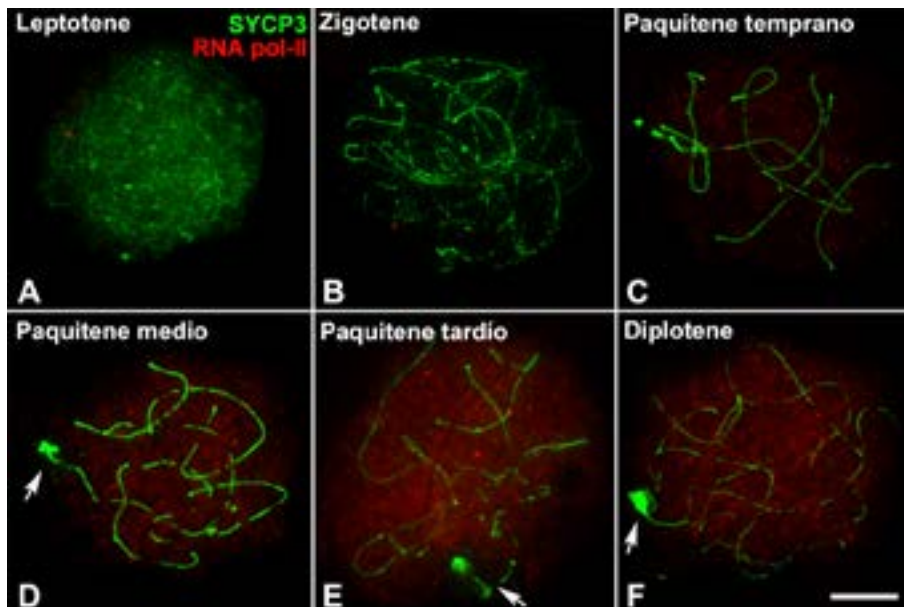


Figura 3.10. Patrón de la actividad transcripcional durante la profase-I en ualabí. Doble inmunolocalización de SYCP3 (verde) y RNA polimerasa-II (rojo) en espermocitos de espermatocitos. (A y B) Leptotene y zigotene. Los cromosomas aparecen separados, iniciando la sinapsis, y la señal de la RNA polimerasa-II es casi indetectable. (C) Paquitene temprano. Completada la sinapsis de los autosomas, comienza a aparecer la señal de RNA polimerasa-II de manera tenue y difusa. Esta señal se incrementa a partir de paquitene medio en adelante (D, E y F), quedando únicamente sin marcar la región de los cromosomas X- Y_1 que están unidos por medio de la PD (flecha). Barra de escala 10 μ m.

El proceso de MSCI está asociado a un conjunto de cambios epigenéticos que incluyen modificaciones de histonas, como la ausencia de histona H3 acetilada en la lisina 9 (H3K9ac). Para corroborar el patrón previamente descrito de la RNA polimerasa-II, estudiamos la localización de H3K9ac. La señal del H3K9ac es casi indetectable durante leptotene (Figura 3.11A), pero en este caso, la señal comienza a aparecer en la etapa de zigotene (Figura 3.11B). No obstante, el incremento se hace mucho más acusado a partir de paquitene temprano (Figura 3.11C) y la señal permanece muy intensa durante paquitene medio, tardío y diplotene (Figura 3.11D, E y F). En todas estas etapas la señal de la histona es muy tenue o nula sobre los el segmento diferencial del cromosoma X y el cromosoma Y_1 .

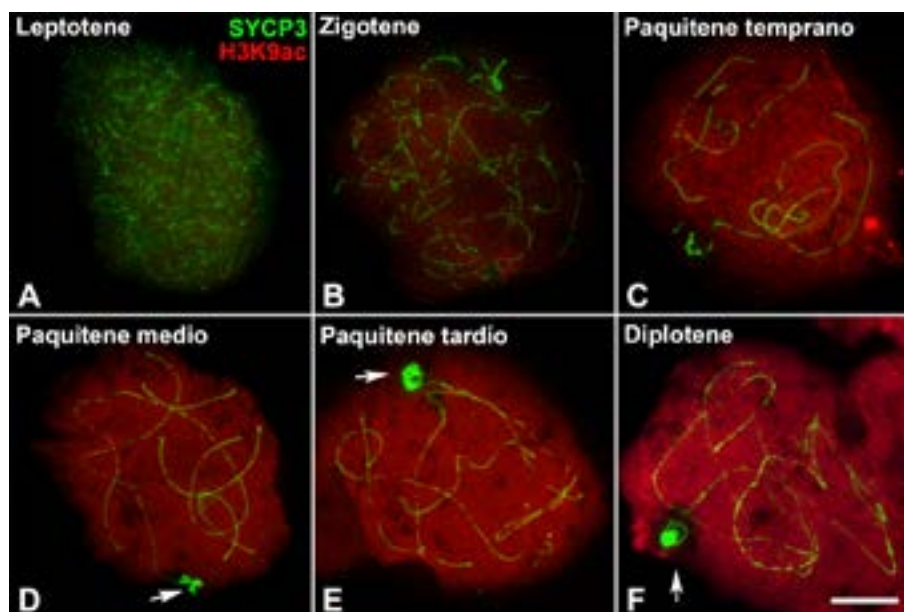


Figura 3.11. Distribución de la histona H3K9ac durante la profase-I en ualabí de pantano. Doble inmunolocalización de SYCP3 (verde) y H3K9ac (rojo) en esparcidos de espermatocitos. (A) Leptotene. Al comienzo de profase-I la señal de H3K9 es muy débil. (B) Zigotene. Comienza a aparecer el marcaje de la histona por todo el núcleo. (C) Paquitene temprano. La señal comienza a ser más intensa por todo el núcleo. Esta señal se incrementa a partir de paquitene medio en adelante (D, E y F), quedando únicamente sin marcar la región de los cromosomas X- Y_1 que están unidos por medio de la PD (flecha). Barra de escala 10 μ m.

3.5. Dinámica de segregación de los cromosomas sexuales

Una vez analizados los procesos de sinapsis, recombinación e inactivación de los cromosomas sexuales, se estudió el proceso de segregación de los mismos durante la primera división meiótica. Para ello se llevó a cabo una inmunolocalización SYCP3 y γ H2AX sobre aplastados de espermatocitos. Lamentablemente el marcaje SYCP3 no fue satisfactorio en las etapas posteriores a profase-I, lo que impidió realizar un análisis preciso de la asociación de los cromosomas sexuales y su orientación en las células en división. No obstante, la presencia de una marca intensa de γ H2AX sobre el cromosoma Y_1 y el segmento no apareante del cromosoma X permitió realizar una aproximación al proceso de segregación. El marcaje se combinó con la tinción con DAPI, para poder visualizar la localización de los cromosomas en las células en división.

En prometafase-I (Figura 3.12A) observamos los cromosomas condensados, pero todavía no completamente orientados en la placa metafásica. El segmento diferencial del cromosoma X y el cromosoma Y_1 quedan marcados intensamente por la señal γ H2AX. Se observa que en esta etapa el cromosoma Y_2 y el segmento autosómico del cromosoma se mantienen el contacto y quedan englobados en una misma masa de cromatina. En metafase-I podemos observar los bivalentes orientados en el ecuador celular. Los cromosomas X e Y_1 mantienen su asociación en algunas células, que posiblemente corresponden con metafases tempranas, pero ya se aprecia que cada cromosoma está orientado hacia un polo celular (Figura 3.12B). En otras metafases-I, probablemente más tardías, estos cromosomas han perdido la conexión. El cromosoma Y_1 , parece iniciar la segregación hacia un polo, mientras el X está orientado hacia el opuesto (Figura 3.12C). En casos muy favorables es posible distinguir el cromosoma Y_2 del resto de cromosomas. En estos casos hemos observado la presencia de un quiasma intersticial o distal entre este cromosoma y el segmento autosómico del cromosoma X (Figura 3.12C). En anafase-I (Figura 3.12D y E) se produce la migración de los cromosomas hacia los polos celulares, que finaliza en telofase-I (Figura 3.12F). Atendiendo a la señal de γ H2AX, se puede concluir que el cromosoma X y el cromosoma Y_1 siempre migran hacia polos opuestos y no se observan puentes de cromatina ni ninguna otra estructura que mantenga la asociación de estos cromosomas.

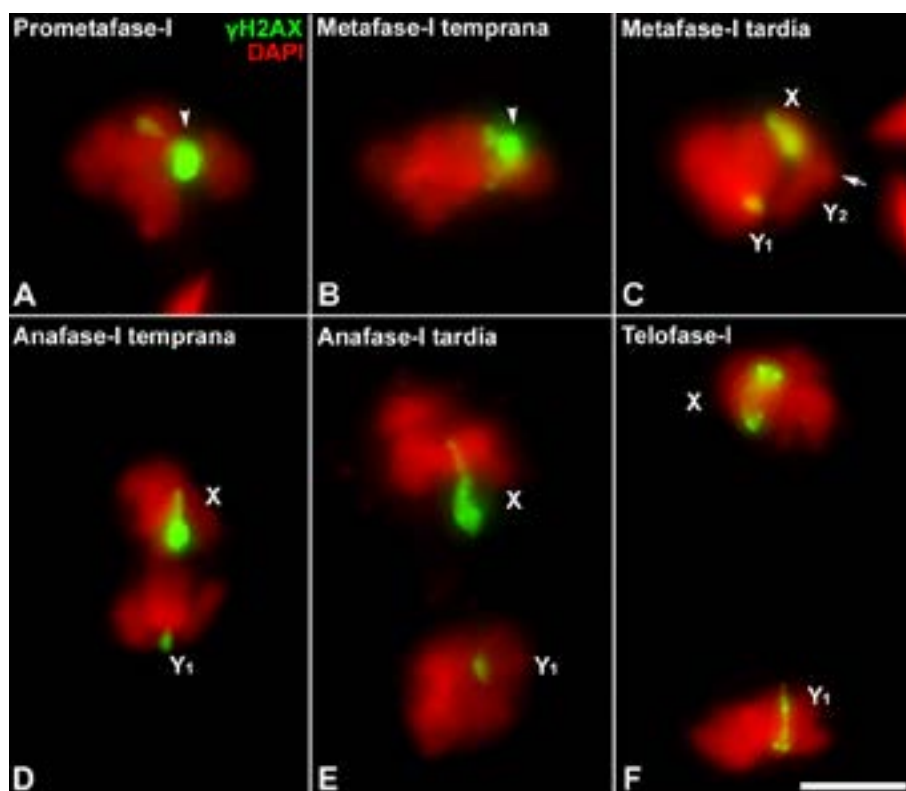
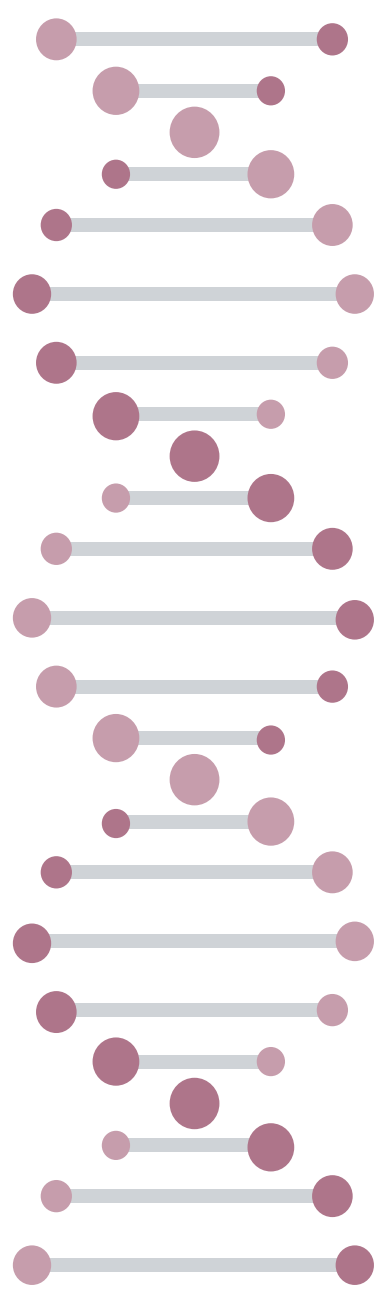


Figura 3.12. Proceso de segregación en la primera división meiótica en ualabí de pantano. Inmunolocalización de γ H2AX (verde) y tinción de DAPI (rojo) en aplastados de espermatocitos. (A) Prometafase-I. La tinción con DAPI muestra los cromosomas condensados, pero aun no orientados en la placa metafásica y γ H2AX muestra la localización de los cromosomas sexuales X-Y1 (punta de flecha). (B) Metafase-I temprana. Orientación del trivalente sexual en la placa metafásica (punta de flecha). (C) Metafase-I tardía. El cromosoma X aparece orientado hacia un polo, mientras que el cromosoma Y_1 se ha desplazado y ahacia el polo opuesto. El cromosoma Y_2 , que permanece unido al X mediante un quiasma (flecha blanca), aparece orientado hacia el mismo polo que el Y_1 . (D y E) Anafase-I. Los cromosomas homólogos segregan a polos opuestos. El cromosoma X y el Y_1 , con un intenso marcaje de γ H2AX segregan también a polos opuestos de la célula. (F) Telofase-I. Se observan dos cuerpos de cromatina completamente separados sin ninguna conexión, con los cromosomas sexuales X e Y_1 en polos opuestos. Barra de escala 10 μ m.



DISCUSIÓN

1

Distribución y dinámica de las cohesinas en la meiosis de monotremas

La clasificación de las etapas de profase-I está determinada habitualmente por el apareamiento y sinapsis de los cromosomas y por el ensamblaje y desensamblaje del CS. Clásicamente en los estudios de meiosis se utiliza como marcador la proteína SYCP3, por ser uno de los principales componentes de los EAs y LEs del CS ([Fraune et al., 2012](#)). Sin embargo, en los monotremas la caracterización de la sinapsis se ha llevado a cabo mediante el análisis de las cohesinas. La localización y distribución de los ECo y los EAs evidencian una estrecha relación entre ambas estructuras en mamíferos ([Eijpe et al., 2000](#); [Revenkova and Jessberger, 2005](#); [Revenkova and Jessberger, 2006](#)). Los componentes de los EA y del complejo de cohesina en mamíferos están relacionados hasta tal punto que se considera que SMC3, SMC1 β , STAG3 y REC8 podrían estar influyendo en la morfogénesis de los EAs ([Eijpe et al., 2003](#); [Lee, 2017](#); [Lee et al., 2003](#)). Nuestros resultados corroboran estudios previos en el ornitorrinco en relación a la localización de una de las principales proteínas del ECo, la cohesina SMC3 ([Casey et al., 2017](#)). Hemos observado que el patrón espacio-temporal SMC3 sigue la misma dinámica esperada para una proteína del EL: aparece en la etapa de leptotene formando ejes cortos y delgados y a medida que avanzan las células hacia zigotene estos ejes cromosómicos se hacen más largos y continuos; en paquitene, SMC3 se aprecia de manera continua y homogénea a lo largo de los cromosomas; y en diplotene permanece en el interior de los cromosomas, presumiblemente en la región entre las cromátidas hermanas. Estas evidencias y los antecedentes descritos nos permiten concluir que la inmunodetección de SMC3 es una herramienta válida para el seguimiento de la sinapsis en espermatocitos de monotremas.

Estudios previos han demostrado la formación de complejos de cohesina con diferente composición, distribución, dinámica y funciones durante la meiosis, tanto en insectos ([Valdeolmillos et al., 2007](#)) como en ratón ([Ishiguro, 2019](#); [Revenkova and Jessberger, 2005](#); [Suja and Barbero, 2009](#)). Tanto en el caso del ornitorrinco como del equidna, el estudio comparado de SMC3, SMC1 α , SMC1 β , STAG3 y REC8 muestra que no existen diferencias marcadas en la distribución temporal de unas cohesinas respecto a otras. En primer lugar, nuestros resultados indican que todas las cohesinas estudiadas se cargan sobre los cromosomas en la etapa de leptotene. Igualmente, hemos observado que todas las cohesinas permanecen asociadas a los cromosomas en etapas tardías, aparentemente en la región entre las cromátidas hermanas de cada cromosoma. Este patrón temporal es ligeramente diferente al descrito en otras especies como el ratón, en el cual la variante meiótica SMC1 β y la cohesina SMC3 permanecen durante toda la división meiótica, incluso después del desensamblaje del CS, mientras que SMC1 α se detecta sólo hasta diplotene ([Revenkova et al., 2001](#)). Estos resultados podrían indicar que en los monotremas no hay una

diferenciación funcional de las dos isoformas de SMC1 y que ambas cohesinas se requieren hasta etapas tardías de la profase-I y la prometafase-I. La disociación secuencial de cohesinas también se ha descrito en ratón para las kleisinas, ya que RAD21L se disocia de los brazos de los cromosomas después de diplotene, mientras que RAD21 y REC8 se disocian de los brazos en anafase-I ([Herran et al., 2011](#); [Ishiguro, 2019](#); [Parra et al., 2004](#)). Lamentablemente, en nuestro estudio no pudimos obtener resultados concretos de las proteínas RAD21 y RAD21L, de modo que no es posible hacer una comparación con el patrón temporal de REC8.

Donde sí se han encontrado diferencias es en el patrón espacial de distribución de algunas de las cohesinas analizadas, aunque solamente en ornitorrinco. En el estudio de STAG3 se encontró que esta cohesina se acumula transitoriamente en la región centromérica de cada uno de los bivalentes autosómicos y además la señal de SYCP1 queda interrumpida en ese punto. Esto indica una organización especial de los centrómeros del ornitorrinco. La interrupción de la señal de SYCP1 es indicativa de que en las regiones centroméricas no se ensambla EC del CS. En algunas especies de mamíferos placentarios como los ratones pigmeos o los topillos asiáticos se ha encontrado una característica similar ([Gil-Fernández et al., 2020](#); [Matveevsky et al., 2020](#)). En estas especies está bien caracterizado que varios cromosomas se han originado como producto de fusiones Robertsonianas ([Matveevsky et al., 2020](#); [Veyrunes et al., 2014](#)), de modo que es posible que los puntos de fusión tengan una organización genómica y estructural tal que no promueven el ensamblaje completo del CS. Una circunstancia parecida podría estar ocurriendo en ornitorrinco. Aunque no se tienen datos sobre el origen Robertsoniano de los cromosomas en esta especie, en algunas regiones centroméricas aparecen frecuentemente señales dobles con el suero anti-centrómero (Figura 1.4). La presencia transitoria de la cohesina STAG3 en dichas regiones centroméricas podría jugar un papel especial en la protección u organización de dichas regiones. Existen evidencias de que STAG3 es una cohesina meiótica necesaria para la formación del eje cromosómico y que en ausencia de STAG3 no hay sinapsis entre los cromosomas homólogos y la cohesión de las cromátidas hermanas centroméricas está deteriorada aunque no erradicada ([Winters et al., 2014](#)). Es posible que STAG3 esté cumpliendo una función de unión de los brazos cromosómicos y protección de la región centromérica, especialmente ante la ausencia de SYCP1.

Por otro lado, la diferencia más notable en el patrón de distribución espacial es la presencia muy reducida de REC8 en los cromosomas sexuales y en regiones autosómicas asinápticas del ornitorrinco. Esta diferencia se discute con mayor extensión en el siguiente apartado.

1.1. Acumulación de cohesinas en los cromosomas sexuales del ornitorrinco

En un trabajo previo, Casey y colaboradores describieron un reclutamiento masivo de cohesinas sobre los cromosomas sexuales del ornitorrinco ([Casey et al., 2017](#)). En este estudio se analizó principalmente la distribución de la proteína SMC3, y de manera muy poco detallada

la de STAG3. En su estudio, los autores dividieron la etapa de paquitene en 8 subetapas, en las que se podían apreciar diferencias sutiles en el patrón de localización de SMC3. En este estudio hemos propuesto una clasificación de cuatro subetapas acorde con los cambios en los ECos de los cromosomas sexuales que no sinapsan y analizando cinco subunidades de cohesinas. Consideramos que esta clasificación es suficiente para entender la mayor parte de los procesos importantes que ocurren en paquitene: 1) ECos de los sexuales inicialmente sin diferenciación estructural; 2) acumulación de cohesinas en los cromosomas sexuales y diferenciación respecto a los autosomas; 3) desarrollo de engrosamientos muy conspicuos de los ECos de los cromosomas sexuales; y 4) acumulación de las cohesinas en estructuras irregulares en el núcleo.

Nuestros resultados muestran características del proceso de acumulación de cohesinas que no han sido descritas hasta ahora. La primera es que la acumulación no es un fenómeno exclusivo de los cromosomas sexuales, sino que afecta también a las regiones autosómicas que no han completado la sinapsis en la transición entre paquitene temprano y medio. Esta circunstancia concuerda con las modificaciones descritas en la organización de los EAs de los cromosomas asinápticos en otros mamíferos. Es un hecho bien caracterizado que los EAs de los cromosomas sexuales muestran una diversidad de modificaciones (engrosamientos, excrescencias, desdoblamiento en filamentos), que derivan principalmente de su condición asináptica ([Solari, 1974](#); [Tres, 1977](#)). Algunas de estas modificaciones también son frecuentes en los autosomas cuando estos no completan la sinapsis ([de Boer et al., 1986](#); [Peters et al., 1997](#)). Dados estos antecedentes, no es sorprendente encontrar que los autosomas y los cromosomas sexuales se encuentran sujetos a las mismas modificaciones de los ECos en la meiosis de ornitorrinco. Por esta razón, sería esperable encontrar que las regiones de los cromosomas sexuales que sí completan la sinapsis (regiones PAR) no estuvieran sujetas a la acumulación de cohesinas, como de hecho se ha encontrado ([Casey et al., 2017](#)). En este estudio hemos intentado caracterizar morfológicamente la posición y organización de estas regiones PAR (Figura 1.3), pero la complejidad de la cadena de cromosomas sexuales y la morfología enmarañada del núcleo durante paquitene han impedido poder analizar detalladamente esta organización.

La distribución de cohesinas sobre los cromosomas que no han completado la sinapsis no ha sido estudiada de manera extensiva en otras especies, aunque sí se han documentado algunos antecedentes que parecen indicar una variabilidad al respecto. Así en ortópteros con un sistema de cromosomas sexuales XX/X0, el univalente sexual en los machos muestra una señal de SMC3 análoga a la de los autosomas, sin acumulaciones evidentes ([Valdeolillos et al., 2007](#)). Igualmente, en hemípteros con un sistema XX/XY los cromosomas sexuales presentan ECos muy tenues o casi indetectables ([Page et al. 2006](#); [Pigozzi and Solari, 2003](#)). También, en espermatoцитos de rata ([Eijpe et al., 2000](#)) o armadillo ([Sciurano et al., 2012](#)), el marcaje de SMC3 en los cromosomas sexuales no muestra acumulaciones evidentes. Por el contrario, en otros mamíferos la intensidad de la señal de SMC3 en los cromosomas sexuales es mayor a la de los autosomas, como ocurre en el caso del caballo ([Baumann et al., 2011](#)). Igualmente, en ratón se ha visto que no solo SMC3, sino también STAG3 y RAD21 aparecen más acumuladas sobre los cromosomas sexuales, acompañando el engrosamiento típico de los EAs ([Page et al., 2006a](#)).

A pesar de estos antecedentes, la acumulación de cohesinas en el ornitorrinco parece ser mucho más intensa que en cualquiera de las especies estudiadas hasta ahora. Se podría especular que dicha acumulación tenga relación con un mecanismo de asociación que pudiera mantener unida la extensa cadena cromosómica y favorecer la correcta segregación de los cromosomas sexuales durante la primera división meiótica. Sin embargo, el hecho de que desaparezca durante la etapa de diplotene descarta esta posibilidad. Al igual que en el caso de otros mamíferos, es más plausible que esta acumulación tenga que ver con la modificación estructural de los EAs asinápticos. Esto abre interrogantes acerca de la localización molecular de estos complejos de cohesinas y su interacción con otros componentes proteicos de los cromosomas meióticos. Es poco probable que esta acumulación esté relacionada con el mantenimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas, la actividad de reparación del DNA o la regulación de la transcripción. Es más factible un papel estructural en el empaquetamiento de la cromatina o simplemente una interacción con otras proteínas estructurales.

La acumulación de cohesinas sobre los cromosomas sexuales y los autosomas desapareados se observa para todas las proteínas estudiadas excepto REC8. Esta diferencia también está en consonancia con estudios previos. En el hemíptero *Triatoma infestans* REC8 no se detecta sobre los cromosomas sexuales, que permanecen asinápticos durante la profase-I ([Pigozzi and Solari, 2003](#)). Sin embargo, estos cromosomas sí presentan un marcaje con SMC3 tanto en *T. infestans* (datos no publicados de nuestro laboratorio) como en *Graphosoma italicum* ([Viera et al., 2017](#)). Igualmente, en ratón la señal de REC8 sobre los EAs desapareados de los cromosomas sexuales es notablemente más tenue que sobre el resto de los autosomas o la región sinapsada del PAR ([Page et al., 2006a](#)). Esto indica un comportamiento peculiar de esta cohesina, que podría estar conservado evolutivamente. Como se ha comentado anteriormente, no pudimos analizar la distribución de RAD21 ni RAD21L para comprobar si las otras kleisinan muestran un comportamiento similar.

1.2. Regiones asinápticas autosómicas acumulan cohesinas en el ornitorrinco

Nuestro estudio muestra un comportamiento de regiones autosómicas asinápticas similar al comportamiento de los cromosomas sexuales, algo que no se había caracterizado en estudios previos ([Casey et al., 2017](#)). Este comportamiento se traduce igualmente en una acumulación de todas las cohesinas estudiadas en este trabajo, a excepción de REC8. Un análisis detallado reveló que la acumulación se produce siempre en las regiones cercanas al centrómero, contabilizando hasta un máximo de cuatro autosomas con esta característica por núcleo. El tamaño del cromosoma y la posición del centrómero sugieren que podría tratarse siempre de los mismos cromosomas. También hemos observado que las regiones asinápticas de los dos homólogos en cada bivalente muestran diferencias de longitud, lo que puede estar poniendo de manifiesto un polimorfismo cercano a la región centromérica. Aun cuando no es posible hacer un estudio

poblacional detallado en este caso, hay que indicar que este fenómeno se encontró en los 5 individuos estudiados. Una posible explicación para este comportamiento es la presencia de ligeras diferencias en la longitud de los cromosomas alrededor del centrómero. Este fenómeno puede originarse como consecuencia de translocaciones Robertsonianas en las que existen variaciones poblacionales en los puntos de fusión ([Garagna et al., 2014](#)). Es posible especular que en estas circunstancias existan pequeños desajustes en la sinapsis, lo que explicaría el retraso de la misma de estas regiones concretas, así como el ligero desplazamiento de los centrómeros homólogos. No obstante, estas regiones pueden completar la sinapsis durante etapas más avanzadas de paquitene, en un fenómeno de ajuste sináptico similar al descrito previamente en otros mamíferos portadores de reordenamientos cromosómicos ([Moses and Poorman, 1981](#)). La presencia de este tipo de reordenamientos podría estar relacionado con la ausencia de SYPC1 en los centrómeros, discutida más arriba.

1.3. Diferencias entre los cromosomas sexuales del ornitorrinco y el equidna

Como ya se ha explicado, la cadena de cromosomas sexuales es diferente entre el ornitorrinco y el equidna de hocico corto, ya que este último presenta un cromosoma Y menos que el ornitorrinco, debido a una fusión Y5-Y3 ([Rens et al., 2007](#)). En cualquiera de los dos casos, ambas cadenas cromosómicas muestran grandes regiones heterólogas, y por lo tanto no sinapsan completamente. Sin embargo, es muy llamativo el hecho de que en el equidna no haya cambios morfológicos en sus ECos ni acumulaciones de cohesinas en las regiones asinápticas de la cadena cromosómica sexual. El patrón de distribución de todas las cohesinas estudiadas en el equidna es muy similar entre los cromosomas sexuales y los autosómicos, sin diferencias claras entre ellos. De hecho, la ausencia de modificaciones hace indistinguibles los cromosomas sexuales del resto de cromosomas con estos marcadores.

A pesar de que las cohesinas están altamente conservadas en mamíferos y desempeñan tanto un papel de cohesión entre cromátidas hermanas como el establecimiento de una estructura de soporte en los cromosomas, en la meiosis de mamíferos se producen distintos tipos de complejos de cohesinas, mediante la combinación de subunidades específicas. Estas combinaciones diferentes dotan al complejo de cohesinas con funciones diferentes ([Ishiguro, 2019](#); [Muller et al., 2018](#); [Suja and Barbero, 2009](#)). Es posible que en el ornitorrinco se produzca la formación de complejos o agregados distintos a los del equidna, que tengan como resultado la formación de engrosamientos en el primer caso y no en el segundo. En todo caso, el comportamiento diferencial de los cromosomas sexuales entre ambas especies indica que este rasgo (o su pérdida) se habría originado después de la divergencia entre los dos grupos de monotremas hace unos 50 MA.

2

Composición y dinámica del complejo sinaptonémico en monotremas

La estructura y el modo de ensamblaje del CS está muy conservado desde las levaduras hasta humanos ([Gao and Colaiácovo, 2018](#); [Page and Hawley, 2004](#); [von Wettstein et al., 1984](#)). Sin embargo, las proteínas que forman parte del mismo conservan poca homología entre ellas ([Fraune et al., 2016](#)). No obstante, en vertebrados existe cierto grado de homología conservado desde peces hasta mamíferos ([Baier et al., 2007](#); [Iwai et al., 2006](#)). De todas las proteínas que componen el CS, SYCP3 es la más conservada ([Fraune et al., 2013](#); [Fraune et al., 2012](#)). Debido a esta conservación, los anticuerpos contra la proteína SYCP3 han sido muy útiles para localizar esta proteína no solo en mamíferos modelo como el ratón o el humano, sino en una amplia variedad de especies de mamíferos placentarios, marsupiales, reptiles e incluso aves ([Guioli et al., 2012](#); [Lisachov et al., 2019](#); [Mary et al., 2014](#); [Page et al., 2003](#); [Yang et al., 2011](#)). Sin embargo, en el caso del ornitorrinco, los anticuerpos habitualmente utilizados no dieron un marcaje específico. Esto podría ser debido a una mayor divergencia de la proteína SYCP3 en esta especie, o al menos de las regiones reconocidas por los anticuerpos. En este sentido, hay que resaltar que el genoma del ornitorrinco contiene tres copias del gen de SYCP3. Dos de ellas son autosómicas, identificadas como SYCP3 y SYCP3-like ([Casey et al., 2015](#)), mientras que la tercera está situada en uno de los cromosomas Y (SYCP3-Y) lo que indica que es exclusiva de la meiosis de machos ([Casey et al., 2015](#); [Cortez et al., 2014](#)). Las bases de datos genómicas actualizadas indican que las dos copias autosómicas se localizan en el cromosoma 14 (LOC103170793 y LOC100075461) y la tercera se encuentra en el cromosoma Y3 (LOC114808679).

Ante la falta de reacción de los anticuerpos comerciales contra SYCP3 en ornitorrinco, decidimos producir nuevos anticuerpos específicos para cada una de las tres isoformas y con esto poder inmunolocalizar los ELs del CS de esta especie. El análisis de la distribución espacial y temporal de estas tres proteínas ha revelado características inesperadas sobre la dinámica de ensamblaje del CS en ornitorrinco. En primer lugar, observamos que el patrón de localización de SYCP3 y SYCP3-like es similar durante la profase-I, pero lo más relevante es que la presencia de estas proteínas no se detecta hasta el final de zigotene, lo que indicaría un retraso en la formación de los ELs en comparación con otros mamíferos. A partir de paquitene la distribución de estas proteínas se produce a lo largo de todo el eje cromosómico de los autosomas, y se detecta débilmente en los segmentos de los cromosomas sexuales que no completan la sinapsis. Además, en un análisis paralelo con la proteína SYCP1, pudimos comprobar que en el ensamblaje de los FTs parece ser previo al de SYCP3 y SYCP3-like. Estos resultados muestran una dinámica de ensamblaje del CS diferente a la descrita en otros mamíferos. En la mayoría de las especies la organización de los EAs y la incorporación de SYCP3 comienza en la etapa de leptotene (Figura 4.1A). Igualmente, los diferentes componentes del complejo de cohesina se incorporan a lo largo de los cromosomas en leptotene formando los ECos, si bien algunas proteínas, como SMC1 β , comienzan a ser detectadas en la fase S premeiótica ([Baarends and Grootegoed, 2003](#); [Costa et al., 2005](#); [Eijpe et al., 2003](#); [Fraune et al., 2014](#); [Fraune et al., 2012](#); [Heyting, 1996](#);

[Ollinger et al., 2005](#); [Page and Hawley, 2004](#); [Rog et al., 2017](#); [Schramm et al., 2011](#); [Yang et al., 2006](#)). La formación de los EAs y los ECos parece ocurrir en todos los casos de manera simultánea en los autosomas y los cromosomas sexuales.

Las diferencias en la incorporación de SYCP3 en ornitorrinco abren varias posibilidades interesantes para entender la secuencia y la jerarquía en la formación de las estructuras axiales de los cromosomas meióticos. En primer lugar, sugieren que los ECos se pueden formar en ausencia de uno de los componentes principales de los EAs. Este fenómeno se ha puesto de manifiesto en estudios previos, ya que en los ratones knockout de SYCP3 y SYCP2 los componentes del complejo de cohesina son capaces de dar lugar a segmentos de ECos ([Novak et al., 2008](#); [Yang et al., 2006](#); [Yuan et al., 2000](#)). No obstante, en los ratones mutantes estas estructuras no se forman correctamente y aparecen como fragmentos mucho más cortos de lo habitual. Por el contrario, en ornitorrinco los ECos se forman con normalidad, indicando que este proceso no es dependiente de la formación completa de los EAs.

En segundo lugar, el ciclo de localización de HORMAD1 sugiere que el control de la maduración de los EA es distinto. En mamíferos placentarios las proteínas HORMAD1 y 2 se acumulan sobre los EAs desapareados en leptotene, se eliminan de los mismos a medida que se produce la sinapsis en zigotene y reaparecen en diplotene cuando comienza la desinapsis ([Fukuda et al., 2010](#); [Wojtasz et al., 2009](#)). En cambio, en ornitorrinco HORMAD1 solamente se hace detectable sobre las regiones de los cromosomas que no han completado la sinapsis a partir de paquitene, es decir, después de que los EAs han incorporado la proteína SYCP3. Estos resultados cuestionan el papel de las proteínas HORMAD en la regulación de la sinapsis en ornitorrinco y su localización parece responder más bien a una respuesta secundaria a la asinapsis. No hemos podido corroborar si HORMAD1 se asocia a los cromosomas de ornitorrinco en diplotene.

En tercer lugar, la aparición de SYCP1 y el comienzo de la sinapsis previo a la incorporación de SYCP3 sugiere que la unión de los FTs puede ocurrir directamente sobre los ECos, o sobre unos EAs que no han incorporado las proteínas SYCP3 y SYCP3-like. Nuevamente, estudios previos sobre la dinámica del CS en mutantes de SYCP3 indican la posibilidad de que se puedan formar pequeños fragmentos del EC del CS en mutantes para SYCP3, aunque nuevamente son muy cortos y dispersos ([Pelttari et al., 2001](#)). No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que otros componentes de los EAs sí se incorporen a los cromosomas desde la etapa de leptotene y den cuenta de la formación inicial de los EAs. En este sentido, la proteína SYCP2 se ha revelado como un componente esencial de los EAs/ELs ([Fraune et al., 2014](#); [Yang et al., 2006](#)). Dado que en ornitorrinco hay un gen para SYCP2 sería interesante poder analizar la distribución de esta proteína durante la meiosis.

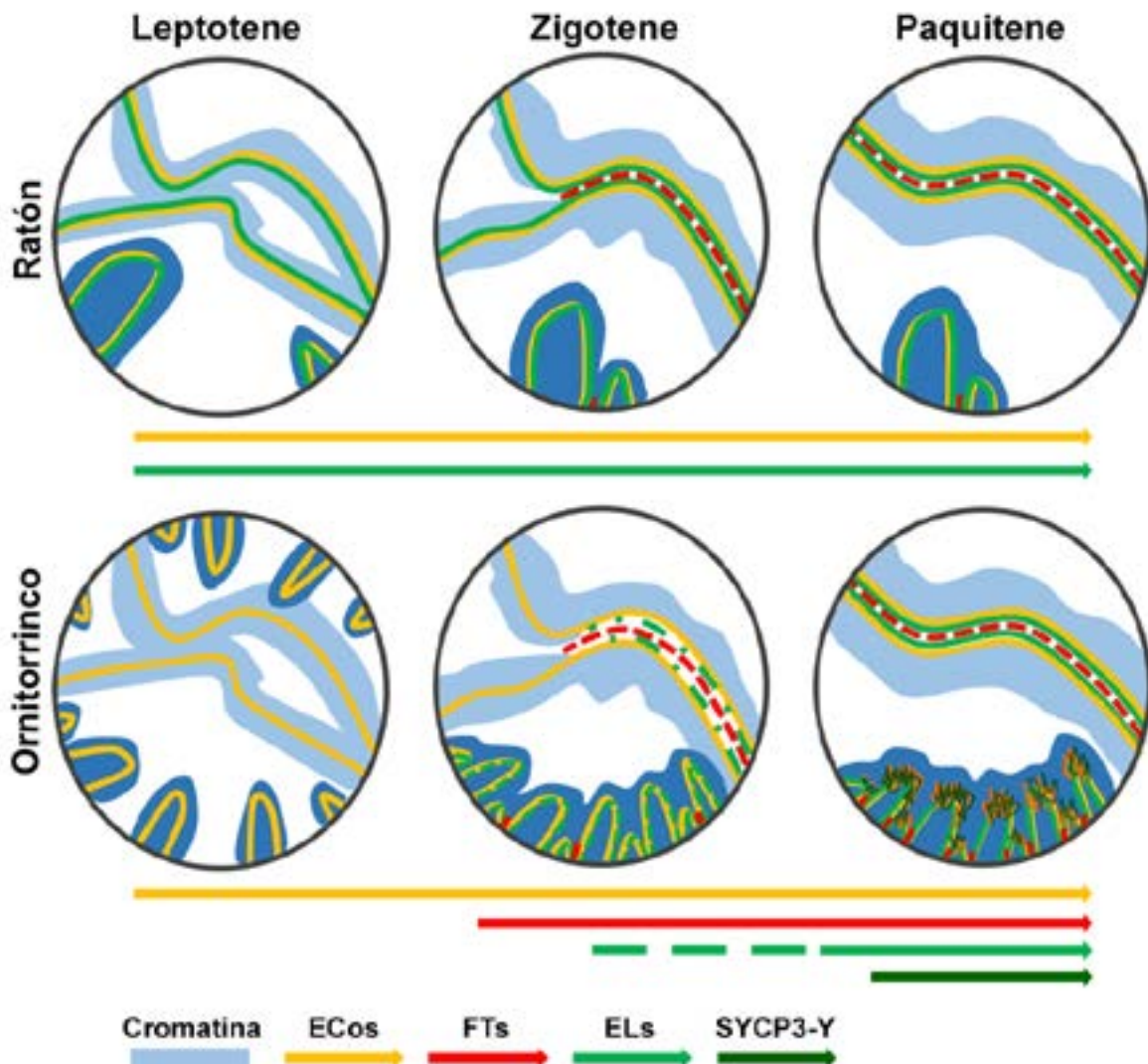


Figura 4.1. Esquema comparativo de la distribución de cohesinas y componentes del CS en el ratón y en el ornitorrinco. (A) Formación del CS el ratón. En leptotene se forman simultáneamente los ECos y los EAs. A partir de zigotene empiezan a ensamblarse los FTs sobre los autosomas y los cromosomas sexuales y comienza el proceso de sinapsis. Finalmente, en paquitene se ha completado el ensamblaje del CS en toda la longitud de los autosomas y parcialmente en los cromosomas sexuales (restringida su región PAR), dando por completado el proceso de sinapsis. (B) Formación retrasada del CS en el ornitorrinco. En leptotene solo se observan los ECos. En zigotene comienza la incorporación de los FTs, incluso antes que la incorporación de las proteínas SYCP3/SYCP3-like en los ELs, que se depositan tardíamente y de forma tenue. En paquitene se completa la sinapsis en los autosomas, con la distribución de SYCP3/SYCP3-like a lo largo de todos los ELs. En esta etapa se produce la acumulación de la proteína SYCP3-Y en las regiones asinápticas de los cromosomas sexuales. Cada línea de color muestra la temporalidad en la que se detectan los diferentes componentes del ECos y CS. Azul: bucles de cromatina; Amarillo: eje de cohesinas; Rojo: filamentos transversos (SYCP1); Verde claro: ELs (SYCP3 y SYCP3-like); Verde oscuro: SYCP3-Y.

Por otro lado, el análisis de SYCP3-Y revela que esta isoforma tampoco aparece en etapas tempranas de la profase-I, sino que es detectada sobre los cromosomas a partir de paquitene temprano. Esto revela una dinámica similar para todas las isoformas de SYCP3. Pero sin duda lo más relevante es que SYCP3-Y se acumula de manera preferencial, sobre las regiones asinápticas de los cromosomas sexuales y también de los autosomas. La acumulación de componentes de los EAs en las regiones no sinapsadas de los cromosomas sexuales es un fenómeno recurrente en mamíferos (de la Fuente et al., 2007; de la Fuente et al., 2012; Page et al., 2003; Solari, 1974).

Como se ha explicado anteriormente, este fenómeno viene acompañado de la formación de engrosamientos y excrecencias en los EAs, así como la separación de los EAs en varios filamentos irregulares ([de la Fuente et al., 2007](#); [Solarí, 1974](#)). La acumulación de SYCP3-Y es análoga a la encontrada con las diferentes cohesinas y la morfología de alta resolución muestra que en ambos casos se trata de una acumulación más bien reticulada y no filamentosa. Sin embargo, la acumulación de SYCP3-Y precede a la de las cohesinas. Una posible explicación para este hecho es que la presencia de SYCP3-Y en los segmentos despareados de los autosomas y los cromosomas sexuales es necesaria para la subsecuente acumulación de las diferentes cohesinas.

Finalmente, hay que recordar que el gen de SYCP3-Y se localiza en el cromosoma Y_3 . Si se comprobara que el gen no tiene homólogo en ninguno de los cromosomas X, este comportamiento de las regiones asinápticas podría ser exclusivo de la meiosis masculina. Sería tremendamente interesante, aunque difícilmente realizable, estudiar la meiosis femenina en esta especie.

2.1. El complejo sinaptonémico del equidna también muestra un retraso en su formación

Al igual que en el caso del ornitorrinco, los anticuerpos comerciales contra SYCP3 no dieron reacción en el equidna. Aunque el genoma completo del equidna no ha sido secuenciado todavía, diversos estudios demuestran que la SYCP3 de equidna y de ornitorrinco tienen algunas regiones que están poco conservadas, por lo que es plausible que existan también diferencias marcadas con las proteínas de mamíferos placentarios contra las que se producen los anticuerpos comerciales ([Casey et al., 2015](#); [Cortez et al., 2014](#)).

En todo caso, los anticuerpos contra las proteínas SYCP3 obtenidos para ornitorrinco mostraron una inmunoreacción adecuada en equidna. Estos resultados han servido para identificar un patrón similar de localización espacial y temporal entre SYCP3 y SYCP3-like, que solo se detectan desde zigotene tardío en adelante. Esto implica que la incorporación retardada de SYCP3 a los EAs, o incluso el retraso en la formación de los EAs, es una característica compartida entre ambas especies, indicando que puede tratarse de un fenómeno ancestral. Esto está en consonancia con los resultados recientemente encontrados en otros vertebrados. En el pez cebra, se ha caracterizado que la formación de las estructuras axiales (EAs y ECos) ocurre en leptotene de manera polarizada, iniciándose en las regiones de los cromosomas que confluyen en la región donde se forma el *bouquet*, y extendiéndose posteriormente se al resto de la longitud de los cromosomas ([Blokina et al., 2019](#)). Una polarización similar se ha encontrado en la meiosis de reptiles ([Spangenberg et al., 2017](#)). En el caso del equidna, se ha encontrado igualmente que el ensamblaje de los ECos ocurre de manera preferencial en la zona del bouquet, pero los EAs se forman mucho más tarde. Sería por tanto muy interesante extender los estudios sobre la dinámica de formación de los EAs y los ECos a otras especies de vertebrados con el fin de encontrar si estas características pueden constituir un modo ancestral de ensamblaje del CS en vertebrados.

En equidna, al igual que en el ornitorrinco, se encontró un marcaje diferencial de las regiones asinápticas con SYCP3-Y. Esto está en relación con lo encontrado en los cromosomas sexuales de la mayoría de los mamíferos y refuerza la idea de que en situaciones de asinapsis se producen modificaciones de los EAs. Sin embargo, la ausencia de acumulación con las cohesinas diferenciadas en este proceso en comparación con el ornitorrinco, o incluso con lo encontrado en ratón ([Page et al., 2006a](#)), pone de manifiesto una característica particular de esta especie.

En definitiva, nuestros resultados muestran una dinámica y comportamiento de los componentes del complejo de cohesinas y CS en monotremas que no se había descrito hasta día de hoy en otros mamíferos. Por un lado, revelan que el proceso de apareamiento y sinapsis puede iniciarse de manera habitual sobre los ECos, en ausencia de los EAs, algo que solo se había encontrado en mutantes de ratón ([Kouznetsova et al., 2005](#)). Pero no se había demostrado en individuos normales. En segundo lugar, muestran un retraso en el patrón de formación de los EAs. Por último, la presencia de tres isoformas de SYCP3 parece haber permitido cierta diferenciación funcional entre ellas.

3

El ciclo de recombinación muestra dos patrones diferentes en ornitorrinco

La reparación del DNA es un fenómeno fundamental para el mantenimiento del genoma y para el correcto funcionamiento de la meiosis. Hasta ahora los estudios de recombinación en mamíferos se han centrado en placentarios. Sin embargo, al igual que en el caso del CS, un estudio de este proceso en especies diferentes de mamíferos puede aportar nueva información en el proceso de reparación del DNA.

En ambas especies de monotremas encontramos en primer lugar un patrón de recombinación similar al encontrado en otros mamíferos, caracterizado por la aparición de un elevado número de focos de las proteínas RPA y RAD51 en etapa tempranas de profase-I. En concordancia con estudios en mamíferos placentarios, la cantidad de focos de RPA es mayor que la de RAD51 ([Cohen et al., 2006](#); [Chen and Wold, 2014](#)), siendo más destacable la diferencia entre ellas en el ornitorrinco. Además, la dinámica de estas proteínas es ligeramente diferente entre las dos especies, ya que en el ornitorrinco ambas proteínas muestran una trayectoria ascendente y después descendente, sin embargo, en el equidna el número máximo de focos se alcanza en leptotene.

Lo que se puede afirmar es que estos eventos de recombinación se resuelven de manera muy temprana. En el caso del ornitorrinco, todos los focos desaparecen antes de que ocurran las modificaciones morfológicas en sus cromosomas sexuales. En equidna, aun cuando no hay modificaciones de los cromosomas, aparentemente también desaparecen tempranamente. Además, el conjunto de los resultados de RPA y RAD51 indican que no existe un retraso apreciable

en la dinámica de reparación del DNA en los cromosomas sexuales. Esto contrasta con lo encontrado en otros mamíferos placentarios, en los que los cromosoma sexuales muestran un retraso notable en la resolución de los intermediarios de recombinación ([Ashley et al., 1995](#); [Moens et al., 2002](#); [Page et al., 2012](#)). En los monotremas los cromosomas sexuales se comportan de manera similar al resto de cromosomas. Esto abre interrogantes interesantes en relación a la reparación de las regiones de los cromosomas sexuales que no tienen homología. Por otro lado, plantea la posibilidad de que en los monotremas los eventos de recombinación ocurran en una etapa mucho más precoz que en el resto de los mamíferos.

Este último aspecto podría estar relacionado con el patrón inusual de recombinación encontrado en el ornitorrinco al analizar la localización de las proteínas DMC1 y MLH1. En el caso de DMC1, dado que actúa de forma conjunta con RAD51 en los procesos de invasión de la cadena del DNA ([Brown and Bishop, 2014](#)) era esperable que mostraran una dinámica similar. Sin embargo, ambas proteínas muestran un patrón completamente distinto. Además, los focos de DMC1 muestran una localización muy parecida a la encontrada en MLH1, algo que no esperaríamos encontrar dado que esta proteína está implicada en procesos de recombinación tardía y en la formación de quiasmas. Las dos proteínas muestran un patrón espacio-temporal bastante similar, salvo que DMC1 desaparece antes que MLH1. Además, existe una asociación inesperada de MLH1 (y por extensión DMC1) con los centrómeros, lo que parece indicar que o bien estas proteínas no están implicadas de manera canónica en la reparación del DNA, o que la señal de los anticuerpos está revelando otras proteínas de naturaleza completamente distinta a la esperada. Sin embargo, esta interpretación no concuerda con los datos de Western Blot en testículo de ornitorrinco, que muestran datos del peso molecular esperado en ambas proteínas DMC1 y MLH1 ([Horan, 2011](#)). Esto nos llevan a apoyar bien la primera idea de que quizá estas proteínas no estén implicadas exclusivamente en eventos de recombinación o bien que los sobrecruzamientos se forman en ornitorrinco muy próximos al centrómero, algo que ha sido observado previamente en los cromosomas de pato (*Anas platyrhynchos*) ([Pigozzi and del Priore, 2016](#)).

4

Evolución del silenciamiento de los cromosomas sexuales en monotremas

Los cromosomas sexuales heteromórficos de mamíferos placentarios y marsupiales están sujetos a un proceso de inactivación (MSCI) durante la profase meiótica-I, mientras que los autosomas mantienen la actividad transcripcional ([Franco et al., 2007](#); [Namekawa et al., 2007](#); [Page et al., 2012](#)). La aparición del fenómeno de MSCI va aparejado con la retrotransposición de los genes necesarios en la espermatogénesis de los cromosomas sexuales a los autosomas, a fin de evitar que se inactiven durante la meiosis ([McKee and Handel, 1993](#)). Estudios previos han indicado

que en el ornitorrinco no ocurre un fenómeno de MSCI ([Daish et al., 2015](#)). Sobre la base de estos resultados se ha propuesto que el MSCI habría podido surgir en mamíferos después de la separación de los monotremas y los terios. Nuestros resultados en ambas especies de monotremas corroboran la falta de incorporación de la γ H2AX en los espermatoцитos. Por el contrario, la incorporación de RNA polimerasa-II en las primeras etapas de la profase-I indica que hay una actividad transcripcional desde el comienzo de la meiosis y que esta no está específicamente excluida de los cromosomas sexuales. No obstante, a fin de poder asegurar si el MSCI es una novedad evolutiva en los mamíferos terios, sería conveniente realizar estudios comparados con otras especies de vertebrados. Hasta la fecha, este tipo de análisis se ha llevado a cabo solamente en aves, mostrando una ausencia de silenciamiento meiótico en sus cromosomas sexuales ZW ([Livernois et al., 2013](#)). Otros grupos como los reptiles podrían aportar una información relevante en este aspecto.

En todo caso, tanto en el ornitorrinco como en el equidna hemos observado la incorporación de un conjunto de modificaciones epigenéticas durante la meiosis. Estas modificaciones no son compartidas entre ambas especies, ya que mientras que en el ornitorrinco H3K9me2 se acumula sobre las regiones asinápticas de los cromosomas sexuales y los autosomas, esta acumulación no se observa en el equidna. Por el contrario, H3K9me3 se aparentemente se acumula en los cromosomas sexuales en el equidna pero no en el ornitorrinco. Finalmente, H3K9ac parece estar excluida de los cromosomas sexuales en el equidna pero no en el ornitorrinco. Esto revela importantes diferencias en la regulación epigenética entre estas dos especies. Además, ninguno de estos patrones epigenéticos parece estar asociado a la inactivación de la transcripción, sino estar más relacionado con la presencia de regiones sin sinapsis. Estos resultados abren nuevos interrogantes sobre el origen evolutivo de la inactivación de los cromosomas sexuales meióticos, su relación con la asinapsis y las marcas epigenéticas asociadas a ellas. Se puede especular que el silenciamiento meiótico de los cromosomas sexuales evolucionó después de la divergencia de los monotremas, presumiblemente como resultado de la diferenciación de los cromosomas sexuales XY de los Terios.

5

Comportamiento meiótico del trivalente sexual XY₁Y₂ en *Wallabia bicolor*

Uno de los rasgos citogenéticos más llamativos de los marsupiales es la gran similitud de cariotipos que presentan todas las especies del grupo ([Graves, 1996](#); [Hayman, 1990](#); [Sharman, 1973](#)). En comparación con otros mamíferos, los números cromosómicos de marsupiales están muy conservados, variando entre $2n = 10$ y $2n = 32$, con predominio de los cariotipos $2n = 14$ y $2n = 22$ ([Deakin and O'Neill, 2020](#)). Se ha propuesto que el cariotipo del marsupial ancestral es $2n = 14$, similar al observado en muchas especies actuales ([Deakin et al., 2013](#); [Rofe and Hayman, 1985](#); [Westerman et al., 2010](#)), y que el resto de cariotipos se pueden deber a reordenamientos

cromosómicos como fusiones y fisiones centroméricas o translocaciones de grandes porciones cromosómicas ([Rens and Ferguson-Smith, 2010](#)). Además, los marsupiales se caracterizan por presentar cromosomas sexuales de pequeño tamaño, en el orden de un 3 % para el cromosoma X con respecto al genoma completo, por debajo del 5 % de los placentarios, mientras que el cromosoma Y es muy pequeño ([Graves, 1996](#); [Hayman, 1990](#)).

El ualabí de pantano es una especie con características citogenéticas poco usuales dentro de los marsupiales. Presenta un cariotipo peculiar, $2n = 10$ ♀ y $2n = 11$ ♂, siendo el número más bajo conocido para un mamífero después del muntíaco de India (*Muntiacus muntjak*), que presenta un $2n = 6$ ♀ y $2n = 7$ ♂ ([Zhou et al., 2006](#)). Este cariotipo se ha formado por múltiples fisiones, inversiones y fusiones cromosómicas: el cromosoma 1 se formó mediante la fusión de los cromosomas 6, 10 y 4 de los macrópodidos ancestrales y además una inversión; los cromosomas 2 y 3 son resultado de la fusión Robertsoniana de los cromosomas 1 y 9 y del 5 y 8 de los macrópodidos ancestrales, respectivamente; y el cromosoma 4 proviene del 3 del macropódido ancestral sufriendo una inversión. Además, presenta un sistema múltiple de cromosomas sexuales XY_1Y_2 , algo poco común entre los marsupiales. El Y_1 es muy pequeño y se supone que es el Y original. Por otro lado, el X original se habría fusionado un autosoma (ahora el cromosoma Y_2) que se originó como resultado de la fusión de los cromosomas 2 y 7 macropódido antecesor. Por lo tanto, el brazo largo del X y todo el cromosoma Y_2 son homólogos ([Metcalf et al., 1998](#); [Toder et al., 1997](#)). Este sistema cromosómico ofrece la posibilidad de estudiar el comportamiento del trivalente formado por estos cromosomas durante la meiosis, lo que puede complementar los datos que conocemos sobre el comportamiento de los cromosomas sexuales de marsupiales con un sistema XY convencional. Además, este sistema cromosómico también podría revelar pautas de este comportamiento durante la meiosis que puedan ser relevantes para entender la evolución de los cromosomas sexuales.

5.1. Sinapsis de los cromosomas X- Y_2

Como hemos visto, los cromosomas sexuales del ualabí representan una situación excepcional. Al igual que en otras especies en las que ha habido translocaciones entre autosomas y los cromosomas sexuales ([Gil-Fernández et al., 2020](#); [Rahn et al., 2016](#); [Vozdova et al., 2016](#)), el cromosoma X y el Y_2 presentan una sinapsis completa en el segmento que comporten (y que podría considerarse como un neo-PAR). Sin embargo, hemos encontrado que esta sinapsis parece estar retrasada en comparación con el resto de los cromosomas. Este retraso puede estar condicionado por restricciones estructurales de estos cromosomas. La longitud de este neo-PAR, la diferencia de tamaño de los segmentos no homólogos de los cromosomas X e Y_1 y el hecho de que todos los extremos de los cromosomas permanezcan unidos a la envoltura nuclear obligan al cromosoma X a doblarse de manera significativa, haciendo que la aproximación de los cromosomas se vea retrasada. El cromosoma X, cuando aún no ha completado su sinapsis en la región de origen autosómico se muestra muy estirado y su telómero no apareante se encuentra habitualmente muy alejado de la región centromérica, donde se encontraría el telómero proximal del cromosoma Y_2 (Figura 4.2B).

Esta disposición estirada, que perdura incluso cuando hay contacto con el Y_1 (Figura 3.9D), puede dificultar la sinapsis.

El retraso en completar la sinapsis es una circunstancia común en los casos de reordenamientos cromosómicos que implican la formación de trivalentes o multivalentes complejos (Berríos et al., 2014; Ribagorda et al., 2019). Recientemente, se ha descrito un retraso similar en los cromosomas sexuales del ratón pigmeo africano *Mus minutoides* que presenta un sistema neo-XY, con ambos cromosomas sexuales translocados con un autosoma (Gil-Fernández et al., 2020). Aunque en todos los casos se ha argumentado que los factores estructurales (principalmente el plegamiento al que se tienen que someter los EAs) puede ser un factor determinante, también se ha sugerido que el retraso de la sinapsis podría deberse además a un reconocimiento deficiente entre estos cromosomas en la región neo-PAR (Figura 4.2A). Si esta región ha comenzado un proceso de divergencia genética, producido por una tasa disminuida de recombinación, con el tiempo no podría proporcionar suficiente homología para promover un apareamiento y sinapsis eficientes (Gil-Fernández et al., 2020; Murata et al., 2015; Veyrunes et al., 2014; Zushi et al., 2017). Esta posibilidad revela que la sinapsis retardada y la resolución del daño al ADN pueden aparecer antes de cualquier diferenciación morfológica y, por lo tanto, representan los primeros procesos afectados durante los pasos iniciales de la divergencia de los cromosomas sexuales. En el caso del ualabí, no hemos podido analizar con detalle si se está produciendo una exclusión de la recombinación en la región del neo-PAR próxima al centrómero, que es la que parece mostrar un retraso sináptico. La presencia de focos de RPA o RAD51 no parece diferente de la de los autosomas, y no hemos podido localizar otros marcadores de recombinación como MLH1. Estudios más detallados del comportamiento meiótico de los cromosomas sexuales o el análisis de marcadores genéticos en esta región de los cromosomas X e Y_2 podrían revelar una incipiente diferenciación de estos cromosomas.

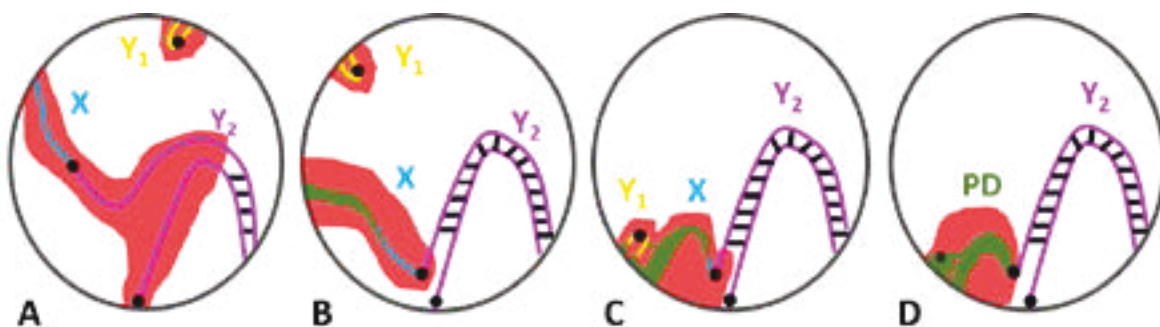


Figura 4.2. Esquema representativo de la secuencia de apareamiento y sinapsis de los cromosomas sexuales del *W. bicolor*. En rojo se representa la señal de γ H2AX, marcando los cromosomas sexuales asinápticos. (A) Paquitene temprano, donde comienza la sinapsis en el cromosoma X- Y_2 y el Y_1 se muestra en el otro lado del núcleo. (B) Paquitene temprano-medio, donde la sinapsis de X- Y_1 se completa y hay una aproximación de Y_1 . Los ejes del cromosoma X comienzan a engrosarse, acumulando SYCP3 (verde). (C) Paquitene medio, etapa de unión entre el X- Y_1 mediante la asociación de sus EAs por medio de SYCP3 y formación de la PD, con conexiones por varios puntos. Hay una señal de γ H2AX más concentrada, aunque irregular. (D). Paquitene tardío, X- Y_1 quedan embebidos en la PD y la señal de H2AX marca el cuerpo sexual de forma regular.

Una vez que el cromosoma X y el Y_2 completan su sinapsis, se aprecia un desplazamiento de sus señales centrómeras, indicando un posible heteromorfismo en esta región (Figura 4.2C y D). Además, observamos claramente que hay un pequeño brazo corto en el cromosoma Y_2 que se desvía de la trayectoria de los ejes y no sinapsa con el cromosoma X (Figura 4.3). Esta característica había sido observada previamente en microscopía electrónica ([Sharp, 1982](#)). Tanto el desplazamiento de las regiones centroméricas como la presencia de este segmento desapareado indican que no hay una simetría total en el punto de fusión del cromosoma X con el autosoma originario en comparación al cromosoma Y_2 . Esto es probablemente atribuible a la compleja reorganización cromosómica sufrida por los cromosomas 2 y X en el grupo de los macropódidos ([Deakin, 2018](#)). El desplazamiento de los centrómeros es un fenómeno común en los cromosomas originados por translocaciones Robertsonianas ([Capilla et al., 2014](#); [Dumas and Britton-Davidian, 2002](#)). En este caso, el polimorfismo que afecta a esta región de los cromosomas X e Y_2 hace que ese pequeño brazo corto del cromosoma Y_2 aparezca en hemigosis y sería de hecho exclusivo de los machos.

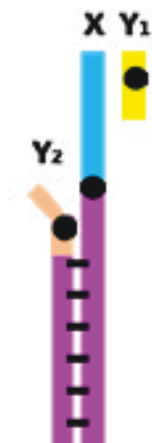


Figura 4.3. Esquema representativo trivalente sexual XY_1Y_2 en *Wallabia bicolor*. En morado se representa la región neo-PAR de los cromosomas X- Y_2 . En azul la región heteróloga del cromosoma X y en amarillo el cromosoma Y_1 . Por último, en rosa se representa el segmento desapareado del cromosoma Y_2 . Los círculos negros representan los centrómeros de cada cromosoma y se aprecia un desplazamiento en los centrómeros del X e Y_2 .

5.2. Apareamiento de la región heteróloga X- Y_1 y formación de la placa densa

El brazo corto del cromosoma X (que representa el cromosoma X ancestral) interacciona con el cromosoma Y_1 , pero de una forma completamente distinta a la del brazo largo con el cromosoma Y_2 . Por un lado, la asociación de este segmento del X y el cromosoma Y_1 se produce mucho más tardíamente. Esto puede ser debido a que el reconocimiento de estos cromosomas ocurra por mecanismos diferentes a los habituales. En la mayoría de mamíferos placentarios la inducción de roturas de DNA es importante para el reconocimiento de la homología entre los cromosomas sexuales ([Baudat et al., 2000](#); [Mahadevaiah et al., 2001](#); [Romanienko and Camerini-Otero, 2000](#)) aunque estos presentan una temporalidad propia y la inducción de roturas recae sobre enzimas específicas ([Acquaviva et al., 2020](#); [Kauppi et al., 2011](#); [Kauppi et al., 2012](#); [Page et al., 2012](#)). En los marsupiales se ha postulado que posiblemente haya un reconocimiento independiente de homología ([Page et al., 2003](#)) y que los cromosomas podrían moverse por la superficie de la envoltura nuclear y encontrarse

simplemente por azar, quedando asociados debido a una serie de mecanismos que podrían incluir modificaciones de la cromatina ([Fernández-Donoso et al., 2010](#)). Los resultados encontrados en el ualabí demuestran que este segmento del X y el cromosomas X y el Y_1 incorporan focos de RPA y RAD51 desde la etapa de zigotene, lo que indica el apareamiento tardío no se debe a la ausencia de DSBs. Por tanto, es razonable interpretar que la ausencia de homología del Y_1 con este segmento del X es la que causa que los cromosomas no se reconozcan por la vía de reparación homóloga.

Por otro lado, al igual que en otras especies previamente descritas, no hay una formación de CS entre el X y el Y_1 ([Fernández-Donoso et al., 1979](#); [Page et al., 2005](#); [Page et al., 2003](#)). Aun cuando ocasionalmente aparece cierto marcaje de SYCP1 sobre los EAs, esto no parece corresponder con la formación de un EC del CS, ya que nunca se localiza en la región de asociación de ambos cromosomas. Esta asociación de SYCP1 también se observa en los cromosomas sexuales de otras especies de mamíferos, tanto placentarios como marsupiales, y ha sido interpretado como una deposición inespecífica de la proteína sobre los EAs ([Meuwissen et al., 1992](#); [Page et al., 2003](#); [Page et al., 2006b](#)). La asociación física de los cromosomas se produce por medio de la placa densa (PD). El mecanismo de formación de esta estructura en el ualabí de pantano parece distinto al descrito previamente ([Roche et al., 1986](#); [Seluja et al., 1987](#); [Solari and Bianchi, 1975](#)). La unión de entre el segmento diferencial del X y en cromosoma Y_1 , no solo se puede producir por sus extremos, sino que puede tener puntos de unión intersticiales. Este evento podría explicarse por la curvatura producida en el cromosoma X debido a la sinapsis con el cromosoma Y_2 . Esto facilitaría una aproximación de ambas regiones al cromosoma Y_1 y este se viera rodeado de manera que puedan conectar tanto intersticial como distalmente. Una vez establecido el punto de conexión entre ambos cromosomas, se produciría la extensión de la proteína SYCP3 sobre la envoltura nuclear y la formación de la PD. Aunque la organización de la PD y la presencia de SYCP3 en la misma son compartidas con otras especies de marsupiales, la morfología de esta estructura es claramente más irregular que la descrita previamente ([Page et al., 2005](#); [Page et al., 2003](#); [Roche et al., 1986](#); [Solari and Bianchi, 1975](#)). Esta circunstancia puede deberse a que solo uno de los extremos del X participe en la PD. No obstante, no podemos descartar que esta característica sea compartida con otras especies de ualabies. Estudios preliminares en el ualabí de Tammar (*Macropus eugenii*) parecen corroborar esta posibilidad.

5.3. Inactivación transcripcional de los cromosomas sexuales

Nuestros resultados indican que el segmento no apareante del cromosoma X y el Y_1 de ualabí están sometidos a un proceso de inactivación transcripcional (MSCI) durante la profase-I. Tanto la ausencia de RNA polimerasa y H3K9ac, como la intensa marca de γ H2AX, indican que estos cromosomas están sujetos a las mismas modificaciones encontradas en mamíferos placentarios ([Turner et al., 2004](#), [Page et al., 2012](#)). Aunque pueda parecer obvio que los marsupiales deben tener una respuesta de MSCI, actualmente este fenómeno se había demostrado solamente en especies de marsupiales americanos ([Fernández-Donoso et al., 2010](#); [Franco et al., 2007](#);

[Hornecker et al., 2007](#); [Namekawa et al., 2007](#)). Nuestros datos, por tanto, corroboran estos trabajos previos y los extienden a los marsupiales australianos.

Se ha especulado que la inactivación de los cromosomas sexuales durante la meiosis podría tener un papel importante en el origen del fenómeno de inactivación somática del cromosoma X ([Huynh and Lee, 2005](#); [Namekawa et al., 2007](#)). En los marsupiales la compensación de dosis génica en las hembras se produce por medio de la inactivación del cromosoma X de origen paterno ([Graves, 1996](#); [Sharman, 1971](#)) en contraposición a la inactivación al azar que se produce en placentarios ([Lyon, 1961](#); [Takagi and Sasaki, 1975](#)). El fenómeno MSCI en marsupiales se extiende también a etapas postmeióticas de manera muy notable ([Namekawa et al., 2007](#)). Por ello se ha propuesto que las hebras heredarían un cromosoma X del padre previamente inactivado y que el MSCI podría haber proporcionado la base para un mecanismo de compensación de dosis temprana en mamíferos basado únicamente en eventos gametogénicos. La inactivación aleatoria del cromosoma X durante la embriogénesis podría haber evolucionado posteriormente en mamíferos placentarios ([Hornecker et al., 2007](#); [Mahadevaiah et al., 2009](#)).

5.4. Los cromosomas sexuales presentan un quiasma en la región PAR que asegura su segregación

En la mayoría de mamíferos los cromosomas X e Y sinapsan y recombinan durante la meiosis masculina en la pequeña región de homología PAR. La presencia de un quiasma en esta región asegura que los cromosomas puedan segregarse de manera correcta ([Faisal and Kauppi, 2016](#)). Sin embargo, no todas las especies de mamíferos presentan esta región PAR para establecer quiasma y con ello mantenerse unidos correctamente hasta el momento de la segregación. Las especies que tienen ausencia de región PAR han desarrollado mecanismos alternativos de asociación para asegurar la segregación, como la formación de conexiones entre ambos cromosomas sexuales mediante filamentos proteicos derivados de modificaciones de los componentes del CS, principalmente SYCP3, como es el caso del jerbo (*Meriones unguiculatus*) y el topillo mediterráneo (*Microtus duodecimcostatus*) ([de la Fuente et al., 2007](#); [de la Fuente et al., 2012](#)). Esta asociación también puede llevarse a cabo por la presencia de bloques de heterocromatina, característico del jird gordo (*Psammomys obesus*) ([Ashley and Moses, 1980](#)) o *Mus dunni* ([Wolf, 1994](#)) y en última instancia por el desarrollo de estructuras más complejas, como la PD formadas por la proteína SYCP3 como se han descrito previamente en la especie de marsupial como *Thylamys elegans* ([Page et al., 2006b](#)).

Aunque nuestros resultados en relación a la asociación y segregación de los cromosomas sexuales en el ualabí no han sido satisfactorios ni concluyentes, en este estudio hemos podido vislumbrar la coexistencia de dos mecanismos de asociación en el trivalente formado por los cromosomas sexuales. En la región homóloga del cromosoma X y el Y₂ se formaría un quiasma que mantendría unidos los dos cromosomas, mientras que el segmento no homólogo del cromosoma

X y el Y_1 permanecerían en contacto por medio de una asociación aquiasmática. La coexistencia de dos mecanismos similares ha sido recientemente descrita en el ratón pigmeo africano *Mus minutoides* (Gil-Fernández et al., 2020). Sin embargo, en este caso ambos cromosomas sexuales están translocados con un autosoma, lo cual no plantea problemas de segregación, ya que no se forma un trivalente sino un bivalente. En este sentido, la preservación de un mecanismo aquiasmático en el ualabí puede ser crítico en esta etapa de evolución de los cromosomas sexuales.

En *Thylamys elegans* se ha descrito que la PD mantiene la asociación de los cromosomas X e Y en la placa metafásica y con ello contribuye a su correcta segregación (Page et al., 2006a). Sin embargo, la resistencia ejercida por esta estructura sería relativamente débil, permitiendo que los cromosomas sexuales segreguen de manera temprana. En el ualabí no hemos podido observar si la placa densa se mantiene asociando los cromosomas sexuales hasta la metafase-I. Solo se ha podido demostrar que existe una conexión de cromatina entre ambos cromosomas. Sí se ha encontrado que el cromosoma Y_1 aparentemente inicia su migración hacia un polo celular de manera anticipada, corroborando la idea de que esta asociación no es muy fuerte, pero sí lo suficiente para asegurar que los cromosomas no se separan antes de haberse orientado correctamente a polos opuestos. (Figura 4.4). El cromosoma X por su parte no podría iniciar la segregación, ya que permanece en la placa metafásica hasta que la disolución de la cohesión entre las cromátidas hermanas en anafase-I permite la disolución del quiasma que lo mantiene unido al cromosoma Y_2 . Este mecanismo podría asegurar una segregación alterna (y por tanto balanceada) de los tres cromosomas sexuales.

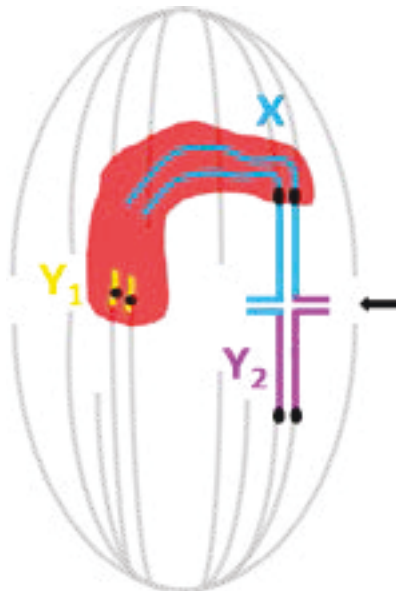
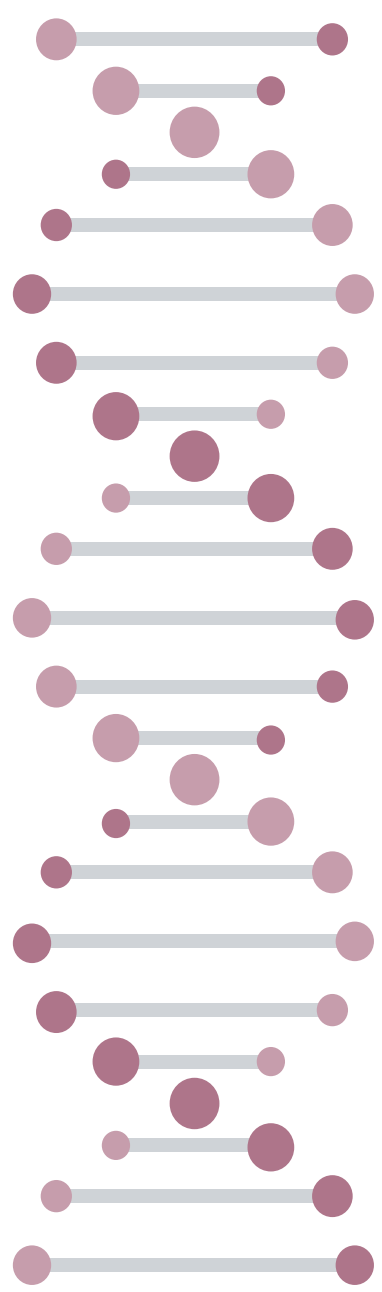


Figura 4.4. Esquema del proceso de segregación en *Wallabia bicolor*. Los cromosomas X e Y_2 se encuentran orientados a polos opuestos de la célula y se mantienen unidos por medio de un quiasma (flecha) en su región de homología. El cromosoma Y_1 se orienta hacia el polo opuesto del cromosoma X, con el que se mantiene en contacto mediante una señal de γ H2AX (rojo) que engloba ambos cromosomas. La segregación alterna de los cromosomas en el trivalente sexual asegura la correcta dotación cromosómica de las células hijas. En negro se representan las regiones centroméricas y en gris los microtúbulos del huso meiótico.



CONCLUSIONES

El trabajo realizado y el conjunto de los resultados detallados en la presente Tesis Doctoral nos han permitido establecer una serie de conclusiones que se exponen a continuación:

1. Conclusiones respecto a la especie *Ornithorhynchus anatinus*

- 1.1. Los cromosomas sexuales presentan una acumulación diferencial de las cohesinas SMC3, SMC1 α/β y STAG3 a partir de paquitene temprano-medio. Sin embargo, REC8 aparece de forma más reducida en estas regiones, indicando una regulación diferencial de esta cohesina. Dado que estas acumulaciones se pierden antes de metafase-I, no parece que sean relevantes para la compleja segregación de los cromosomas sexuales durante la primera división meiótica.
- 1.2. La acumulación de cohesinas también ocurre en varios autosomas que presentan un heteromorfismo en la región centromérica y sinapsan tardíamente, por lo que dicha acumulación parece estar relacionada con la condición asináptica de los cromosomas, independientemente de si son autosomas o cromosomas sexuales.
- 1.3. La dinámica de ensamblaje del complejo sinaptonémico difiere notablemente de la de otros mamíferos: la incorporación de las distintas isoformas de la proteína SYCP3 a los elementos axiales/laterales ocurre en zigotene y la asociación de SYCP1 puede preceder a la de SYCP3.
- 1.4. La variante SYCP3-Y se acumula de manera preferencial sobre las regiones asinápticas de los cromosomas sexuales y los autosomas, revelando una posible diferenciación funcional de las tres isoformas de SYCP3.
- 1.5. La acumulación de SYCP3-Y ocurre después de la finalización de los eventos tempranos de recombinación revelados por RPA y RAD51. Esto indica una reparación eficiente y muy temprana del daño en el DNA, incluso en regiones que no completan la sinapsis.
- 1.6. Los cromosomas sexuales no muestran indicios de inactivación transcripcional (MSCI) ni muestran una asociación específica de las modificaciones epigenéticas estudiadas.

2. Conclusiones respecto a la especie *Tachyglossus aculeatus*

- 2.1. Los cromosomas sexuales no muestran acumulación de ninguna cohesina, indicando que los cambios morfológicos observados en ornitorrinco se habrían originado en esta especie, o perdido en equidna, después de la divergencia de los dos grupos de monotremas. Esto reafirma la posibilidad de que estas acumulaciones no sean relevantes para la segregación de los cromosomas sexuales.

- 2.2. Al igual que en ornitorrinco, la incorporación de SYCP3 a los elementos axiales/laterales del complejo sinaptonémico está retrasada, indicando que pueda tratarse de un fenómeno ancestral compartido por los monotremas.
- 2.3. Es probable que el equidna también presente varias isoformas para la proteína SYCP3. La variante SYCP3-Y parece estar conservada entre el equidna y el ornitorrinco y presenta un patrón de localización similar, acumulándose en las regiones asinápticas.
- 2.4. No se han encontrado indicios de MSCI en el equidna, indicando que o bien este fenómeno habría surgido en los mamíferos placentarios y marsupiales después de la divergencia de los monotremas, o bien estos lo habrían perdido después de esta divergencia. No obstante, algunos marcadores epigenéticos sugieren que hay una relación entre determinadas modificaciones de histonas y las regiones que no completan la sinapsis.

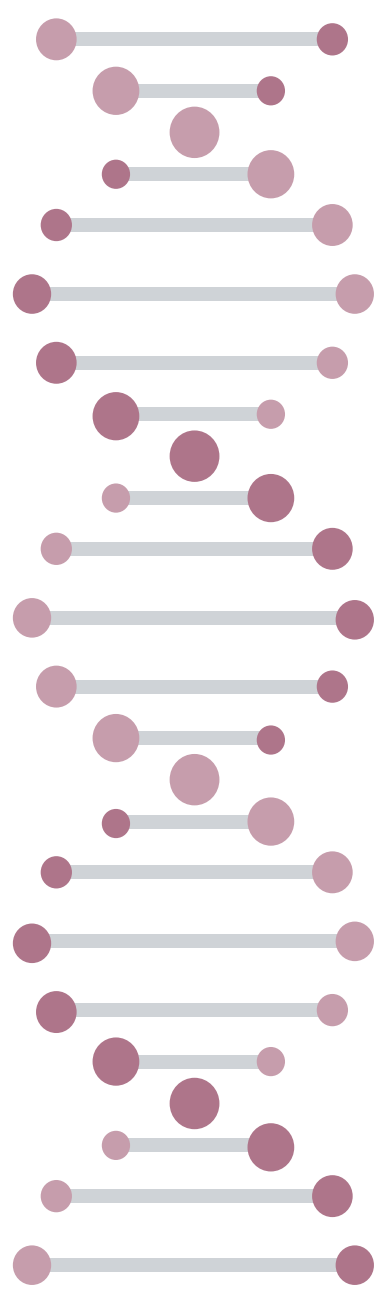
3. Conclusiones respecto a la especie *Wallabia bicolor*

- 3.1. La región pericentromérica de los cromosomas X e Y_2 podría estar sufriendo un proceso de aislamiento genético, revelado por el retraso de la sinapsis, el desplazamiento en las regiones centroméricas cuando la sinapsis se completa y la presencia de un pequeño brazo corto asináptico en el cromosoma Y_2 .
- 3.2. La formación de la placa densa entre los cromosomas X e Y_1 difiere del patrón descrito en otras especies de marsupiales, ya que su morfología es irregular y su formación se inicia por varios puntos de conexión, distales o intersticiales.
- 3.3. Los cromosomas sexuales presentan el fenómeno de MSCI, revelado por la incorporación de γ H2AX.
- 3.4. Los cromosomas sexuales presentan aparentemente un mecanismo dual de asociación en metafase-I: quiasmático en la región homóloga del cromosoma X y el cromosoma Y_2 y aquiasmático entre el segmento diferencial del cromosoma X y el cromosoma Y_1 . Este mecanismo dual aparentemente facilita la segregación alterna (y por tanto balanceada) de los tres cromosomas sexuales durante la primera división meiótica.

4. Conclusiones generales

El conjunto de resultados presentados en esta Tesis Doctoral permite además extraer algunas conclusiones generales:

- La dinámica de algunos procesos meióticos es más diversa en mamíferos de lo que tradicionalmente se ha establecido a partir del estudio de especies modelo. Esto pone de manifiesto la necesidad de ampliar los estudios meióticos a otras especies, ya que estas pueden aportar una visión más completa sobre el proceso de sinapsis, los mecanismos de reparación del DNA y la segregación de los cromosomas, y su origen en un contexto evolutivo.
- Igualmente, el comportamiento de los cromosomas sexuales durante la meiosis muestra una enorme diversidad cuando se analizan especies más allá de los modelos de laboratorio. Estos comportamientos dispares, que implican cambios en la dinámica de diversas proteínas meióticas y particularmente en el fenómeno de MSCI, pueden estar relacionados con una mayor permisividad de algunas especies a la aparición y transmisión de sistemas de cromosomas sexuales múltiples, algunos tan extraordinariamente complejos como los que presentan los monotremas.



REFERENCIAS

- Abbott, J.K., A.K. Norden, and B. Hansson. 2017. Sex chromosome evolution: historical insights and future perspectives. *Proc Biol Sci.* 284.
- Acquaviva, L., M. Boekhout, M.E. Karasu, K. Brick, F. Pratto, T. Li, M. van Overbeek, L. Kauppi, R.D. Camerini-Otero, M. Jasin, and S. Keeney. 2020. Ensuring meiotic DNA break formation in the mouse pseudoautosomal region. *Nature.* 582:426-431.
- Ahmed, E.A., M.E. Philippens, H.B. Kal, D.G. de Rooij, and P. de Boer. 2010. Genetic probing of homologous recombination and non-homologous end joining during meiotic prophase in irradiated mouse spermatocytes. *Mutat Res.* 688:12-18.
- Ahmed, E.A., A. van der Vaart, A. Barten, H.B. Kal, J. Chen, Z. Lou, K. Minter-Dykhouse, J. Bartkova, J. Bartek, P. de Boer, and D.G. de Rooij. 2007. Differences in DNA double strand breaks repair in male germ cell types: lessons learned from a differential expression of Mdc1 and 53BP1. *DNA Repair (Amst).* 6:1243-1254.
- Anderson, D.E., A. Losada, H.P. Erickson, and T. Hirano. 2002. Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J Cell Biol.* 156:419-424.
- Ashley, T., and M.J. Moses. 1980. End association and segregation of the achiasmatic X and Y chromosomes of the sand rat, *Psammomys obesus*. *Chromosoma.* 78:203-210.
- Ashley, T., A.W. Plug, J. Xu, A.J. Solari, G. Reddy, E.I. Golub, and D.C. Ward. 1995. Dynamic changes in Rad51 distribution on chromatin during meiosis in male and female vertebrates. *Chromosoma.* 104:19-28.
- Baarends, W.M., and J.A. Grootegoed. 2003. Chromatin dynamics in the male meiotic prophase. *Cytogenet Genome Res.* 103:225-234.
- Baarends, W.M., E. Wassenaar, R. van der Laan, J. Hoogerbrugge, E. Sleddens-Linkels, J.H. Hoeijmakers, P. de Boer, and J.A. Grootegoed. 2005. Silencing of unpaired chromatin and histone H2A ubiquitination in mammalian meiosis. *Mol Cell Biol.* 25:1041-1053.
- Baier, A., M. Alsheimer, and R. Benavente. 2007. Synaptonemal complex protein SYCP3: Conserved polymerization properties among vertebrates. *Biochim Biophys Acta.* 1774:595-602.
- Baudat, F., Y. Imai, and B. de Massy. 2013. Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nat Rev Genet.* 14:794-806.
- Baudat, F., K. Manova, J.P. Yuen, M. Jasin, and S. Keeney. 2000. Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell.* 6:989-998.
- Baumann, C., C.M. Daly, S.M. McDonnell, M.M. Viveiros, and R. De La Fuente. 2011. Chromatin configuration and epigenetic landscape at the sex chromosome bivalent during equine spermatogenesis. *Chromosoma.* 120:227-244.

Bellani, M.A., K.A. Boateng, D. McLeod, and R.D. Camerini-Otero. 2010. The expression profile of the major mouse SPO11 isoforms indicates that SPO11beta introduces double strand breaks and suggests that SPO11alpha has an additional role in prophase in both spermatocytes and oocytes. *Mol Cell Biol.* 30:4391-4403.

Bellani, M.A., P.J. Romanienko, D.A. Cairatti, and R.D. Camerini-Otero. 2005. SPO11 is required for sex-body formation, and Spo11 heterozygosity rescues the prophase arrest of *Atm*^{-/-} spermatocytes. *J Cell Sci.* 118:3233-3245.

Berríos, S., C. Manieu, J. López-Fenner, E. Ayarza, J. Page, M. González, M. Manterola, and R. Fernández-Donoso. 2014. Robertsonian chromosomes and the nuclear architecture of mouse meiotic prophase spermatocytes. *Biol Res.* 47:16.

Bhalla, N., and A.F. Dernburg. 2008. Prelude to a division. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 24:397-424.

Birchler, J.A. 2009. Dosage compensation for the birds. *Heredity.* 102:423-424.

Blokhina, Y.P., A.D. Nguyen, B.W. Draper, and S.M. Burgess. 2019. The telomere bouquet is a hub where meiotic double-strand breaks, synapsis, and stable homolog juxtaposition are coordinated in the zebrafish, *Danio rerio*. *PLoS Genet.* 15:e1007730.

Boekhout, M., M.E. Karasu, J. Wang, L. Acquaviva, F. Pratto, K. Brick, D.Y. Eng, J. Xu, R.D. Camerini-Otero, D.J. Patel, and S. Keeney. 2019. REC114 Partner ANKRD31 Controls Number, Timing, and Location of Meiotic DNA Breaks. *Molecular Cell.* 74:1053-1068.e1058.

Brown, M.S., and D.K. Bishop. 2014. DNA strand exchange and RecA homologs in meiosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7.

Burgoyne, P.S. 1982. Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of Mammals. *Hum Genet.* 61:85-90.

Burgoyne, P.S., S.K. Mahadevaiah, M.J. Sutcliffe, and S.J. Palmer. 1992. Fertility in mice requires X-Y pairing and a Y-chromosomal "spermiogenesis" gene mapping to the long arm. *Cell.* 71:391-398.

Burgoyne, P.S., S.K. Mahadevaiah, and J.M. Turner. 2009. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat Rev Genet.* 10:207-216.

Calvente, A., A. Viera, M.T. Parra, R. de la Fuente, J.A. Suja, J. Page, J.L. Santos, C.G. de la Vega, J.L. Barbero, and J.S. Rufas. 2013. Dynamics of cohesin subunits in grasshopper meiotic divisions. *Chromosoma.* 122:77-91.

Capilla, L., N. Medarde, A. Alemany-Schmidt, M. Oliver-Bonet, J. Ventura, and A. Ruiz-Herrera. 2014. Genetic recombination variation in wild Robertsonian mice: on the role of chromosomal fusions and *Prdm9* allelic background. *Proc Biol Sci.* 281.

Casey, A.E., T.J. Daish, J.L. Barbero, and F. Grützner. 2017. Differential cohesin loading marks paired and unpaired regions of platypus sex chromosomes at prophase I. *Scientific Reports.* 7:4217.

Casey, A.E., T.J. Daish, and F. Grutzner. 2015. Identification and characterisation of synaptonemal complex genes in monotremes. *Gene*. 567:146-153.

Cohen, P.E., S.E. Pollack, and J.W. Pollard. 2006. Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr Rev*. 27:398-426.

Conlin, M.P., D.A. Reid, G.W. Small, H.H. Chang, G. Watanabe, M.R. Lieber, D.A. Ramsden, and E. Rothenberg. 2017. DNA Ligase IV Guides End-Processing Choice during Nonhomologous End Joining. *Cell Rep*. 20:2810-2819.

Corbett, K.D., C.K. Yip, L.S. Ee, T. Walz, A. Amon, and S.C. Harrison. 2010. The monopolin complex crosslinks kinetochore components to regulate chromosome-microtubule attachments. *Cell*. 142:556-567.

Cortez, D., R. Marin, D. Toledo-Flores, L. Froidevaux, A. Liechti, P.D. Waters, F. Grützner, and H. Kaessmann. 2014. Origins and functional evolution of Y chromosomes across mammals. *Nature*. 508:488.

Costa, Y., R. Speed, R. Ollinger, M. Alsheimer, C.A. Semple, P. Gautier, K. Maratou, I. Novak, C. Hoog, R. Benavente, and H.J. Cooke. 2005. Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J Cell Sci*. 118:2755-2762.

Crichton, J.H., C.J. Playfoot, M. MacLennan, D. Read, H.J. Cooke, and I.R. Adams. 2017. Tex19.1 promotes Spo11-dependent meiotic recombination in mouse spermatocytes. *PLoS Genet*. 13.

Chandler, C.H. 2017. When and why does sex chromosome dosage compensation evolve? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1389:37-51.

Chang, H.H.Y., N.R. Pannunzio, N. Adachi, and M.R. Lieber. 2017. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 18:495-506.

Charlesworth, D., and B. Charlesworth. 2005. Sex chromosomes: evolution of the weird and wonderful. *Curr Biol*. 15:011.

Chen, R., and M.S. Wold. 2014. Replication protein A: single-stranded DNA's first responder: dynamic DNA-interactions allow replication protein A to direct single-strand DNA intermediates into different pathways for synthesis or repair. *Bioessays*. 36:1156-1161.

Daish, T., A. Casey, and F. Grützner. 2009. Platypus chain reaction: directional and ordered meiotic pairing of the multiple sex chromosome chain in *Ornithorhynchus anatinus*. *Reproduction, Fertility and Development*. 21:976-984.

Daish, T., and F. Grützner. 2019. Evolution and meiotic organization of heteromorphic sex chromosomes. *Curr Top Dev Biol*. 134:1-48.

Daish, T.J., A.E. Casey, and F. Grutzner. 2015. Lack of sex chromosome specific meiotic silencing in platypus reveals origin of MSCI in therian mammals. *BMC Biology*. 13:106.

de Boer, P., A.G. Searle, F.A. van der Hoeven, D.G. de Rooij, and C.V. Beechey. 1986. Male pachytene pairing in single and double translocation heterozygotes and spermatogenic impairment in the mouse. *Chromosoma*. 93:326-336.

de la Fuente, R., M.T. Parra, A. Viera, A. Calvente, R. Gomez, J.A. Suja, J.S. Rufas, and J. Page. 2007. Meiotic pairing and segregation of achiasmate sex chromosomes in eutherian mammals: the role of SYCP3 protein. *PLoS Genetics*. (3):e198.

de la Fuente, R., A. Sanchez, J.A. Marchal, A. Viera, M.T. Parra, J.S. Rufas, and J. Page. 2012. A synaptonemal complex-derived mechanism for meiotic segregation precedes the evolutionary loss of homology between sex chromosomes in arvicolid mammals. *Chromosoma*. 121:433-446.

de Massy, B. 2003. Distribution of meiotic recombination sites. *Trends Genet*. 19:514-522.

de Vries, M., S. Vosters, G. Merkx, K. D'Hauwers, D.G. Wansink, L. Ramos, and P. de Boer. 2012. Human male meiotic sex chromosome inactivation. *PLoS One*. 7:e31485.

Deakin, J.E. 2018. Chromosome Evolution in Marsupials. *Genes*. 9:72.

Deakin, J.E., M.L. Delbridge, E. Koina, N. Harley, A.E. Alsop, C. Wang, V.S. Patel, and J.A. Graves. 2013. Reconstruction of the ancestral marsupial karyotype from comparative gene maps. *BMC Evol Biol*. 13:258.

Deakin, J.E., and R.J. O'Neill. 2020. Evolution of Marsupial Genomes. *Annual Review of Animal Biosciences*. 8:25-45.

Ding, D.Q., K. Okamasa, Y. Katou, E. Oya, J.I. Nakayama, Y. Chikashige, K. Shirahige, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka. 2019. Chromosome-associated RNA-protein complexes promote pairing of homologous chromosomes during meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature communications*. 10:5598.

Ding, D.Q., K. Okamasa, M. Yamane, C. Tsutsumi, T. Haraguchi, M. Yamamoto, and Y. Hiraoka. 2012. Meiosis-specific noncoding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. *Science*. 336:732-736.

Ding, X., R. Xu, J. Yu, T. Xu, Y. Zhuang, and M. Han. 2007. SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Dev Cell*. 12:863-872.

Disteche, C.M. 2016. Dosage compensation of the sex chromosomes and autosomes. *Semin Cell Dev Biol*. 56:9-18

Dobson, M.J., R.E. Pearlman, A. Karaiskakis, B. Spyropoulos, and P.B. Moens. 1994. Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J Cell Sci*. 107 (Pt 10):2749-2760.

Dumas, D., and J. Britton-Davidian. 2002. Chromosomal rearrangements and evolution of recombination: comparison of chiasma distribution patterns in standard and robertsonian populations of the house mouse. *Genetics*. 162:1355-1366.

- Dunce, J.M., A.E. Milburn, M. Gurusaran, I. da Cruz, L.T. Sen, R. Benavente, and O.R. Davies. 2018. Structural basis of meiotic telomere attachment to the nuclear envelope by MAJIN-TERB2-TERB1. *Nature communications*. 9:5355.
- Eijpe, M., C. Heyting, B. Gross, and R. Jessberger. 2000. Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J Cell Sci*. 113 (Pt 4):673-682.
- Eijpe, M., H. Offenberg, R. Jessberger, E. Revenkova, and C. Heyting. 2003. Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J Cell Biol*. 160:657-670.
- Ellegren, H. 2011. Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. *Nat Rev Genet*. 12:157-166.
- Enguita-Marruedo, A., M. Martín-Ruiz, E. García, A. Gil-Fernández, M.T. Parra, A. Viera, J.S. Rufas, and J. Page. 2019. Transition from a meiotic to a somatic-like DNA damage response during the pachytene stage in mouse meiosis. *PLoS Genetics*. 15:e1007439.
- Faisal, I., and L. Kauppi. 2016. Sex chromosome recombination failure, apoptosis, and fertility in male mice. *Chromosoma*. 125:227-235.
- Fawcett, D.W. 1956. The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol*. 2:403-406.
- Fernandez-Capetillo, O., A. Celeste, and A. Nussenzweig. 2003. Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle*. 2:426-427.
- Fernandez-Donoso, R., S. Berrios, and J. Pincheira. 1979. Position of the nucleolus within the nuclei of pachytene spermatocytes of *Dromiciops australis* and *Marmosa elegans* (Didelphoidea-Marsupialia). *Experientia*. 35:1021-1023.
- Fernández-Donoso, R., S. Berríos, J.S. Rufas, and J. Page. 2010. Marsupial sex chromosome behaviour during male meiosis. In *Marsupial Genetics and Genomics*. J.A. Deakin, P.D. Waters, and J.A. Marshall Graves, editors. Springer, Dordrecht. 187-206.
- Franco, M.J., R.B. Scirano, and A.J. Solari. 2007. Protein immunolocalization supports the presence of identical mechanisms of XY body formation in eutherians and marsupials. *Chromosome Res*. 15:815-824.
- Fraune, J., M. Alsheimer, J. Redolfi, C. Brochier-Armanet, and R. Benavente. 2014. Protein SYCP2 is an ancient component of the metazoan synaptonemal complex. *Cytogenet Genome Res*. 144:299-305.
- Fraune, J., C. Brochier-Armanet, M. Alsheimer, and R. Benavente. 2013. Phylogenies of Central Element Proteins Reveal the Dynamic Evolutionary History of the Mammalian Synaptonemal Complex: Ancient and Recent Components. *Genetics*. 195:781-793.

Fraune, J., C. Brochier-Armanet, M. Alsheimer, J.N. Volff, K. Schücker, and R. Benavente. 2016. Evolutionary history of the mammalian synaptonemal complex. *Chromosoma*. 125:355-360.

Fraune, J., S. Schramm, M. Alsheimer, and R. Benavente. 2012. The mammalian synaptonemal complex: Protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Experimental Cell Research*. 318:1340-1346.

Fukuda, T., K. Daniel, L. Wojtasz, A. Toth, and C. Höög. 2010. A novel mammalian HORMA domain-containing protein, *HORMAD1*, preferentially associates with unsynapsed meiotic chromosomes. *Exp Cell Res*. 316:158-171.

Gao, J., and M.P. Colaiácovo. 2018. Zipping and Unzipping: Protein Modifications Regulating Synaptonemal Complex Dynamics. *Trends Genet*. 34:232-245.

Garagna, S., J. Page, R. Fernandez-Donoso, M. Zuccotti, and J.B. Searle. 2014. The Robertsonian phenomenon in the house mouse: mutation, meiosis and speciation. *Chromosoma*. 123:529-544.

Garcia-Cruz, R., I. Roig, P. Robles, H. Scherthan, and M. Garcia Caldes. 2009. ATR, BRCA1 and gammaH2AX localize to unsynapsed chromosomes at the pachytene stage in human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 18:37-44.

Gil-Fernández, A., P.A. Saunders, M. Martín-Ruiz, M. Ribagorda, P. López-Jiménez, D.L. Jeffries, M.T. Parra, A. Viera, J.S. Rufas, N. Perrin, F. Veyrunes, and J. Page. 2020. Meiosis reveals the early steps in the evolution of a neo-XY sex chromosome pair in the African pygmy mouse *Mus minutoides*. *PLoS Genet*. 16:e1008959.

Giroux, C.N., M.E. Dresser, and H.F. Tiano. 1989. Genetic control of chromosome synapsis in yeast meiosis. *Genome*. 31:88-94.

Gómez, H.L., N. Felipe-Medina, M. Sánchez-Martín, O.R. Davies, I. Ramos, I. García-Tuñón, D.G. de Rooij, I. Dereli, A. Tóth, J.L. Barbero, R. Benavente, E. Llano, and A.M. Pendas. 2016. *C14ORF39/SIX6OS1* is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. *Nature communications*. 7:13298.

Gómez, R., A. Valdeolmillos, M.T. Parra, A. Viera, C. Carreiro, F. Roncal, J.S. Rufas, J.L. Barbero, and J.A. Suja. 2007. Mammalian *SGO2* appears at the inner centromere domain and redistributes depending on tension across centromeres during meiosis II and mitosis. *EMBO Rep*. 8:173-180.

Graves, J.A. 1996. Mammals that break the rules: genetics of marsupials and monotremes. *Annu Rev Genet*. 30:233-260.

Graves, J.A. 2016. Did sex chromosome turnover promote divergence of the major mammal groups?: De novo sex chromosomes and drastic rearrangements may have posed reproductive barriers between monotremes, marsupials and placental mammals. *Bioessays*. 38:734-743.

Graves, J.A., and J.M. Watson. 1991. Mammalian sex chromosomes: evolution of organization and function. *Chromosoma*. 101:63-68.

- Grelon, M., D. Vezon, G. Gendrot, and G. Pelletier. 2001. AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *Embo j.* 20:589-600.
- Gruber, S., C.H. Haering, and K. Nasmyth. 2003. Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell.* 112:765-777.
- Grützner, F., W. Rens, E. Tsend-Ayush, N. El-Mogharbel, P.C.M. O'Brien, R.C. Jones, M.A. Ferguson-Smith, and J.A. Marshall Graves. 2004. In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. *Nature.* 432:913-917.
- Guioli, S., R. Lovell-Badge, and J.M. Turner. 2012. Error-prone ZW pairing and no evidence for meiotic sex chromosome inactivation in the chicken germ line. *PLoS Genet.* 8:8.
- Haering, C.H., D. Schoffnegger, T. Nishino, W. Helmhart, K. Nasmyth, and J. Löwe. 2004. Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction. *Mol Cell.* 15:951-964.
- Hamer, G., K. Gell, A. Kouznetsova, I. Novak, R. Benavente, and C. Hoog. 2006. Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci.* 119:4025-4032.
- Handel, M.A. 2004. The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Exp Cell Res.* 296:57-63.
- Hattori, R.S., Y. Murai, M. Oura, S. Masuda, S.K. Majhi, T. Sakamoto, J.I. Fernandino, G.M. Somoza, M. Yokota, and C.A. Strüssmann. 2012. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:2955-2959.
- Hawley, R.S. 1980. Chromosomal sites necessary for normal levels of meiotic recombination in *Drosophila melanogaster*. I. Evidence for and mapping of the sites. *Genetics.* 94:625-646.
- Hayman, D.L. 1990. Marsupial cytogenetics. *Aust J Zool.* 37:331-349.
- Herran, Y., C. Gutierrez-Caballero, M. Sanchez-Martin, T. Hernandez, A. Viera, J.L. Barbero, E. de Alava, D.G. de Rooij, J.A. Suja, E. Llano, and A.M. Pendas. 2011. The cohesin subunit RAD21L functions in meiotic synapsis and exhibits sexual dimorphism in fertility. *Embo J.* 30:3091-3105.
- Heyting, C. 1996. Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* 8:389-396.
- Hill, W.G., and A. Robertson. 1966. The effect of linkage on limits to artificial selection. *Genet Res.* 8:269-294.
- Hirano, T. 2015. Chromosome Dynamics during Mitosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7.
- Holloway, J.K., J. Booth, W. Edelmann, C.H. McGowan, and P.E. Cohen. 2008. MUS81 generates a subset of MLH1-MLH3-independent crossovers in mammalian meiosis. *PLoS Genet.* 4:1000186.
- Horan, S. 2011. A first look at monotreme meiotic recombination. Mater's thesis, University of Adelaide.

Horn, H.F., D.I. Kim, G.D. Wright, E.S. Wong, C.L. Stewart, B. Burke, and K.J. Roux. 2013. A mammalian KASH domain protein coupling meiotic chromosomes to the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 202:1023-1039.

Hornecker, J.L., P.B. Samollow, E.S. Robinson, J.L. Vandeberg, and J.R. McCarrey. 2007. Meiotic sex chromosome inactivation in the marsupial *Monodelphis domestica*. *Genesis.* 45:696-708.

Hoyer-Fender, S. 2003. Molecular aspects of XY body formation. *Cytogenet Genome Res.* 103:245-255.

Hunter, N. 2015. *Meiotic Recombination: The Essence of Heredity.* Cold Spring Harb Perspect Biol. 7.

Huynh, K.D., and J.T. Lee. 2005. X-chromosome inactivation: a hypothesis linking ontogeny and phylogeny. *Nat Rev Genet.* 6:410-418.

Ishiguro, K.-i., J. Kim, S. Fujiyama-Nakamura, S. Kato, and Y. Watanabe. 2011. A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. *EMBO reports.* 12:267-275.

Ishiguro, K.I. 2019. The cohesin complex in mammalian meiosis. *Genes Cells.* 24:6-30.

Iwai, T., A. Yoshii, T. Yokota, C. Sakai, H. Hori, A. Kanamori, and M. Yamashita. 2006. Structural components of the synaptonemal complex, SYCP1 and SYCP3, in the medaka fish *Oryzias latipes*. *Exp Cell Res.* 312:2528-2537.

Jin, Z.L., and N.H. Kim. 2017. RAD51 maintains chromosome integrity and mitochondrial distribution during porcine oocyte maturation in vitro. *J Reprod Dev.* 63:489-496.

Kauppi, L., M. Barchi, F. Baudat, P.J. Romanienko, S. Keeney, and M. Jasin. 2011. Distinct properties of the XY pseudoautosomal region crucial for male meiosis. *Science.* 331:916-920.

Kauppi, L., M. Jasin, and S. Keeney. 2012. The tricky path to recombining X and Y chromosomes in meiosis. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1267:18-23.

Keeney, S., and M.J. Neale. 2006. Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem Soc Trans.* 34:523-525.

Kinner, A., W. Wu, C. Staudt, and G. Iliakis. 2008. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 36:5678-5694.

Kouznetsova, A., I. Novak, R. Jessberger, and C. Höög. 2005. SYCP2 and SYCP3 are required for cohesin core integrity at diplotene but not for centromere cohesion at the first meiotic division. *J Cell Sci.* 118:2271-2278.

Krejci, L., V. Altmannova, M. Spirek, and X. Zhao. 2012. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.* 40:5795-5818.

- Kumar, R., N. Ghyselinck, K.i. Ishiguro, Y. Watanabe, A. Kouznetsova, C. Höög, E. Strong, J. Schimenti, K. Daniel, A. Toth, and B. de Massy. 2015. MEI4 – a central player in the regulation of meiotic DNA double-strand break formation in the mouse. *Journal of Cell Science*. 128:1800-1811.
- Kurzbauer, M.-T., C. Uanschou, D. Chen, and P. Schlögelhofer. 2012. The Recombinases DMC1 and RAD51 Are Functionally and Spatially Separated during Meiosis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 24:2058-2070.
- Lange, J., J. Pan, F. Cole, M.P. Thelen, M. Jasin, and S. Keeney. 2011. ATM controls meiotic double-strand-break formation. *Nature*. 479:237-240.
- Langerak, P., and P. Russell. 2011. Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 366:3562-3571.
- Lee, J. 2017. The Regulation and Function of Cohesin and Condensin in Mammalian Oocytes and Spermatocytes. In *Oocytes: Maternal Information and Functions*. M. Kloc, editor. Springer International Publishing, Cham. 355-372.
- Lee, J., T. Iwai, T. Yokota, and M. Yamashita. 2003. Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. *J Cell Sci*. 116:2781-2790.
- Link, J., R. Benavente, and M. Alsheimer. 2016. Analysis of Meiotic Telomere Behavior in the Mouse. *Methods Mol Biol*. 1411:195-208.
- Link, J., M. Leubner, J. Schmitt, E. Göb, R. Benavente, K.T. Jeang, R. Xu, and M. Alsheimer. 2014. Analysis of meiosis in SUN1 deficient mice reveals a distinct role of SUN2 in mammalian meiotic LINC complex formation and function. *PLoS Genet*. 10:e1004099.
- Lipkin, S.M., P.B. Moens, V. Wang, M. Lenzi, D. Shanmugarajah, A. Gilgeous, J. Thomas, J. Cheng, J.W. Touchman, E.D. Green, P. Schwartzberg, F.S. Collins, and P.E. Cohen. 2002. Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nature Genetics*. 31:385.
- Lisachov, A.P., K.V. Tishakova, Y.A. Tsepilov, and P.M. Borodin. 2019. Male Meiotic Recombination in the Steppe Agama, *Trapelus sanguinolentus* (Agamidae, Iguania, Reptilia). *Cytogenet Genome Res*. 157:107-114.
- Litwin, I., and R. Wysocki. 2018. New insights into cohesin loading. *Curr Genet*. 64:53-61.
- Livernois, A.M., J.A. Graves, and P.D. Waters. 2012. The origin and evolution of vertebrate sex chromosomes and dosage compensation. *Heredity (Edinb)*. 108:50-58.
- Livernois, A.M., S.A. Waters, J.E. Deakin, J.A. Marshall Graves, and P.D. Waters. 2013. Independent evolution of transcriptional inactivation on sex chromosomes in birds and mammals. *PLoS Genet*. 9:18.
- Lyon, M.F. 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*. 190:372-373.

Maguire, M.P. 1986. The pattern of pairing that is effective for crossing over in complex B-A chromosome rearrangements in maize. III. Possible evidence for pairing centers. *Chromosoma*. 94:71-85.

Mahadevaiah, S.K., D. Bourc'his, D.G. de Rooij, T.H. Bestor, J.M. Turner, and P.S. Burgoyne. 2008. Extensive meiotic asynapsis in mice antagonises meiotic silencing of unsynapsed chromatin and consequently disrupts meiotic sex chromosome inactivation. *J Cell Biol*. 182:263-276.

Mahadevaiah, S.K., H. Royo, J.L. VandeBerg, J.R. McCarrey, S. Mackay, and J.M. Turner. 2009. Key features of the X inactivation process are conserved between marsupials and eutherians. *Curr Biol*. 19:1478-1484.

Mahadevaiah, S.K., J.M. Turner, F. Baudat, E.P. Rogakou, P. de Boer, J. Blanco-Rodriguez, M. Jasin, S. Keeney, W.M. Bonner, and P.S. Burgoyne. 2001. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet*. 27:271-276.

Mank, J.E., and H. Ellegren. 2009. All dosage compensation is local: gene-by-gene regulation of sex-biased expression on the chicken Z chromosome. *Heredity (Edinb)*. 102:312-320.

Mansour, W.Y., S. Schumacher, R. Roskopf, T. Rhein, F. Schmidt-Petersen, F. Gatzemeier, F. Haag, K. Borgmann, H. Willers, and J. Dahm-Daphi. 2008. Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*. 36:4088-4098.

Marshall Graves, J.A., and S. Shetty. 2001. Sex from W to Z: evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *The Journal of experimental zoology*. 290:449-462.

Mary, N., H. Barasc, S. Ferchaud, Y. Billon, F. Meslier, D. Robelin, A. Calgaro, A.M. Loustau-Dudez, N. Bonnet, M. Yerle, H. Acloque, A. Ducos, and A. Pinton. 2014. Meiotic recombination analyses of individual chromosomes in male domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). *PLoS One*. 9:e99123.

Masson, J.Y., and S.C. West. 2001. The Rad51 and Dmc1 recombinases: a non-identical twin relationship. *Trends in biochemical sciences*. 26:131-136.

Matulis, S., and M.A. Handel. 2006. Spermatocyte responses in vitro to induced DNA damage. *Molecular Reproduction and Development*. 73:1061-1072.

Matveevsky, S., O. Kolomiets, A. Bogdanov, E. Alpeeva, and I. Bakloushinskaya. 2020. Meiotic Chromosome Contacts as a Plausible Prelude for Robertsonian Translocations. *Genes (Basel)*. 11.

McGuinness, B.E., T. Hirota, N.R. Kudo, J.M. Peters, and K. Nasmyth. 2005. Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol*. 3:1.

McKee, B., and M. Handel. 1993. Sex chromosomes, recombination, and chromatin conformation. *Chromosoma*. 102:71 - 80.

McKim, K.S., K. Peters, and A.M. Rose. 1993. Two types of sites required for meiotic chromosome pairing in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 134:749-768.

- Metcalf, C.J., M.D. Eldridge, R. Toder, and P.G. Johnston. 1998. Mapping the distribution of the telomeric sequence (T2AG3)_n in the Macropodoidea (Marsupialia), by fluorescence in situ hybridization. I. The swamp wallaby, *Wallabia bicolor*. *Chromosome Res.* 6:603-610.
- Meuwissen, R.L.J., H.H. Offenberg, A.J.J. Dietrich, A. Riesewijk, M. van Iersel, and C. Heyting. 1992. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *Embo J.* 11:5091-5100.
- Michaelis, C., R. Ciosk, and K. Nasmyth. 1997. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell.* 91:35-45.
- Milano, C.R., J.K. Holloway, Y. Zhang, B. Jin, C. Smith, A. Bergman, W. Edelmann, and P.E. Cohen. 2019. Mutation of the ATPase Domain of MutS Homolog-5 (MSH5) Reveals a Requirement for a Functional MutSy Complex for All Crossovers in Mammalian Meiosis. *G3.* 9:1839-1850.
- Moens, P.B., N.K. Kolas, M. Tarsounas, E. Marcon, P.E. Cohen, and B. Spyropoulos. 2002. The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J Cell Sci.* 115:1611-1622.
- Moens, P.B., E. Marcon, J.S. Shore, N. Kochakpour, and B. Spyropoulos. 2007. Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *Journal of Cell Science.* 120:1017-1027.
- Morimoto, A., H. Shibuya, X. Zhu, J. Kim, K. Ishiguro, M. Han, and Y. Watanabe. 2012. A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis. *J Cell Biol.* 198:165-172.
- Moses, M.J. 1956. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol.* 2:215-218.
- Moses, M.J., and P.A. Poorman. 1981. Synaptosomal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. II. Synaptic adjustment in a tandem duplication. *Chromosoma.* 81:519-535.
- Muller, H., V.F. Scolari, N. Agier, A. Piazza, A. Thierry, G. Mercy, S. Descorps-Declere, L. Lazar-Stefanita, O. Espeli, B. Llorente, G. Fischer, J. Mozziconacci, and R. Koszul. 2018. Characterizing meiotic chromosomes' structure and pairing using a designer sequence optimized for Hi-C. *Mol Syst Biol.* 14:20188293.
- Murata, C., Y. Kuroki, I. Imoto, M. Tsukahara, N. Ikejiri, and A. Kuroiwa. 2015. Initiation of recombination suppression and PAR formation during the early stages of neo-sex chromosome differentiation in the Okinawa spiny rat, *Tokudaia muenninki*. *BMC evolutionary biology.* 15:234-234.
- Murtagh, C.E. 1977. A unique cytogenetic system in monotremes. *Chromosoma.* 65:37-57.
- Namekawa, S.H., J.L. VandeBerg, J.R. McCarrey, and J.T. Lee. 2007. Sex chromosome silencing in the marsupial male germ line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 104:9730-9735.

Nasmyth, K. 2011. Cohesin: a catenase with separate entry and exit gates? *Nat Cell Biol.* 13:1170-1177.

Nasmyth, K., J.M. Peters, and F. Uhlmann. 2000. Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science.* 288:1379-1385.

Neale, M.J., J. Pan, and S. Keeney. 2005. Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature.* 436:1053-1057.

Nishiyama, T. 2018. Cohesion and cohesin-dependent chromatin organization. *Curr Opin Cell Biol.* 58:8-14.

Novak, I., H. Wang, E. Revenkova, R. Jessberger, H. Scherthan, and C. Höög. 2008. Cohesin Smc1beta determines meiotic chromatin axis loop organization. *J Cell Biol.* 180:83-90.

O'Brien, S.J., M. Menotti-Raymond, W.J. Murphy, W.G. Nash, J. Wienberg, R. Stanyon, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, J.E. Womack, and J.A. Marshall Graves. 1999. The promise of comparative genomics in mammals. *Science.* 286:458-462, 479-481.

Ollinger, R., M. Alsheimer, and R. Benavente. 2005. Mammalian protein SCP1 forms synaptonemal complex-like structures in the absence of meiotic chromosomes. *Mol Biol Cell.* 16:212-217.

Page, J., S. Berrios, M.T. Parra, A. Viera, J.A. Suja, I. Prieto, J.L. Barbero, J.S. Rufas, and R. Fernandez-Donoso. 2005. The program of sex chromosome pairing in meiosis is highly conserved across marsupial species: implications for sex chromosome evolution. *Genetics.* 170:793-799.

Page, J., S. Berrios, J.S. Rufas, M.T. Parra, J.A. Suja, C. Heyting, and R. Fernandez-Donoso. 2003. The pairing of X and Y chromosomes during meiotic prophase in the marsupial species *Thylamys elegans* is maintained by a dense plate developed from their axial elements. *J Cell Sci.* 116:551-560.

Page, J., R. de la Fuente, R. Gomez, A. Calvente, A. Viera, M.T. Parra, J.L. Santos, S. Berrios, R. Fernandez-Donoso, J.A. Suja, and J.S. Rufas. 2006a. Sex chromosomes, synapsis, and cohesins: a complex affair. *Chromosoma.* 115:250-259.

Page, J., R. de la Fuente, M. Manterola, M.T. Parra, A. Viera, S. Berrios, R. Fernandez-Donoso, and J.S. Rufas. 2012. Inactivation or non-reactivation: what accounts better for the silence of sex chromosomes during mammalian male meiosis? *Chromosoma.* 121:307-326.

Page, J., A. Viera, M.T. Parra, R. de la Fuente, J.A. Suja, I. Prieto, J.L. Barbero, J.S. Rufas, S. Berrios, and R. Fernandez-Donoso. 2006b. Involvement of synaptonemal complex proteins in sex chromosome segregation during marsupial male meiosis. *PLoS Genet.* 2:e136.

Page, S.L., and R.S. Hawley. 2004. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 20:525-558.

Panier, S., and S.J. Boulton. 2014. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15:7-18.

- Parra, M.T., A. Viera, R. Gómez, J. Page, R. Benavente, J.L. Santos, J.S. Rufas, and J.A. Suja. 2004. Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. *J Cell Sci.* 117:1221-1234.
- Parra, M.T., A. Viera, R. Gomez, J. Page, M. Carmena, W.C. Earnshaw, J.S. Rufas, and J.A. Suja. 2003. Dynamic relocalization of the chromosomal passenger complex proteins inner centromere protein (INCENP) and aurora-B kinase during male mouse meiosis. *J Cell Sci.* 116:961-974.
- Pelttari, J., M.R. Hoja, L. Yuan, J.G. Liu, E. Brundell, P. Moens, S. Santucci-Darmanin, R. Jessberger, J.L. Barbero, C. Heyting, and C. Hoog. 2001. A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Mol Cell Biol.* 21:5667-5677.
- Peters, A.H., A.W. Plug, and P. de Boer. 1997. Meiosis in carriers of heteromorphic bivalents: sex differences and implications for male fertility. *Chromosome Res.* 5:313-324.
- Phillips, M.J., T.H. Bennett, and M.S. Lee. 2009. Molecules, morphology, and ecology indicate a recent, amphibious ancestry for echidnas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:17089-17094.
- Pigozzi, M.I., and L. del Priore. 2016. Meiotic recombination analysis in female ducks (*Anas platyrhynchos*). *Genetica.* 144:307-312.
- Pigozzi, M.I., and A.J. Solari. 2003. Differential immunolocalization of a putative Rec8p in meiotic autosomes and sex chromosomes of triatomine bugs. *Chromosoma.* 112:38-47.
- Prieto, I., J.A. Suja, N. Pezzi, L. Kremer, A.C. Martinez, J.S. Rufas, and J.L. Barbero. 2001. Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol.* 3:761-766.
- Rahn, M.I., R.C. Noronha, C.Y. Nagamachi, J.C. Pieczarka, A.J. Solari, and R.B. Sciarano. 2016. Protein markers of synaptic behavior and chromatin remodeling of the neo-XY body in phyllostomid bats. *Chromosoma.* 125:701-708.
- Rens, W., and M. Ferguson-Smith. 2010. The Conserved Marsupial Karyotype: Chromosome Painting and Evolution. In *Marsupial Genetics and Genomics*. J.E. Deakin, P.D. Waters, and J.A. Marshall Graves, editors. Springer Netherlands, Dordrecht. 37-53.
- Rens, W., F. Grützner, P.C.M. O'Brien, H. Fairclough, J.A.M. Graves, and M.A. Ferguson-Smith. 2004. Resolution and evolution of the duck-billed platypus karyotype with an X1Y1X2Y2X3Y3X4Y4X5Y5 male sex chromosome constitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101:16257-16261.
- Rens, W., P. O'Brien, F. Grutzner, O. Clarke, D. Graphodatskaya, E. Tsend-Ayush, V. Trifonov, H. Skelton, M. Wallis, S. Johnston, F. Veyrunes, J. Graves, and M. Ferguson-Smith. 2007. The multiple sex chromosomes of platypus and echidna are not completely identical and several share homology with the avian Z. *Genome Biology.* 8:R243.

Revenkova, E., M. Eijpe, C. Heyting, B. Gross, and R. Jessberger. 2001. Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol Cell Biol.* 21:6984-6998.

Revenkova, E., and R. Jessberger. 2005. Keeping sister chromatids together: cohesins in meiosis. *Reproduction.* 130:783-790.

Revenkova, E., and R. Jessberger. 2006. Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins. *Chromosoma.* 115:235-240.

Ribagorda, M., S. Berrios, E. Solano, E. Ayarza, M. Martin-Ruiz, A. Gil-Fernandez, M.T. Parra, A. Viera, J.S. Rufas, E. Capanna, R. Castiglia, R. Fernandez-Donoso, and J. Page. 2019. Meiotic behavior of a complex hexavalent in heterozygous mice for Robertsonian translocations: insights for synapsis dynamics. *Chromosoma.* 2:019-00695.

Roche, L., G. Seluja, and R. Wettstein. 1986. The meiotic behaviour of the XY pair in *Lutreolina crassicaudata* (Marsupialia: Didelphoidea). *Genetica.* 71:213-224.

Rofe, R., and D. Hayman. 1985. G-banding evidence for a conserved complement in the Marsupialia. *Cytogenet Cell Genet.* 39:40-50.

Rog, O., S. Köhler, and A.F. Dernburg. 2017. The synaptonemal complex has liquid crystalline properties and spatially regulates meiotic recombination factors. *eLife.* 3:21455.

Rogakou, E.P., C. Boon, C. Redon, and W.M. Bonner. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol.* 146:905-916.

Roig, I., J.A. Dowdle, A. Toth, D.G. de Rooij, M. Jasin, and S. Keeney. 2010. Mouse TRIP13/PCH2 Is Required for Recombination and Normal Higher-Order Chromosome Structure during Meiosis. *PLoS Genetics.* 6:e1001062.

Romanienko, P.J., and R.D. Camerini-Otero. 2000. The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell.* 6:975-987.

Rothkamm, K., S. Barnard, J. Moquet, M. Ellender, Z. Rana, and S. Burdak-Rothkamm. 2015. DNA damage foci: Meaning and significance. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 56:491-504.

Rowe, T., T.H. Rich, P. Vickers-Rich, M. Springer, and M.O. Woodburne. 2008. The oldest platypus and its bearing on divergence timing of the platypus and echidna clades. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:1238-1242.

Royo, H., G. Polikiewicz, S.K. Mahadevaiah, H. Prosser, M. Mitchell, A. Bradley, D.G. de Rooij, P.S. Burgoyne, and J.M. Turner. 2010. Evidence that meiotic sex chromosome inactivation is essential for male fertility. *Curr Biol.* 20:2117-2123.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold spring harbor laboratory press.

- Sciurano, R.B., M.I. Rahn, L. Rossi, J.P. Luaces, M.S. Merani, and A.J. Solari. 2012. Synapsis, recombination, and chromatin remodeling in the XY body of armadillos. *Chromosome Research*. 20:293-302.
- Scherthan, H., M. Jerratsch, B. Li, S. Smith, M. Hultén, T. Lock, and T. de Lange. 2000. Mammalian meiotic telomeres: protein composition and redistribution in relation to nuclear pores. *Mol Biol Cell*. 11:4189-4203.
- Scherthan, H., S. Weich, H. Schwegler, C. Heyting, M. Harle, and T. Cremer. 1996. Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol*. 134:1109-1125.
- Schimenti, J. 2005. Synapsis or silence. *Nat Genet*. 37:11-13.
- Schramm, S., J. Fraune, R. Naumann, A. Hernandez-Hernandez, C. Höög, H.J. Cooke, M. Alsheimer, and R. Benavente. 2011. A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genet*. 7:26.
- Schwacha, A., and N. Kleckner. 1997. Interhomolog Bias during Meiotic Recombination: Meiotic Functions Promote a Highly Differentiated Interhomolog-Only Pathway. *Cell*. 90:1123-1135.
- Seluja, G., L. Roche, and A.J. Solari. 1987. Male meiotic prophase in *Didelphis albiventris*. *J Heredity*. 78:218-222.
- Sharma, A., K. Singh, and A. Almasan. 2012. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol Biol*. 920:613-626.
- Sharman, G.B. 1971. Late DNA replication in the paternally derived X chromosome of female kangaroos. *Nature*. 230:231-232.
- Sharman, G.B. 1973. The chromosomes of non-eutherian mammals. In *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. A.B. Chiarelli and E. Capanna, editors. Academic Press, London. 485-530.
- Sharp, P. 1982. Sex chromosome pairing during male meiosis in marsupials. *Chromosoma*. 86:27-47.
- Shin, Y.H., Y. Choi, S.U. Erdin, S.A. Yatsenko, M. Kloc, F. Yang, P.J. Wang, M.L. Meistrich, and A. Rajkovic. 2010. Hormad1 mutation disrupts synaptonemal complex formation, recombination, and chromosome segregation in mammalian meiosis. *PLoS Genet*. 6:1001190.
- Snowden, T., S. Acharya, C. Butz, M. Berardini, and R. Fishel. 2004. hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday Junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol Cell*. 15:437-451.
- Solari, A.J. 1974. The behavior of the XY pair in mammals. *Int Rev Cytol*. 38:273-317.
- Solari, A.J. 1993. Sex chromosomes and sex determination in vertebrates. CRC Press, Boca Raton. 308 pp.

Solari, A.J., and N.O. Bianchi. 1975. The synaptic behaviour of the X and Y chromosomes in the marsupial *Monodelphis dimidiata*. *Chromosoma*. 52:11-25.

Sosa, E., L. Flores, W. Yan, and J.R. McCarrey. 2015. Escape of X-linked miRNA genes from meiotic sex chromosome inactivation. *Development*. 142:3791-3800.

Spangenberg, V., M. Arakelyan, E. Galoyan, S. Matveevsky, R. Petrosyan, Y. Bogdanov, F. Danielyan, and O. Kolomiets. 2017. Reticulate Evolution of the Rock Lizards: Meiotic Chromosome Dynamics and Spermatogenesis in Diploid and Triploid Males of the Genus *Darevskia*. *Genes (Basel)*. 8.

Suja, J.A., and J.L. Barbero. 2009. Cohesin complexes and sister chromatid cohesion in mammalian meiosis. *Genome Dyn*. 5:94-116.

Sumara, I., E. Vorlaufer, C. Gieffers, B.H. Peters, and J.M. Peters. 2000. Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol*. 151:749-762.

Syrjänen, J.L., L. Pellegrini, and O.R. Davies. 2014. A molecular model for the role of SYCP3 in meiotic chromosome organisation. *eLife*. 20:02963.

Takagi, N., and M. Sasaki. 1975. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature*. 256:640-642.

Toder, R., R.J. O'Neill, J. Wienberg, P.C. O'Brien, L. Voullaire, and J.A. Marshall-Graves. 1997. Comparative chromosome painting between two marsupials: origins of an XX/XY1Y2 sex chromosome system. *Mamm Genome*. 8:418-422.

Toth, A., K.P. Rabitsch, M. Galova, A. Schleiffer, S.B. Buonomo, and K. Nasmyth. 2000. Functional genomics identifies monopolin: a kinetochore protein required for segregation of homologs during meiosis I. *Cell*. 103:1155-1168.

Tres, L.L. 1977. Extensive pairing of the XY bivalent in mouse spermatocytes as visualized by whole-mount electron microscopy. *J Cell Sci*. 25:1-15.

Tsai, J.H., and B.D. McKee. 2011. Homologous pairing and the role of pairing centers in meiosis. *J Cell Sci*. 124:1955-1963.

Tsend-Ayush, E., R.D. Kortschak, P. Bernard, S.L. Lim, J. Ryan, R. Rosenkranz, T. Borodina, J.C. Dohm, H. Himmelbauer, V.R. Harley, and F. Grützner. 2012. Identification of mediator complex 26 (*Crsp7*) gametologs on platypus X1 and Y5 sex chromosomes: a candidate testis-determining gene in monotremes? *Chromosome Res*. 20:127-138.

Turner, J.M. 2007. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development*. 134:1823-1831.

Turner, J.M., O. Aprelikova, X. Xu, R. Wang, S. Kim, G.V. Chandramouli, J.C. Barrett, P.S. Burgoyne, and C.X. Deng. 2004. BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol*. 14:2135-2142.

- Valdeolmillos, A.M., A. Viera, J. Page, I. Prieto, J.L. Santos, M.T. Parra, M.M. Heck, A.C. Martinez, J.L. Barbero, J.A. Suja, and J.S. Rufas. 2007. Sequential loading of cohesin subunits during the first meiotic prophase of grasshoppers. *PLoS Genet.* 3:e28.
- van der Heijden, G.W., A.A. Derijck, E. Posfai, M. Giele, P. Pelczar, L. Ramos, D.G. Wansink, J. van der Vlag, A.H. Peters, and P. de Boer. 2007. Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet.* 39:251-258.
- Veyrunes, F., J. Perez, B. Borremans, S. Gryseels, L.R. Richards, A. Duran, P. Chevret, T.J. Robinson, and J. Britton-Davidian. 2014. A new cytotype of the African pygmy mouse *Mus minutoides* in Eastern Africa. Implications for the evolution of sex-autosome translocations. *Chromosome Res.* 22:533-543.
- Veyrunes, F., P.D. Waters, P. Miethke, W. Rens, D. McMillan, A.E. Alsop, F. Grützner, J.E. Deakin, C.M. Whittington, K. Schatzkamer, C.L. Kremitzki, T. Graves, M.A. Ferguson-Smith, W. Warren, and J.A. Marshall Graves. 2008. Bird-like sex chromosomes of platypus imply recent origin of mammal sex chromosomes. *Genome Research.* 18:965-973.
- Viera, A., M.T. Parra, J.S. Rufas, and J. Page. 2017. Transcription reactivation during the first meiotic prophase in bugs is not dependent on synapsis. *Chromosoma.* 126:179-194.
- Villeneuve, A.M. 1994. A cis-acting locus that promotes crossing over between X chromosomes in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 136:887-902.
- von Wettstein, D., S.W. Rasmussen, and P.B. Holm. 1984. The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu Rev Genet.* 18:331-413.
- Vozdova, M., A. Ruiz-Herrera, J. Fernandez, H. Cernohorska, J. Frohlich, H. Sebestova, S. Kubickova, and J. Rubes. 2016. Meiotic behaviour of evolutionary sex-autosome translocations in Bovidae. *Chromosome Res.* 24:325-338.
- Wallis, M., P. Waters, M. Delbridge, P. Kirby, A. Pask, F. Grützner, W. Rens, M. Ferguson-Smith, and J. Graves. 2007. Sex determination in platypus and echidna: autosomal location of SOX3 confirms the absence of SRY from monotremes. *Chromosome Research.* 15:949-959.
- Wang, Y., Y. Chen, J. Chen, L. Wang, L. Nie, J. Long, H. Chang, J. Wu, C. Huang, and M. Lei. 2019. The meiotic TERB1-TERB2-MAJIN complex tethers telomeres to the nuclear envelope. *Nature communications.* 10:019-08437.
- Waters, P.D., M.C. Wallis, and J.A. Marshall Graves. 2007. Mammalian sex--Origin and evolution of the Y chromosome and SRY. *Semin Cell Dev Biol.* 18:389-400.
- Weitzer, S., and F. Uhlmann. 2002. Chromosome segregation: playing polo in prophase. *Dev Cell.* 2:381-382.
- Westerman, M., R.W. Meredith, and M.S. Springer. 2010. Cytogenetics meets phylogenetics: a review of karyotype evolution in diprotodontian marsupials. *The Journal of heredity.* 101:690-702.

Widger, A., S.K. Mahadevaiah, J. Lange, E. Ellnati, J. Zohren, T. Hirota, S. Pacheco, A. Maldonado-Linares, M. Stanzione, O. Ojarikre, V. Maciulyte, D.G. de Rooij, A. Tóth, I. Roig, S. Keeney, and J.M.A. Turner. 2018. ATR is a multifunctional regulator of male mouse meiosis. *Nature communications*. 9:018-04850.

Winters, T., F. McNicoll, and R. Jessberger. 2014. Meiotic cohesin STAG3 is required for chromosome axis formation and sister chromatid cohesion. *Embo J*. 33:1256-1270.

Wojtasz, L., K. Daniel, I. Roig, E. Bolcun-Filas, H. Xu, V. Boonsanay, C.R. Eckmann, H.J. Cooke, M. Jasin, S. Keeney, M.J. McKay, and A. Toth. 2009. Mouse HORMAD1 and HORMAD2, two conserved meiotic chromosomal proteins, are depleted from synapsed chromosome axes with the help of TRIP13 AAA-ATPase. *PLoS Genetics*. 5:e1000702-e1000702.

Wolf, K.W. 1994. How meiotic cells deal with non-exchange chromosomes. *Bioessays*. 16:107-114.

Yang, F., R. De La Fuente, N.A. Leu, C. Baumann, K.J. McLaughlin, and P.J. Wang. 2006. Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol*. 173:497-507.

Yang, Q., D. Zhang, M. Leng, L. Yang, L. Zhong, H.J. Cooke, and Q. Shi. 2011. Synapsis and meiotic recombination in male Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*). *PLoS One*. 6:e19255.

Yuan, L., J.G. Liu, J. Zhao, E. Brundell, B. Daneholt, and C. Hoog. 2000. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell*. 5:73-83.

Zhou, Q., L. Huang, J. Zhang, X. Zhao, Q. Zhang, F. Song, J. Chi, F. Yang, and W. Wang. 2006. Comparative genomic analysis links karyotypic evolution with genomic evolution in the Indian muntjac (*Muntiacus muntjak vaginalis*). *Chromosoma*. 115:427-436.

Zickler, D. 2006. From early homologue recognition to synaptonemal complex formation. *Chromosoma*. 115:158-174.

Zickler, D., and N. Kleckner. 1998. The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet*. 32:619-697.

Zushi, H., C. Murata, S. Mizushima, C. Nishida, and A. Kuroiwa. 2017. Unique XCI evolution in Tokudaia: initial XCI of the neo-X chromosome in Tokudaia muenninki and function loss of XIST in Tokudaia osimensis. *Chromosoma*. 126:741-751.

