

Informe final publicable de proyecto

Bases moleculares de la meiosis: Regulación mediada por ARNs no codificantes largos

Código de proyecto ANII: FCE_1_2021_1_166510

Fecha de cierre de proyecto: 01/05/2026

GEISINGER WSCHEBOR, Adriana (Responsable Técnico - Científico)

FRANÇOIS LÓPEZ, Mateo Alberto (Investigador)

BENAVENTE, Ricardo (Investigador)

CRISPO BENEDETTO, Martina (Investigador)

RODRÍGUEZ CASURIAGA, Rosana Elizabeth (Investigador)

TROVERO MARTÍNEZ, María Fernanda (Investigador)

DE LOS SANTOS SILVA, Eliana (Becario)

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE" (Institución Proponente) \

INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO \ \ FUNDACIÓN DE APOYO AL INSTITUTO CLEMENTE ESTABLE \ \ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

La meiosis es una división celular única que en los metazoarios forma parte del proceso de formación de células reproductoras, y es esencial para la continuidad de la especie. Durante la misma ocurren el apareamiento, recombinación y segregación de cromosomas homólogos, mediados por los complejos sinaptonémicos, y cuya alteración está en la base de numerosas patologías, incluyendo infertilidad y otras. A pesar de su enorme importancia, poco se sabe sobre las bases moleculares de los mecanismos de reconocimiento, apareamiento y recombinación meióticas; algunas evidencias sugieren participación de ARNs no codificantes. Los ARNs no codificantes largos (lncRNAs) son moléculas que no dirigen la síntesis de proteínas, presentes en todos los eucariotas. En vertebrados son particularmente abundantes en el testículo, y especialmente en células meióticas y posmeióticas, donde podrían desempeñar importantes roles regulatorios. En un proyecto anterior, empleando técnicas de secuenciación masiva (RNAseq) hemos generado un catálogo de los lncRNAs expresados en las distintas etapas a lo largo de la espermatogénesis del ratón. Nos proponemos ahora caracterizar un subgrupo de esos lncRNAs específicos o diferenciales de la meiosis, de modo de aportar información acerca de su posible rol en la regulación de los procesos meióticos como apareamiento y recombinación de cromosomas homólogos, entre otros. Con ese fin, realizaremos estudios de localización mediante hibridación in-situ de ARNs (RNA-FISH) en colocación con diversos componentes meióticos, evaluación de su presencia y distribución en testículos de ratones mutantes de pérdida de función con arresto meiótico y falla de apareamiento homólogo, y estudios funcionales de silenciamiento a través de interferencia de ARN (RNAi) in vivo en testículo para evaluar posibles consecuencias sobre la meiosis y la espermatogénesis. Finalmente, planeamos seleccionar algunos de esos ratones con silenciamiento testicular de lncRNAs para estudios de RNAseq, con el objeto de descifrar alteraciones transcripcionales inducidas por dicho silenciamiento.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Biología Molecular de la Reproducción

Palabras clave: meiosis / ARNs no codificantes largos / interferencia de ARN in vivo /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

ANTECEDENTES

I. La meiosis-

La meiosis es un proceso de división celular especial consistente en duplicación del ADN seguida de dos divisiones consecutivas (meiosis I y II), cuyo resultado son células haploides. Está altamente conservada en eucariotas, desde levaduras hasta humanos. En metazoarios ocurre en el marco de la gametogénesis, y es exclusiva de las células de línea germinal.

La alteración del programa meiótico está en la base de un importante número de problemas de fertilidad(1-4) y otras patologías(5). Por tanto, la necesidad de profundizar el conocimiento de las bases moleculares de la meiosis es evidente. Además, su estudio es de altísimo interés en investigación básica: i) es esencial para la reproducción sexual, función maestra que garantiza el pasaje de genes a la siguiente generación, y forma de reproducción más difundida en la escala biológica; ii) es una división tan peculiar que produce células haploides y todas diferentes entre sí (presentan un genoma reorganizado individualmente), y iii) constituye una de las principales fuentes de biodiversidad.

A pesar de su enorme importancia, los estudios moleculares de la meiosis se ven limitados por algunos obstáculos intrínsecos. La primera gran limitante es la inexistencia de sistemas confiables de cultivo in-vitro, lo que subraya la complejidad del proceso(6-9). Además, en los testículos de mamíferos adultos coexisten más de 30 tipos celulares diferentes, y esta gran heterogeneidad representa un enorme obstáculo para los estudios moleculares de las distintas etapas espermatogénicas, ya que los mismos requieren disponer del tipo celular de interés en forma aislada.

Dado que algunos de los eventos meióticos principales, como el apareamiento y recombinación homólogos, ocurren durante la profase de la primera división meiótica (profase I), gran parte del interés se centra en esta etapa. Un evento crucial de la profase I es la formación de los complejos sinaptonémicos (CSs), estructuras proteicas características y exclusivas de meiosis, que aparecen mediando el apareamiento y recombinación (e.g. 20). El apareamiento de cromosomas homólogos y su segregación posterior mantienen el número cromosómico de la especie. Por su parte, la recombinación meiótica (crossing-over) es fuente fundamental de biodiversidad para las especies con reproducción sexual, ya que produce células con un genoma organizado individualmente, y los cambios producidos son perpetuables.

Se ha descrito interrupción de meiosis en profase I en más del 10% de los casos de azoospermia no obstructiva (ausencia total de espermatozoides sin alteraciones en los conductos de eyaculación; e.g. 21,22). Como los dos eventos principales de la profase I (apareamiento y recombinación) son cruciales para la segregación cromosómica posterior, es entendible que la alteración de genes relevantes para estos procesos pueda tener consecuencias dramáticas para la fertilidad. Errores de segregación suelen ser causa de aneuploidías, abortos espontáneos y defectos de desarrollo(1). Particularmente, se han descrito varios casos de infertilidad con arresto en profase meiótica, asociados a mutaciones en genes codificantes para componentes del CS(3,10).

El CS está altamente conservado en la evolución(27): en todos los organismos estudiados, contiene dos elementos laterales (ELs), un elemento central (EC), y filamentos transversos extendiéndose entre los ELs y el EC(20; ver Otros documentos adjuntos-Fig.1). En mamíferos conocemos actualmente 8 proteínas integrantes de los CSs(20,28). En los últimos años, hemos aprendido sobre la función de los componentes del CS(28-38), su conservación evolutiva(27;39-45), y su organización(46-48).

Sin embargo, conocemos muy poco aún sobre la función del CS y los mecanismos que regulan el reconocimiento y apareamiento meióticos(49). El CS debería participar en estos procesos, pero no está claro cómo. Sabemos que las proteínas SYCP3 (synaptonemal_complex_protein_3), principal componente de los ELs del CS y SYCP1 (synaptonemal_complex_protein_1), constituyente de los filamentos transversos, unen ADN(50-52), y el otro componente de los ELs, SYCP2 (synaptonemal_complex_protein_2), también tendría dominios de unión a ADN. Se ha sugerido que regiones de ADN

unidas a los CSs estarían enriquecidas en secuencias repetidas(53), aunque se desconocen las secuencias implicadas, y por qué la recombinación ocurre sólo en ciertas regiones y no en otras. Se ha sugerido asimismo la presencia de ARNs en los CSs, aunque se ignora su identidad y función.

II. ARNs no codificantes largos, participación en espermatogénesis, y posible vinculación a procesos meióticos-

Estudios transcriptómicos revelan que el testículo, y particularmente las células meióticas y post-meióticas, presentan un transcriptoma tremendamente complejo (cantidad de genes expresados, multiplicidad de variantes de splicing)(63), destacando especialmente una abundancia abrumadoramente mayor de lncRNAs que en ningún otro órgano/tejido(12,64). Esos lncRNAs podrían desempeñar importantes roles(e.g.65), y algunos se han vinculado a diversas patologías testiculares(66).

Resulta interesante que algunos lncRNAs desempeñarían roles vinculados a regulación de procesos meióticos (ingreso en meiosis y progresión de la misma, regulación de proteínas esenciales, etc.), aunque aún se conocen pocos ejemplos(19). Sin duda, se irán descubriendo nuevos roles para estos lncRNAs meióticos en el futuro cercano.

Pero, ¿participan lncRNAs en el apareamiento y reconocimiento de cromosomas homólogos durante la profase meiótica? Debe(n) existir algún(os) mecanismo(s) que facilite(n) el reconocimiento, y garantice(n) la especificidad del apareamiento(49). Este(os) mecanismo(s), que es(son) central(es) para la biología, aún no ha(n) podido ser dilucidado(s).

Un hallazgo especialmente interesante fue efectuado por Ding et al.,2012(67), quienes identificaron en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, un lncRNA que media el reconocimiento homólogo y apareamiento robusto durante la profase meiótica. Dicho lncRNA se acumula en las inmediaciones del locus a partir del cual es transcripto, cuando se deleta dicho locus se pierde el apareamiento en ese punto, y cuando se transpone a otro sitio, ocurre apareamiento en ese sitio ectópico. Más recientemente, se describieron otros lncRNAs que mediarían el reconocimiento y apareamiento robusto en otros dos loci de *S.pombe*(68). Creemos que mecanismos mediados por lncRNAs podrían participar también en el reconocimiento de homólogos y apareamiento en eucariotas superiores [de hecho, algunas proteínas que actuarían en estos procesos en *S.pombe* están conservadas en eucariotas superiores;(68)], pero los mismos son desconocidos hasta ahora.

III. Antecedentes del equipo de trabajo-

Este proyecto se enmarca en una línea de trabajo de un grupo multidisciplinario (biología reproductiva, citometría de flujo, bioinformática) que desarrolla actividades en conjunto desde hace años. Entre los avances destacables, nuestro grupo ha sido pionero en el desarrollo de metodologías de purificación de células de distintas etapas de espermatogénesis de roedores por citometría de flujo (CMF) con altísimo nivel de pureza, preservando la integridad de los ácidos nucleicos al incorporar un fluorocromo de nueva generación en el espectro visible (evitando el uso de luz UV), y clasificando distintas etapas de profase meiótica, incluyendo profase temprana, etapa en que ocurren el reconocimiento y apareamiento homólogo(77-84).

Estos antecedentes nos permitieron desarrollar un proyecto durante el cual se analizó y caracterizó, por primera vez, el transcriptoma (RNAseq) a lo largo de la espermatogénesis del ratón empleando células altamente puras e incluyendo, también por primera vez, profase I temprana(74). Como paso siguiente, nos abocamos al estudio del transcriptoma no codificante, con el objeto de contribuir a elucidar su rol en relación a regulación de los procesos espermatogénicos. Dado que los sncRNAs habían sido más extensamente estudiados por otros grupos(e.g.55,56,etc.), decidimos concentrarnos en los lncRNAs. Con ese objetivo, se secuenció nuevamente el transcriptoma de poblaciones celulares de las distintas etapas de espermatogénesis purificadas por CMF, pero esta vez partiendo de genotecas construidas direccionalmente (hebra-específicas), que son ideales para identificar lncRNAs, al permitirnos conocer de qué hebra provienen las lecturas que alinean al genoma(85). Este trabajo nos permitió generar un catálogo de lncRNAs específicos de cada etapa, y los mismos se caracterizaron respecto a longitud y número de exones, distribución cromosómica, biotipos predominantes (intergénicos, antisentido solapantes con genes codificantes, etc.), conservación evolutiva, co-expresión con genes codificantes adyacentes o solapantes, etc. Además, con el fin de avanzar en la caracterización de dichos lncRNAs, se seleccionaron algunos para localización mediante hibridación in-situ fluorescente(RNA-FISH), empleando la tecnología Stellaris™(Biosearch). Esta tecnología consiste en utilizar hasta 48 oligonucleótidos de unas 20 bases contra el ARN de interés, conjugados a fluoróforos, y posee un mayor nivel de sensibilidad que las sondas convencionales(e.g.86).

Mediante este abordaje pudimos confirmar la co-localización de un ARNm con su lncRNA antisentido solapante, lo que refuerza la idea de una posible relación funcional entre ambos(75). Además, observamos que buena parte de los lncRNAs post-meióticos analizados se localizaban en el cuerpo cromatoide(CC), organelo sin membrana característico de las espermátidas, y cuyo rol aparentemente se vincularía a regulación postranscripcional y secuestro de mensajeros(87;88). Este hallazgo sería de altísima relevancia, al sugerir la participación de lncRNAs en el secuestro de mensajeros (Trovero et al., aún no publicado), un mecanismo extensivamente desarrollado en estas células, para garantizar la síntesis proteica altamente regulada en las espermátidas elongadas, que (debido a su elevado nivel de compactación cromatínica) son transcripcionalmente inertes (e.g.19;89;90).

Adicionalmente, para un lncRNA con elevado nivel de expresión en profase meiótica (a efectos de simplificar, le llamaremos lncRNA-1), observamos en meiocitos una señal en forma de un único punto, que en ocasiones se veía como dos puntos próximos de intensidad algo menor, y cuya localización coincide con la ubicación del locus a partir del cual se transcribe, recordando de manera notable lo reportado para *S.pombe*. Esto nos desafía a explorar si lncRNAs podrían estar participando en la búsqueda de homólogos y/o alineamiento homólogo durante la profase meiótica en mamíferos lo cual, de ser así, constituiría un descubrimiento revolucionario.

Por otra parte, a partir de las listas de lncRNAs generadas, hemos identificado algunos otros candidatos interesantes. Además de profundizar estudios funcionales con el lncRNA-1, nos proponemos analizar algunos de estos otros candidatos, de modo de evaluar su posible rol en relación con los procesos meióticos, ya sea que pudieran estar participando en los eventos de reconocimiento/apareamiento homólogo, u otros.

OBJETIVOS

Objetivo general

Aportar conocimiento original sobre las bases moleculares de la meiosis, en particular en lo relativo al posible rol de secuencias de lncRNAs específicos o diferenciales de la profase meiótica masculina en el ratón. Nos interesa conocer acerca de su posible participación en la regulación

de los distintos procesos que tienen lugar durante la misma, y cómo su alteración puede afectar al desarrollo de la meiosis y la espermatogénesis. De modo particular, nos interesa evaluar la posible participación de lncRNAs en los eventos de apareamiento y reconocimiento de homologías durante la meiosis.

Objetivos específicos

1) Determinar la localización (nuclear, citoplásmica) de lncRNAs de alta expresión en la profase meiótica del ratón, en cortes histológicos de testículo. Co-localización con componentes del aparato meiótico, y eventualmente otros.

2) Para lncRNAs que den señal nuclear en los espermatocitos en cortes, candidatos a desempeñar una función vinculada a la cromatina y/o CS (similar a lo observado para lncRNA-1), localizarlos sobre esparcidos (spreading) en núcleos meióticos de testículo de ratón. Co-localización con componentes proteicos de CSs y eventualmente otros (e.g. núcleos de recombinación) secuencial con RNA-FISH, y co-localización con sondas cromosómicas (e.g. chromosome painting, u otras como sondas teloméricas o centroméricas, dependiendo de la localización cromosómica de la señal del lncRNA) para confirmación de identidad cromosómica.

3) Para lncRNAs candidatos que den señal nuclear asociada a la cromatina en los espermatocitos en los experimentos anteriores, evaluar la posible alteración de la señal sobre cortes y esparcidos (spreading) en núcleos meióticos de testículo de ratones mutantes con arresto meiótico, falla de apareamiento y formación incompleta de CS, en comparación con ratones WT.

4) Puesta a punto de un método de silenciamiento génico (knock-down) in vivo en testículo.

5) Evaluación del efecto del silenciamiento de los lncRNAs en estudio, mediante análisis de diversos parámetros en los testículos KD, en comparación con controles (tamaño y peso testicular, morfología, conteo y motilidad espermática, estudios de ploidía por CMF, apoptosis, inmunotinción con diversos anticuerpos, dependiendo del fenotipo). Con respecto a profase meiótica, análisis de CSs por inmunofluorescencia de sus distintos componentes.

6) En el aspecto académico, un objetivo específico del proyecto es la formación de recursos humanos. Por lo tanto, se planea la realización de una tesis de posgrado o doctorado, así como también de tesinas de graduación de la Facultad de Ciencias, en el marco del mismo.

HIPÓTESIS

Hipótesis 1: Existen lncRNAs expresados diferencialmente durante la profase meiótica en eucariotas superiores, que desempeñan funciones regulatorias vinculadas a dicha etapa. En particular, proponemos que algunos de ellos se localizarían sobre los cromosomas meióticos. Nos planteamos testar esta hipótesis en la meiosis masculina del ratón, modelo mamífero por excelencia. Dado que durante la profase meiótica los cromosomas homólogos se aparean en torno a los CSs (y este apareamiento homólogo es esencial para una correcta recombinación y segregación cromosómicas), hipotetizamos que al menos algunos lncRNAs podrían participar de los eventos de reconocimiento/alineamiento de cromosomas homólogos (tal vez de forma análoga a lo identificado en la levadura *S. pombe*) y/o recombinación.

Hipótesis 2: Existen en el testículo del ratón lncRNAs específicos o diferenciales de la profase meiótica que desempeñarían roles esenciales para la meiosis y/o espermatogénesis, y cuyo silenciamiento produciría alteraciones en dicho proceso.

Metodología/Diseño del estudio

1) DISEÑO DE SONDAS Y RNA-FISH: A partir de nuestras listas de lncRNAs diferenciales, seleccionaremos 6-10 lncRNAs diferenciales de profase meiótica que en los alineamientos de HSP presenten un solo hit en un único cromosoma, además de algún lncRNA que dé un patrón de cobertura todo a lo largo de su cromosoma. Empleando el software Probe_Designer_v4.2 (<https://www.biosearchtech.com/stellaris-designer>), se diseñarán sondas Stellaris™. Se encargará su producción a Biosearch (Petaluma, CA, USA), de modo similar a lo ya realizado para el lncRNA-1 (meiótico) y los lncRNAs posmeióticos estudiados. Las sondas se utilizarán para localización de dichos lncRNAs en testículos de ratones CD1-Swiss adultos jóvenes, o pre-púberes de 17-19 días (que contienen mayor proporción de células en profase meiótica). Los animales serán sacrificados según las regulaciones de la Comisión_Nacional_de_Experimentación_Animal (CNEA). Seguiremos el protocolo de RNA-FISH utilizado previamente (<https://www.biosearchtech.com/support/resources/stellaris-protocols>). Eventualmente, dependiendo del patrón obtenido, podrá co-localizarse con componentes proteicos [inmunofluorescencia y FISH secuenciales (75); (<https://www.biosearchtech.com/support/resources/stellaris-protocols>)].

Para aquellos lncRNAs que den patrón de tinción nuclear, vinculado a la cromatina, en meiocitos, haremos RNA-FISH con inmunofluorescencia para co-localización con componentes del CS (e.g. SYCP3, SYCP1) y posiblemente otros (ej. núcleos de recombinación), en cortes y esparcidos. Adicionalmente, contrataremos cada cromosoma mediante "chromosome painting" (Metasystems, Alemania, para confirmar identidad cromosómica), y eventualmente otras sondas que permitan mejor localización del locus (ej. sondas teloméricas, o centroméricas, dependiendo de la ubicación del locus de cada lncRNA). Los resultados se visualizarán en microscopio confocal Zeiss LSM 800, con módulo de super-resolución AiryScan (Carl-Zeiss, Alemania).

2) LOCALIZACIÓN EN ESPARCIDOS DE TESTÍCULOS CON ARRESTO MEIÓTICO: Contamos con ratones mutantes para un componente del CS generados durante otro proyecto de nuestro grupo (ANII-FCE-II-126285). Estos ratones son infértiles, presentan formación incompleta de CSs, y falla de apareamiento meiótico. Para lncRNAs que dieran señal sobre cromosomas meióticos (incluyendo lncRNA-1, y posiblemente otros), evaluaremos

mediante RNA-FISH con contratinción fluorescente de CSs, en cortes y esparcidos, si el patrón de tinción varía respecto a lo observado en núcleos meióticos de ratones normales (ej. que al haber apareamiento incompleto la señal del lncRNA esté ausente, o se observen mayormente dos puntitos, uno correspondiente a cada cromosoma del par, en lugar de un único punto).

3) PUESTA A PUNTO DE UN SISTEMA DE SILENCIAMIENTO GÉNICO IN VIVO EN TESTICULO, Y ESTUDIOS FUNCIONALES (INTERFERENCIA DE ARN (RNAi) IN VIVO): Es importante recordar la ausencia de líneas de cultivo celular confiables de células meióticas [la única línea comercial existente, GC-2 (ATCC, Manassas, VA, USA), aunque es ofrecida como meiocitos, no presenta CSs ni expresa la mayoría de sus componentes(91)], lo que limita las posibilidades de experimentación in vitro. Para la caracterización funcional de genes meióticos codificantes, hemos recurrido, por lo tanto, a generación de ratones knockout empleando CRISPR/Cas9(76;92). No obstante, la generación de knockouts no resulta apropiada para estudiar lncRNAs antisentido solapantes con genes codificantes, porque afectarían también al gen codificante. Además, la inactivación de un lncRNA (delección del locus), sea antisentido o intergénico, con la consiguiente alteración de esa región de cromatina a causa de la delección, podría afectar la expresión de uno o múltiples genes codificantes (e.g.93;94), eventualmente teniendo consecuencias desconocidas e imposibles de evaluar.

En consecuencia, la estrategia de elección nos parece el knockdown (KD). Con ese fin, se realizará KD mediado por vector, lo que permite silenciamiento estable o transitorio de larga duración, y ha sido utilizado con éxito para lncRNAs de espermátidas(64).

Para algunos lncRNAs seleccionados (ej. lncRNA-1 y, eventualmente, algún otro) que a juzgar por los resultados obtenidos consideremos los más interesantes, diseñaremos shRNAs ("short_hairpin_RNAs") o miR_RNAi (microRNAs artificiales, ThermoScientific), dos por cada lncRNA, y "scrambled" (Ctrl; misma longitud y composición de bases distribuida aleatoriamente, control negativo) mediante las herramientas BLOCK-iT_RNAi_tools (ThermoScientific). Se escogerá vector (ej. pcDNA_6.2-GW/EmGFP-miR Expression Vector), un sistema de delivery mediado por lentivirus o adenovirus(ThermoScientific), y se procederá según las instrucciones del fabricante.

El silenciamiento in vivo implicará la puesta a punto del sistema de microinyección intratesticular. Para ello, probaremos microinyectar a través de parénquima, evaluando si las moléculas microinyectadas ingresan al interior de los túbulos seminíferos, o son retenidas por la barrera hematotesticular. En caso de no resultar la microinyección por parénquima, planeamos poner a punto la microinyección a través de la rete testis. Se microinyectará en testículos de ratones púberes o adultos jóvenes empleando los vectores y sistemas desarrollados por la empresa ThermoScientific (ver descripción detallada en: <https://www.thermofisher.com/uy/en/home/life-science/rnai/vector-based-rnai.html>). Para excluir diferencias individuales entre ratones, realizaremos microinyección testicular bilateral (un testículo con el shRNA/miR de interés y el contralateral con Ctrl). Las microinyecciones se harán en la UATE del Institut Pasteur de Montevideo, siguiendo todas las medidas de cuidado animal correspondientes. Los testículos se diseccionarán a los 30 días de la microinyección. Se validará eficiencia del KD por RT-qPCR.

Analizaremos posibles efectos testiculares [morfología, conteo y motilidad espermática, histología, análisis citométrico, apoptosis (TUNEL), inmunotinciones, etc.], para evaluar posibles alteraciones de la espermatogénesis(ej. arresto meiótico). Con respecto a profase meiótica, se analizarán los CSs por inmunofluorescencia, y en particular se evaluará si existe afectación del apareamiento en la región cromosómica correspondiente al locus (colocalización con "chromosome painting", y eventualmente otras sondas cromosómicas: teloméricas, centroméricas, dependiendo de la ubicación del locus en el cromosoma en cuestión). La expresión co-cistrónica del reportero EmGFP (presente en el vector) permitirá monitorear la captación del vector, facilitando la correlación con la actividad de RNAi.

NOTA: En lugar de RNAi, finalmente se optó por el uso de oligonucleótidos antisentido, más eficiente para nuestros objetivos (ver "Resultados").

4) INICIOS DE SECUENCIACIÓN MASIVA: Para contribuir a la comprensión de los mecanismos subyacentes a la acción de estos lncRNAs meióticos, eventualmente, y si los resultados así lo ameritaran, podremos seleccionar uno cuyo silenciamiento en los experimentos anteriores, dé un fenotipo de interés (podrá eventualmente ser lncRNA-1, u otro que surgiera de este proyecto). Los testículos silenciados (RNAi in vivo) serán empleados para análisis transcriptómicos (RNAseq) en comparación con testículos microinyectados con Ctrl, por triplicado, con el objeto de descifrar alteraciones transcripcionales inducidas por el silenciamiento de dicho lncRNA. Clasificaremos los tipos celulares de interés (ej. profase meiótica, dependiendo del fenotipo del KD) por CMF, en lo que poseemos amplia experiencia(74;75;77-84). Además, la presencia del reportero EmGFP permitirá clasificar sólo las células que hayan adquirido el vector, en base a la fluorescencia del reportero[<https://www.thermofisher.com/uy/en/home/life-science/rnai/vector-based-rnai.html>;(64)], permitiendo utilizar para RNAseq únicamente células que hayan adquirido el ARN interferente. Aunque excede el espacio temporal de este proyecto, se podrá generar el modelo, y los estudios de RNAseq se podrán iniciar en el marco del mismo.

Resultados, análisis y discusión

1 - Caracterización de un subgrupo de lncRNAs

Se analizaron las listas de transcriptos generados por nuestro grupo(75,96) y, a partir de las mismas, se seleccionaron 4 lncRNAs para el diseño de sondas para la realización de ensayos de RNA FISH. La selección se efectuó considerando criterios como tamaño mínimo (fundamental para posibilitar su detección), nivel de expresión, especificidad meiótica, y cercanía o solapamiento con genes codificantes. Uno de los lncRNAs seleccionados, de función desconocida y muy alta expresión en profase meiótica, se encontraba anotado en la base de datos Ensembl (Gm14244). Otros dos eran lncRNAs no anotados identificados por nuestro grupo(96), y elegidos por su potencial vinculación a genes codificantes de alta relevancia para la espermatogénesis: un lncRNA antisentido del gen Stk35 (le llamamos Stk35os2), que dirige la síntesis de una serín-treonín-kinasa nuclear altamente expresada en el testículo humano, y cuya alteración se ha vinculado a subfertilidad, y un lncRNA antisentido del gen Ybx2 (le llamamos Ybx2os1), codificante para un represor traduccional de genes clave en la espermatogénesis. El cuarto lncRNA seleccionado fue Kcnmb4os1 (que habíamos detectado previamente), un lncRNA antisentido de Kcnmb4, que codifica una proteína importante para la funcionalidad espermática. Dado que los lncRNAs suelen tener niveles menores de expresión que los ARNm, lo que imposibilita o dificulta su detección por métodos de FISH convencionales, se diseñaron sondas por la metodología Stellaris (mezcla de 25-40 oligonucleótidos cortos conjugados a fluorescencia) mediante un programa de software específico, y su producción se encomendó a la empresa Biosearch (U.S.A.). Los experimentos se realizaron en cortes histológicos de testículo de ratones juveniles (primera onda espermatogénica) y adultos, en paralelo.

Gm14244, Stk35os2 e Ybx2os1 presentaron localización citoplásmica, con aparente concentración en el cuerpo cromatoide, un gránulo citoplásmico

perinuclear típico de las células posmeióticas, con probable función en la regulación postranscripcional. Gm14244 presentó una densidad o concentración mayor que los demás, en tanto Ybx2os1, no presentó gran densidad y dio señal difusa; aunque diseñamos también sondas Stellaris contra su ARNm antisentido Ybx2 para ensayos de colocalización, ambos ARNs no presentaron colocalización evidente. Por otro lado, Kcnmb4os1 mostró una localización peculiar, y diferencial en células meióticas y posmeióticas. En células en profase meiótica mostró una señal en forma de uno o dos puntos brillantes discretos en el núcleo, en tanto en las células posmeióticas (espermátidas redondas) dio, al igual que algunos de los otros, una señal concentrada en el cuerpo cromatoide, pero colocalizando fuertemente con su ARNm antisentido solapante, lo que sugiere una función dual para este lncRNA. Si bien la señal fue más intensa en los ratones juveniles, también se apreció la señal en testículos de individuos adultos.

Dado que el patrón de localización más interesante para nuestros objetivos fue el de Kcnmb4os1, seleccionamos a éste para los estudios subsiguientes. Además de los cortes, los ensayos de FISH se efectuaron sobre esparcidos y aplastados ("swabs") de núcleos meióticos, y colocalizando con anticuerpos contra componentes del complejo sinaptonémico. Los resultados muestran que, en los núcleos meióticos, Kcnmb4os1 se encontraría asociado a los ejes del complejo sinaptonémico, lo que permite sospechar un posible rol vinculado al apareamiento homólogo durante la meiosis. La señal puntual se localiza cercana al telómero de un cromosoma de tamaño medio, lo que coincidiría con la ubicación del locus que codifica este ARN (posición sub-telomérica en el cromosoma 10), recordando de manera notable lo reportado para la levadura *S. pombe*. Con el fin de confirmar si este lncRNA se acumula sobre su propio locus (al igual que en la levadura), hemos efectuado varios intentos de colocalización con sondas de ADN específicas para el locus, por un lado, y sondas de chromosome painting, por otro, pero, de momento, estos experimentos han sido infructuosos, presumiblemente por incompatibilidades del protocolo de Stellaris y los de las sondas de ADN. De todos modos, continuamos intentando adaptaciones de los protocolos en este sentido.

Realizamos en paralelo los estudios de FISH e inmunofluorescencia sobre esparcidos de ratones mutantes para una proteína componente del complejo sinaptonémico generados en nuestro laboratorio. Estos ratones mutantes presentan detención de la meiosis en profase temprana, y, aunque poseen alineamiento de ejes del complejo sinaptonémico (el que no termina de formarse), carecen de apareamiento homólogo y recombinación. Nuestros resultados indican que el lncRNA se asocia a los ejes del complejo sinaptonémico en los ratones mutantes, y la característica de la señal recuerda a la observada en los meiocitos tempranos de ratones WT. Esto refuerza nuestra hipótesis de que este lncRNA podría estar vinculado al reconocimiento de homólogas (es decir, se localizaría sobre los ejes en una etapa temprana para el reconocimiento homólogo, y su localización sería independiente de la existencia o no de apareamiento).

2 - Desarrollo de la metodología de silenciamiento in vivo y análisis funcional de Kcnmb4os1

Dados los resultados obtenidos en la parte 1, seleccionamos al lncRNA Kcnmb4os1 para la realización de estudios funcionales. La caracterización funcional de lncRNAs antisentido de genes codificantes representa un enorme desafío porque las estrategias habituales de eliminación de expresión de lncRNAs basadas en CRISPR no suelen ser aplicables. La afectación de nucleótidos específicos, que en el caso de genes codificantes puede, por ejemplo, producir un codón stop conduciendo a la eliminación del producto proteico, aquí no aplican. Por otro lado, la estrategia de eliminar la secuencia completa del lncRNA, que ocasionalmente se ha utilizado para silenciar lncRNAs intergénicos, no es aplicable a lncRNAs antisentido, ya que interferiría con los genes codificantes solapantes (más allá de que también ha sido cuestionada para intergénicos, porque al eliminarse una región relativamente extensa de cromatina podrían afectarse regiones regulatorias no conocidas, y/o alterarse la regulación epigenética de esa región). Por todo lo antedicho, la estrategia que propusimos para la realización de estudios funcionales fue el silenciamiento génico (knock-down). No obstante, los métodos de silenciamiento mediado por ARNs interferentes (siRNAs, miRNAs) suelen permitir el silenciamiento de ARNs citoplásmicos, siendo poco eficientes para silenciar ARNs a nivel del núcleo. Es por ello que nos abocamos al desarrollo de metodologías de silenciamiento (knock-down) in vivo de lncRNAs basadas en el uso de oligonucleótidos antisentido (ASOs) modificados. Los ASOs son moléculas de ADN de hebra simple (15–22 nucleótidos), modificadas para aumentar estabilidad y afinidad, y diseñados para unirse por complementariedad de bases a secuencias específicas de ARN, facilitando su degradación mediada por la ARNasa H. La estrategia para diseño de ASOs implicó un extenso estudio de nuestra parte, el que abarcó varios meses, dado que los oligonucleótidos deben cumplir una serie de importantes requisitos para su funcionamiento en ensayos in vivo. Finalmente, diseñamos tres ASOs en paralelo para el lncRNA en cuestión, con nucleótidos LNA en los extremos y enlaces fosforotioato a lo largo de la molécula, y se encargó su producción a la empresa IDT (USA).

Una vez recibidos los ASOs, efectuamos algunos ensayos de microinyección en colaboración con la UBAL (Unidad de Biotecnología de Animales de Laboratorio) del Institut Pasteur de Montevideo, y variando diversos parámetros entre los distintos ensayos, tendientes a su optimización. Inicialmente se intentó la microinyección a través del parénquima. La eficiencia del silenciamiento se evaluó por observación microscópica en cortes (co-inyectando con azul tripan) y mediante ensayos de RT-qPCR. Los resultados indicaron que estos ensayos no resultaron lo exitosos que habríamos deseado, ya que los ASOs no sorteaban la barrera hematotesticular. En consecuencia, optamos por la microinyección de ASOs a través de la rete testis, para lo cual establecimos una colaboración con un laboratorio de la Universidad de Pittsburgh (Pensilvania, USA).

Para el procedimiento de microinyección se utilizaron ratones de 21 días posparto (primera onda de espermatogénesis). Brevemente, los ratones fueron anestesiados y colocados bajo una lupa estereoscópica, se expusieron quirúrgicamente los testículos, y se microinyectó cada ASO mediante una microaguja conectada a un sistema FemtoJet, cuidadosamente en la rete testis, sin superar las tres cuartas partes del volumen testicular, para no comprometer su integridad. Las microinyecciones se realizaron de forma bilateral, un testículo recibiendo el ASO, y el otro agua estéril como control interno, co-inyectando, en cada caso, con 1 ul de azul tripan como indicador para confirmar el ingreso a los túbulos seminíferos. Se inyectaron en paralelo cada uno de los ASOs con al menos 4 réplicas biológicas. Como control positivo se utilizó un ASO para el ARNm ubicuo Ppib. Tres días después, se extrajeron los testículos para análisis.

La eficacia del silenciamiento la evaluamos por RT-qPCR. Los resultados indicaron que el ASO#1 no redujo la expresión de Kcnmb4os1, mientras que ASO#2 y ASO#3 lograron un silenciamiento de 33% y 50%, respectivamente. Aunque estos niveles parecen moderados, dado el posible rol regulador del lncRNA, los resultados fueron alentadores, ya que pequeñas alteraciones podrían tener consecuencias celulares importantes. Además, el ASO control en este contexto sólo presentó un nivel de silenciamiento del 41%.

Con respecto al análisis fenotípico, los testículos microinyectados con ASO#2 y ASO#3 fueron más pequeños que sus contralaterales ($n=4-9$, $p<0,03$), diferencia no observada con ASO#1. El análisis de área de 200 túbulos seminíferos transversales por testículo confirmó la disminución significativa

de tamaño con ASO#2 y ASO#3 ($p < 0,0001$). Con el fin de evaluar si la reducción de tamaño observada en los túbulos y testículos se debía a muerte celular causada por el silenciamiento, procedimos a realizar ensayos de TUNEL (detecta fragmentación de ADN asociada a apoptosis). Se contaron número de núcleos TUNEL-positivos en 60 túbulos seminíferos por condición (ASO#2, ASO#3 y sus respectivos controles), tratando de abarcar diferentes áreas del testículo. Para ambos ASOs, se observó un aumento significativo en el número de células apoptóticas en los testículos tratados con ASO ($p < 0,0001$). Todo esto nos lleva a proponer que esta molécula tendría una función esencial para la meiosis.

3 - Generación de un modelo murino de knockout de Kcnmb4os1 mediante CRISPR/Cas

Dado que los resultados de silenciamiento transitorio del lncRNA Kcnmb4os1 mostraron que el mismo tiene una función esencial, ya que su silenciamiento produce muerte celular y disminución del tamaño testicular, consideramos importante avanzar en la caracterización funcional. Durante el desarrollo de este proyecto salió publicado un trabajo con una original estrategia para el silenciamiento permanente de lncRNAs antisentido, basada en CRISPR/Cas(98).

Basándonos en esa estrategia, hemos diseñado un mecanismo de silenciamiento permanente de esta molécula (un híbrido entre knockout y knock-down estable), mediante la generación de una línea de ratones con una muy pequeña delección que afecta al "branch point" (sólo en el lncRNA, no afectando al ARNm), conduciendo a la degradación de este lncRNA (al tratarse de una molécula expresada en las células espermatozógenas, no debería afectar la viabilidad de los individuos, aunque sí podría afectar la fertilidad). Si bien el diseño representó un desafío ya que debíamos ser sumamente cuidadosos de no afectar al gen codificante, la estrategia resultó exitosa, ya disponemos de los ratones mutantes, hemos cruzado a los heterocigotas y obtenido la primera generación de homocigotas. En este momento nos encontramos esperando que los mutantes homocigotas lleguen a la edad apropiada para efectuar tests de fertilidad y, posteriormente efectuar los análisis fenotípicos, de modo de poder profundizar en la caracterización funcional de Kcnmb4os1, en un contexto de silenciamiento estable. Esto nos permitirá darle más peso a los resultados obtenidos con el silenciamiento transitorio, y explorar más en profundidad la función de este lncRNA.

Conclusiones y recomendaciones

Kcnmb4os1 sería el primer lncRNA vinculado a los complejos sinaptonémicos y la cromatina en la profase meiótica I en un organismo multicelular. Su localización, patrón de expresión, forma de la señal, etc. recuerdan de manera notable a los lncRNAs implicados en el reconocimiento de homologías durante la meiosis en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, único organismo en el que se ha descrito hasta ahora participación de lncRNAs en estos procesos. Por otro lado, los experimentos de silenciamiento in vivo demostraron que este lncRNA es esencial, ya que su silenciamiento produce muerte celular. La hipótesis de que este lncRNA pueda estar vinculado al reconocimiento de homologías durante la profase meiótica en mamíferos resulta extremadamente atractiva, y representaría un hallazgo de altísimo impacto, ya que aportaría información sobre las bases moleculares de un proceso que se encuentra en la base de la vida de los organismos eucariotas, y sobre el cual la información disponible es aún muy escasa.

Otro aspecto importante de este proyecto fue que permitió poner a punto con éxito un método de silenciamiento testicular in vivo en ratón. Esta metodología podrá ser aplicada, a partir de ahora, en otros proyectos.

Finalmente, para intentar confirmar la hipótesis sobre la función de Kcnmb4os1 y ahondar en su rol y mecanismo de acción, hemos generado una línea de ratones mutantes mediante un novedoso abordaje que ya se encuentra avanzado y que, a la brevedad, nos permitirá caracterizar la función de este lncRNA en un contexto de silenciamiento permanente.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Artículo científico	Uncovering a multitude of stage-specific splice variants and putative protein isoforms generated along mouse spermatogenesis	Romeo-Cardellac C, Trovero MF, Radío S, Smircich P, Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A, Sotelo-Silveira J	10.1186/s12864-024-10170-z	https://hdl.handle.net/20.500.12381/5518	Finalizado
Tesis de doctorado	Patrones distintivos de expresión génica y procesamiento postranscripcional durante la espermatogénesis	Romeo Cardellac, Carlos	beca CAP	https://hdl.handle.net/20.500.12381/5515	Finalizado
Tesis de grado/monografías	Localización sub-celular de ARNs no codificantes largos, candidatos a cumplir funciones estructurales y/o regulatorias durante la espermatogénesis	François, Mateo	https://hdl.handle.net/20.500.12008/35091	https://hdl.handle.net/20.500.12381/5516	Finalizado
Tesis de doctorado	Bases moleculares de la meiosis: Regulación mediada por ARNs no codificantes largos	de los Santos, Eliana	POS_FCE_2021_1_1010801	https://hdl.handle.net/20.500.12381/5528	En proceso
Presentación en evento	IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES INVOLVED IN MEIOTIC ALIGNMENT AND RECOMBINATION	Francois M, Rodríguez-Casuriaga R, Benavente R, Sotelo-Silveira J*, Geisinger A*		https://hdl.handle.net/20.500.12381/5527	Finalizado
Presentación en evento	IMPACT OF SILENCING A MEIOTIC lncRNA ON	de los Santos E, Rodríguez-		https://hdl.handle.net/20.500.12381/5526	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
	SPERMATOGENESIS: DEVELOPMENT OF AN ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE MICROINJECTION-BASED APPROACH	Casuriaga R, Geisinger A			
Presentación en evento	Patrones distintivos de procesamiento postranscripcional y generación de nuevas isoformas durante la espermatogénesis	Romeo-Cardeillac C, Trovero MF, Radío S, Sotelo-Silveira J, Geisinger A		https://hdl.handle.net/20.500.12381/5525	Finalizado
Póster	Una enorme cantidad de variantes de procesamiento e isoformas proteicas se expresan diferencialmente durante la espermatogénesis	Romeo-Cardeillac C, Trovero MF, Radío S, Smircich P, Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A*, Sotelo-Silveira J*		https://hdl.handle.net/20.500.12381/5524	Finalizado
Presentación en evento	Localización sub-celular de ARNs no codificantes largos, candidatos a cumplir funciones estructurales y/o regulatorias durante la espermatogénesis	François M, Trovero MF, Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A		https://hdl.handle.net/20.500.12381/5523	Finalizado
Presentación en evento	Caracterización funcional y silenciamiento in vivo de lncRNAs mediante oligonucleótidos antisentido (ASOs) en testículo de ratón	de los Santos E, Rodríguez-Casuriaga, R, Geisinger, A		https://hdl.handle.net/20.500.12381/5522	Finalizado
Parte de libro	La meiosis y el complejo sinaptonémico: siete décadas de historia en el IIBCE	Geisinger, A, Rodríguez Casuriaga, R	978-9974-36-506-3	https://hdl.handle.net/20.500.12381/5519	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
------------------	--------	---------	-----------------	----------------------------	--------

Referencias bibliográficas

- Handel, MA, Schimenti, JC.(2010). Nat. Rev. Genet. 11:124-136.
- Hann, MC, et al.(2011). Asian J. Androl. 13:212-218.
- Geisinger, A, Benavente, R.(2016). Cytogenet Genome Res. 150:77-85.
- Gheldof, A, et al.(2019). J. Med. Genet. 56:271-282.
- Feichtinger, J, McFarlane, RJ.(2019). Andrology 7:415-427.
- Handel, MA et al.(2014). Cell 157:1257-1261.
- Sun, YC, et al.(2014) J. Genet. Genom. 41:87-95.
- Komeya, M, et al.(2018). Reprod. Med. Biol. 17:407-420.
- Bharti, D, et al. (2020). Cells 9:557.
- Hernández D, Geisinger A, Trovero MF, ..., Benavente R, Rodríguez-Casuriaga R.(2020). Mol Hum Reprod 26:485-497.
- Griswold MD.(2016). Physiological Rev 96:1-17.
- Soumillon M, et al.(2013). Cell Rep 3:2179-2190.
- Shima JE, et al.(2004). Biol Reprod 71:319-330.
- Laiho A, et al.(2013). Plos One 4:e61558.
- Lam, DMK, et al.(1970). Proc Natl Acad Sci USA 65:192-199.
- Meistrich ML.(1977). Methods Cell Biol 15:15-54.
- Suzuki, S, et al.(2019). Biol. Reprod. 101:617-634.
- Soraggi, S, et al.(2020). Hum. Genet. Jan16.
- Geisinger A, Rodríguez-Casuriaga R, Benavente R.(2021). Frontiers Cell Dev Biol 9:626020.
- Fraune J, ..., Benavente R.(2012). Exp Cell Res 318:1340.
- Roeder G, Bailis J.(2000). Trends Genet 16:395-403.
- Topping D, et al.(2006). Hum Reprod 21:3171-3177.
- Bolor H, et al.(2009) Am J Hum Genet 84:14-20.
- Wettstein R, Sotelo JR.(1971). In: Advances in Cell and Molecular Biology, pp.109-152 (New York:Academic Press).
- Esponda P, Giménez-Martín G.(1972). Chromosoma 38:405-417.
- Scherthan H.(2007). Cell Mol Life Sci 64:117-124.
- Fraune J, ..., Benavente R.(2012). Proc Natl Acad Sci USA 109:16588-16593.
- Gómez-HL, ..., Benavente R, et al.(2016). Nat Commun 7:13298.
- Liebe B, ..., Benavente R, Scherthan H.(2004). Mol Biol Cell 15:827-837.
- Ollinger R, ..., Benavente R.(2005). Mol Biol Cell 16:212-217.
- Costa Y, ..., Benavente R, Cooke HJ.(2005). J Cell Sci 118:2755-2762
- Hamer G, ..., Benavente R, Höög C.(2006). J Cell Sci 119:4025-4032.
- Bolcun-Filas E, ..., Benavente R, et al.(2007). J Cell Biol 176:741-747.
- Hamer G, ..., Benavente R, Höög C.(2008). J Cell Sci 121:2445-2451.
- Winkel K, ..., Benavente R.(2009). Chromosoma 118:259.
- Bolcun-Filas E, ..., Benavente R, Cooke HJ.(2009). PLoS Genet 5:e1000393.
- Schramm S, ..., Benavente R.(2011). PLoS Genet 7:e1002088.
- Kouznetsova A, Benavente R, et al.(2011). PLoS One 6:e28255.
- Baier A, ..., Benavente R.(2007). Biochim Biophys Acta 1774:595-602.
- Baier A, ..., Benavente R.(2007). Sex Dev 1:161-168.
- Alsheimer M, ..., Benavente R.(2010). Cytogenet Genome Res 128:162-168.
- Fraune J, ..., Benavente R.(2013). Genetics 195:781793
- Fraune J, ..., Benavente R.(2014). J Genet Genomics 41:107-115.
- Fraune J, ..., Benavente R.(2014). Cytogenet Genome Res 144:299-305.
- Fraune J, ..., Benavente R.(2016). Chromosoma 125:355-360.
- Schücker K, ..., Benavente R.(2015). Proc Natl Acad Sci USA 112:2029-2033.
- Spindler MC, ..., Benavente R.(2019). Sci Rep 9:16102.
- Zwettler FU, ..., Benavente R, Sauer M.(2020). Nat Commun 11:3222.
- Grey C, de Massy B.(2021). Front Cell Dev Biol 9:688878.
- Syrjänen JL, et al.(2014). eLife 3:e02963.
- Bollschweiler D, et al.(2019). Open Biol. 9:190094.
- Dunce JM, et al.(2018). Nature Struct Molec Biol 25:557-569.
- Hernández-Hernández A, ..., Benavente R, Vázquez-Nin G.(2008). Chromosoma 117:77-87.
- Djebali S, et al.(2012). Nature 489:101-108.

- 55.Kotaja N.(2014). MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertil Steril* 101:1552–1562.
- 56.Wang L, Xu C.(2015). *Reproduction* 149:R127-R137.
- 57.Li LJ, et al.(2017). *Exp. Cell Res.* 361:1-8.
- 58.Derrien T, et al.(2012). *Genome Res* 22:1775–1789.
- 59.Fatica A, Bozzoni I.(2014). *Nat Rev Genet* 15:7–21.
- 60.Wu T, Du Y.(2017). *Int J Biol Sci* 13:295-307.
- 61.Yao RW et al.(2019). *Nat Cell Biol* 21:542-551.
- 62.Tsagakis I, et al. (2020). *J Pathol* 250:480–495.
- 63.Geisinger A.(2008). En: "Cell Differentiation Research Developments". pp.97-123. (New York,Nova Publishers).
- 64.Li K, et al.(2021). *Genome Res* 31:13-26.
- 65.Luk ACS, et al.(2014). *Reproduction* 147:R131-141.
- 66.Trovero MF, Geisinger A.(2019). *AnFaMed* 6(1):12-29.
- 67.Ding DQ, et al.(2012). *Science* 336:732-736.
- 68.Ding DQ, et al.(2019). *Nat Commun* 10:5598.
- 69.Geisinger A,,,, Benavente R, Wettstein R.(2002). *Cytogenet Genome Res* 98:249-254.
- 70.Geisinger A,,,, Benavente R, Wettstein R.(2005). *Biochim Biophys Acta* 1728:34-43.
- 71.Capoano A,,, Geisinger A.(2010). *Gene Expr Patt* 10:1-8.
- 72.Goldman A,,,, Geisinger A.(2014). *Gene* 533:72-77.
- 73.Goldman A, Rodríguez Casuriaga R,,,,Geisinger, A.(2015). *Cell Tissue Res* 361:869-883.
- 74.Da Cruz I, Rodríguez-Casuriaga R, ...,Benavente R,,,, Geisinger A.(2016). *BMC Genomics* 17:294.
- 75.Trovero MF, Rodríguez-Casuriaga R,,,, Benavente R,,,, Geisinger A.(2020). *RNA Biol* 17:350-365.
- 76.Capoano CA,,,, Rodríguez-Casuriaga R, Schlapp G, Meikle MN,,,,Crispo M, Benavente R, Geisinger A.(2021). *PLOS ONE* 16(5):e0251028.
- 77.Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A, et al.(2009). *Biol Proced Online* 11:184-195.
- 78.Geisinger A, Rodríguez-Casuriaga, R.(2010). *Cytogenet Genome Res* 291489:1-11.
- 79.Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A, et al.(2011). *Cytometry,Part A* 79A:625-634.
- 80.Rodríguez-Casuriaga R,,,, Geisinger A.(2013). *J. Vis. Exp.* 78:e50102.
- 81.Geisinger A, Rodríguez-Casuriaga R, et al.(2014). *Cytometry A.* 85:989-990.
- 82.Rodríguez-Casuriaga R,,,,Geisinger A.(2014). *MethodsX* 1:239-243.
- 83.Geisinger A, Rodríguez-Casuriaga R.(2017). *Methods Molec Biol* 1471:217-230.
- 84.Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A.(2021). *Int J Mol Sci* 22(3):1151.
- 85.Ilott NE, Ponting CP.(2013). *Methods* 63:50-59.
- 86.Orjalo AV Jr, Johansson HE.(2016). *Methods Mol Biol* 2016:1402:119–134.
- 87.Meikar O, et al.(2011). *Reproduction*, 142:195-209.
- 88.Meikar O, et al.(2014). *RNA*, 20:483-495.
- 89.Kleene KC.(2001). *Mech Dev* 106:3-23.
- 90.Legrand JMD, Hobbs RM.(2018). *Semin Cell Dev Biol* 79:80–91.
- 91.Hong SH, et al.(2018). *BMC Genomics* 19:539.
- 92.Meikle MA, Schlapp G,,,,Geisinger A, Crispo M.(2016). *Transgenic Res* 25:251.
- 93.Bassett AR, et al.(2014). *eLife* 3:e03058.
- 94.Barman P, et al.(2019). *Non-coding RNA* 5:11-33.
- 95.Hellman LM, Fried MG.(2007). *Nat Protoc* 2:1849-1861.
96. Romeo-Cardellac C, Trovero MF, ... , Smircich P, Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A, Sotelo-Silveira J (2024). *BMC Genomics* 25:295.
97. Chen Z, et al. (2021). *Cell Biosci* 2021;1:213.
98. Zhang et al. (2023). *Nucleic Acids Res.* 51:e49.

Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)

