



Unidad Iztapalapa

División de Ciencias biológicas y de la Salud
Posgrado en Biología Experimental

“CTCF como regulador de múltiples mecanismos estructurales y moleculares durante la espermatogénesis”

TESIS

Que para obtener el grado de
DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

M en BE. Carlos Ulises Torres Flores
2163802562
ulisetorr13@gmail.com

DIRECTORES DE TESIS

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz
mcgr@xanum.uam.mx
Dr. Abrahan Hernández Hernández
abrahan.h.hernandez@gmail.com

ASESOR

Dr. Félix Recillas Targa
frecilla@ifc.unam.mx

JURADO

PRESIDENTE

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
legg@xanum.uam.mx

SECRETARIO

Dr. Ivan Uriel Bahena Ocampo
ivan.bahena@gmail.com

VOCALES

Dra. Rosario Ortiz Hernández
r_oh@ciencias.unam.mx
Dra. Roxana Uri Miranda Labra
roxml@xanum.uam.mx

Iztapalapa, Ciudad de México
03 de abril de 2023.

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave **DAFCYT-2003IDPTNNN0020**. Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: **615601**; CVU: **780957**.

Este estudio ha sido financiado por los proyectos institucionales **PAPIIT IN225917** de la Universidad Nacional Autónoma de México; **HIM/2018/079 SSA 1518**, **HIM2021/061 SSA 1758** del Hospital Infantil de México Federico Gómez y por apoyo directo del Patronato del Hospital Infantil de México Federico Gómez”.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“CTCF como regulador de múltiples mecanismos estructurales y moleculares durante la espermatogénesis”, que presentó:

Carlos Ulises Torres Flores

El día 03 de abril del año 2023



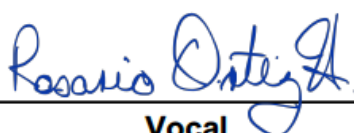
Presidente

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Departamento de Ciencias de la Salud UAM-I
e-mail: legg@xanum.uam.mx



Secretario

Dr. Ivan Uriel Bahena Ocampo
Departamento de Ciencias de la Salud UAM-I
e-mail: ivan.bahena@gmail.com



Vocal

Dra. Rosario Ortiz Hernández
Facultad de Ciencias, Laboratorio de Microscopía Electrónica, UNAM
e-mail: r_oh@ciencias.unam.mx



Vocal

Dra. Roxana Uri Miranda Labra
Depto. de Ciencias de la Salud, UAM-I
e-mail: roxml@xanum.uam.mx

Comité de tutores

Co-Director

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Profesor titular C tiempo completo, SNI III
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Ciencias de la Salud UAM-I
e-mail: mcgr@xanum.uam.mx
Tel: (52 55) 73 29 11, ext. 27304, 27305

Co-Director

Dr. Abraham Hernández Hernández

Investigador en Ciencias Médicas, SNI I
Laboratorio de Investigación en Patología Experimental
Hospital Infantil de México Federico Gómez
e-mail: abraham.h.hernandez@gmail.com
Tel: (52 55) 289917 ext 2368

Asesor

Dr. Félix Recillas Targa

Instituto de Fisiología Celular
Profesor titular C tiempo completo, SNI III
Universidad Nacional Autónoma de México
Departamento de Genética Molecular
e-mail: frecilla@ifc.unam.mx
Tel : (52 55) 56 22 56 03/04

Dedicado y con especial cariño para mis padres, tías y hermanos, por su acompañamiento emocional y el apoyo incondicional que contribuyen de manera significativa con mi pleno desarrollo profesional y humano.

Agradezco profundamente a mi comité de tutores por el asesoramiento y la constante compañía durante mi travesía por el posgrado.

Por último, agradezco a mis amigos de laboratorio y de generación por todas las charlas tranquilizadoras.

¡Gracias universo!

Resumen

CTCF es una proteína arquitectónica que organiza el genoma dentro del núcleo en casi todas las células eucariotas. Hay evidencias que sugieren el papel clave que CTCF tiene durante la espermatogénesis donde su eliminación da como resultado la producción anormal de espermatozoides e infertilidad en un modelo murino. Sin embargo, los defectos producidos por la eliminación de CTCF en la espermatogénesis no han sido del todo caracterizados. En este trabajo se realizó secuenciación de células individuales como herramienta para evaluar las alteraciones transcripcionales en células espermatogénicas con y sin la presencia de CTCF. Los análisis bioinformáticos, estructurales y bioquímicos, revelan los defectos en los procesos biológicos que explican el daño producido en los espermatozoides maduros. De esta manera, en la etapa temprana de la espermatogénesis las alteraciones no son tan evidentes; sin embargo, conforme las células germinales avanzan en la especialización o espermatogénesis los programas transcripcionales, morfológicos y bioquímicos se van alterando. En conclusión, este estudio resalta la contribución de CTCF en la especialización de los gametos masculinos y provee una descripción fundamental de su función en las etapas de la espermatogénesis.

Abstract

CTCF is an architectonic protein that organizes the genome inside the nucleus in almost all eukaryotic cells. There is evidence that CTCF plays a critical role during spermatogenesis as its depletion produces abnormal sperm and infertility in mice model. However, the defects produced by its depletion throughout spermatogenesis have not been fully characterized. In this work, we performed single cell RNA sequencing in spermatogenic cells with and without CTCF. Bioinformatic, structural and biochemical analysis uncovered altered biological process that are involved in mature sperm damage. At early stages of spermatogenesis, transcriptional alterations are mild. As germ cells go through the specialization stage or spermiogenesis, transcriptional, morphology and biochemical profiles become more altered. In conclusion, our study sheds light on the contribution of CTCF to the phenotype of male gametes and provides a fundamental description of its role at different stages of spermiogenesis.

ÍNDICE

Resumen	v
Abstract.....	vi
1 Introducción	1
1.1 El ratón como modelo experimental.....	2
1.2 Los ratones KO condicionales	3
1.3 El sistema de recombinación <i>Cre/loxP</i>	4
1.4 La espermatogénesis	5
1.5 Recambio y retención de histonas durante la espermatogénesis	6
1.6 La proteína CTCF.....	7
1.7 Aislamiento y secuenciación de ARN de célula única	8
1.8 Tecnología de microfluidos	10
2 Antecedentes	11
3 Justificación	14
4 Hipótesis	14
5 Objetivo general	15
5.1 Objetivos particulares	15
6 Materiales y métodos	15
6.1 Animales.....	15
6.2 Secuenciación de ARN de células individuales	16
6.3 Análisis de Datos.....	19
6.4 Análisis de enriquecimiento de vías.....	21
6.5 Mapas de enriquecimiento.....	21
6.6 Procesamiento de cortes histológicos.....	21
6.7 Western Blot de proteínas de testículos de ratones	22
7 Resultados	25
7.1 La secuenciación de ARN de célula única revela las poblaciones celulares de la espermatogénesis.....	25
7.2 Alteraciones en los perfiles transcripcionales de espermatogonias y espermatocitos	33
7.3 Los defectos en perfiles transcripcionales de espermátidas redondas provocan anomalías en funciones biológicas.....	35
7.4 La vía de incorporación de protaminas está afectada en las espermátidas de ratones <i>Ctcf-cKO</i>	39

7.5 Las espermátidas del ratón <i>Ctcf-cKO</i> muestran anomalías en la formación del acrosoma y la compactación nuclear.....	41
8 Discusión	46
9 Conclusiones	51
10 Modelo propuesto	52
11 Perspectivas	53
12 Referencias.....	54
13 Anexos.....	58
13.1 Tabla Suplementaria 1	59
13.2 Preparación de buffers para fraccionamiento de proteínas de testículo de ratón	59
13.3 Listas de Genes Diferencialmente Expresados	60

1 Introducción

En los eucariontes superiores, el genoma dentro del núcleo se encuentra organizado de manera específica para cada tipo celular [1]. Esta organización permite una regulación espacio-temporal de la transcripción a través de una intrincada dinámica de condensación y descondensación de la cromatina. Por lo tanto, cualquier proceso celular en los diferentes grados de diferenciación, micro/macro ambiente e incluso estados patológicos, son gobernados por esta organización espacio-temporal del genoma [2].

La cromatina por su parte, es una combinación de proteínas y ADN (Ácido desoxirribonucleico) que juntos forman los cromosomas, los cuales se localizan en el núcleo de las células de organismos superiores, a su vez, los cromosomas contienen bloques estructurales de empaquetamiento referidos como nucleosomas que están formados por histonas, quienes se caracterizan por su afinidad a las cargas negativas presentes en el ADN, así lo empaquetan y organizan [3]. Por lo tanto, el grado de organización de la cromatina es el reflejo del grado de empaquetamiento del ADN, estableciendo territorios cromosomales y generando dominios y subdominios que conforman la estructura tridimensional de genoma [4,5]. En ese sentido, hay reportes en la literatura que señalan a proteínas clave que propician la formación de los dominios y subdominios asociados topológicamente (TADs, por sus siglas en Inglés) en el genoma de cada célula, como es el caso del factor de unión a secuencias CCCTC (CTFC) [1].

Este factor de transcripción regula la organización de la cromatina [6]. CTCF es una proteína de aproximadamente 727 aminoácidos que se expresa de manera ubica y su presencia es conservada evolutivamente en animales con simetría bilateral [1], además, contiene tres dominios funcionales: un dominio amino terminal (-NH₂), un dominio central que contiene 11 dedos de zinc y un dominio carbonilo terminal (-COOH). En el caso de las células germinales masculinas de ratones, se demostró que la ausencia de esta proteína tiene efectos sobre el proceso de espermatogénesis [7].

1.1 El ratón como modelo experimental

El ratón doméstico (*Mus musculus*), generalmente vive en proximidad de las poblaciones humanas, en torno a casas, zonas urbanas o campos de cultivo. Se postula que su origen fue en el continente asiático y debido a las migraciones humanas se expandieron por el mundo [8]. A principios del siglo XX, el ratón doméstico comenzó a tomar notoriedad en los estudios genéticos descritos en la herencia de varios fenotipos de color en el pelaje [9] y para el año de 1909, se obtuvo la cepa de ratones endogámica C56BL [10] que ha sido ampliamente utilizada como modelo en estudios de biomedicina. Posteriormente, en el año de 1980, se reportaron datos sobre la inserción de ADN exógeno en la línea germinal de ratón, lo que representó un avance importante en la genética de mamíferos. De esta manera, se demostró que era posible generar animales con genes exógenos integrados en el genoma de manera estable, manejable y reproducible [11]. De manera general, la transgénesis consiste en la inserción de un cambio genético en la línea germinal, heredable por todas las células del organismo [8].

Por otra parte, el uso del ratón doméstico como modelo experimental ofrece ventajas como lo son: ciclo reproductivo corto, tiempo de vida acelerado (1 año de ratón = ~30 años en humanos), tamaño pequeño, permitiendo la fácil manipulación, procrean numerosas camadas y se pueden reproducir en cautiverio. Adicionalmente, debido a la divergencia evolutiva relativamente “reciente” del ratón y del humano, nuestro antepasado común (hace aproximadamente 75 millones de años), el 99 % de los genes de ratón resultan tener análogos en humanos. Además, los genes aparecen en el mismo orden en ambos genomas [12]. Esta homología entre las dos especies, hacen del ratón una herramienta adecuada para analizar formas en las que el material genético codifica la información.

1.2 Los ratones KO condicionales

El término “knock out” (KO) en las ciencias genómicas hace referencia a animales a los que se les inactiva o elimina uno o más genes, lo que permite obtener información sobre función génica [13], sin embargo, el uso de estos organismos representan algunas desventajas como: que no todas las alteraciones en genes producen resultados detectables o que no podrían ser aplicadas en humanos. Además, muchas de las inactivaciones son letales para el desarrollo del embrión volviéndolas incompatibles con la vida [14]. En consecuencia, para los estudios de efectos de la anulación de expresión de genes cuyas proteínas son esenciales para el desarrollo, se generan ratones KO condicionales en los que se induce la anulación de expresión del gen a estudiar en el animal adulto y esto permite el desarrollo embrionario normal [8]. Para generar este tipo de animales, se emplea el sistema de recombinación *Cre/loxP*.

1.3 El sistema de recombinación *Cre/loxP*

La recombinasa CRE del bacteriófago P1 tiene 38 kDa y pertenece a la familia de recombinasas de reconocimiento específico del sitio de acción y cataliza la recombinación entre dos sitios de reconocimiento *loxP* [15]. Durante el ciclo de vida de bacteriófago P1, la función de la recombinasa CRE es circularizar el ADN viral una vez inyectado en la bacteria huésped. De esta manera, la proteína CRE reconoce los sitios *loxP* localizados en los extremos del ADN viral. Por otra parte, cada sitio *loxP* tiene 34 pares de base (pb) y está formado por una secuencia espaciadora central de 8pb, el sitio de entrecruzamiento y dos secuencias flanqueantes palindrómicas de 13 pb, compuestos por dos elementos de unión de la recombinasa CRE con “elementos de unión a la recombinasa” (RBEs, por sus siglas en inglés). El núcleo central asimétrico define la orientación del sitio *loxP* que determina si la recombinación dará lugar a escisión o inversión de la secuencia enmarcada entre los sitios *loxP* [8].

De esta manera, el sistema *Cre-loxP* es una estrategia ampliamente utilizada en la mutagénesis dirigida, específica de tejido. La inserción y orientación de los sitios *loxP* (insertados en la secuencia de ADN a recombinar) determinarán la secuencia genómica a escindir, mientras que la disponibilidad en el tiempo y/o el espacio de la recombinasa CRE determinará cuando y dónde se produce la recombinación y en consecuencia el “knock-out” condicional generado. Los sitios *loxP* se disponen en pares que flanquean el segmento de ADN a eliminar. Cuando la proteína CRE se expresa, la recombinasa se une a los sitios *loxP*, los corta por la mitad y después

une las dos mitades restantes tras haber eliminado el ADN situado entre ambos [8,15].

1.4 La espermatogénesis

La producción de espermatozoides en mamíferos, también conocida como espermatogénesis, involucra procesos complejos de división celular y especialización que resultan en la formación de células germinales altamente diferenciadas con el propósito de fertilizar al gameto femenino y producir un nuevo organismo [16]. En las gonádas masculinas dentro de los túbulos seminíferos, las espermatogonias (células diploides) entran en mitosis para asegurar un constante suministro de células germinales. Un tipo específico de espermatogonias entran al procesos de meiosis y el ADN es duplicado para asegurar el intercambio genético entre los cromosomas homólogos. Después de dos rondas ininterrumpidas de divisiones meióticas se producen 4 células haploides con eventos de recombinación [17]. Estas células haploides también conocidas como espermatidas entran a un proceso de especialización que las prepara para el viaje final: la búsqueda de la célula germinal femenina (Figura 1). Durante este proceso conocido como espermiogénesis, ocurren una serie de cambios morfológicos que dan como resultado la forma clásica tipo torpedo del espermatozoide maduro [18,19]. Durante las etapas de la espermatogénesis, la estructura de la cromatina y los perfiles transcripcionales son dinámicos y específicos [20–23].

Estudios recientes sobre la organización de la cromatina en la etapa meiótica y haploide mostraron que la organización tridimensional del genoma es bastante

diferente. Por su parte, en el estado meiótico, el genoma está organizado en TADs [23], mientras que en las células haploides se encuentra completamente reorganizado dando lugar al epigenoma específico del espermatozoide que es necesario para recapitular la estructura de la cromatina durante el desarrollo embrionario [22–24].

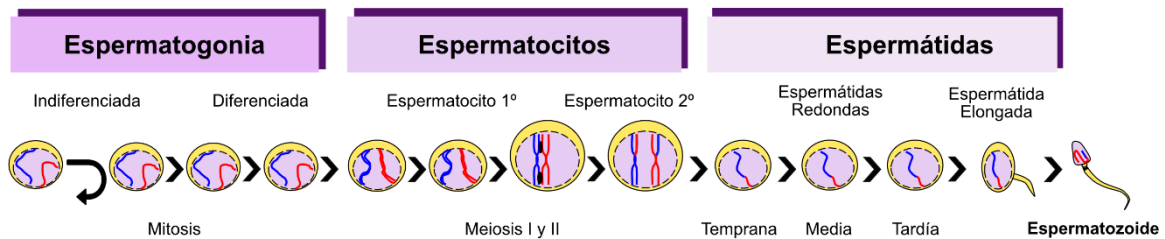


Figura 1. Espermatogénesis. Proceso de espermatogénesis dividido en tres etapas. La primera conocida como mitosis cuyo objetivo es mantener el epitelio seminífero renovado y participan las espermatogonias. La segunda es conocida como etapa meiótica en la cual ocurren los procesos de recombinación homóloga (recombinación meiótica) participan los espermatocitos primarios y secundarios. La última etapa del proceso es conocida como espermiogénesis y es donde ocurre la especialización de las células haploides, participan las espermatidas y al culminar este proceso se genera el espermatozoide con su morfología típica de torpeda. Espermatocito 1º: Espermatocito primario, Espermatocito 2º: Espermatocito secundario.

1.5 Recambio y retención de histonas durante la espermatogénesis

Durante la espermatogénesis los espermatocitos entran en la etapa de especialización celular conocida como espermiogénesis. En ese punto la mayoría de las histonas asociadas al ADN son reemplazadas por protaminas (proteínas nucleares con carga positiva y de baja masa molar). El reemplazo se lleva a cabo por la presencia de variantes de histonas específicas de testículo y por la presencia de modificaciones post-traduccionales (PTMs) en las colas de las histonas (acetilación, crotonilación, ubiquitinación, etc) [19]. Algunos nucleosomas (en esperma de ratón ~ 10%) son retenidos en lugares clave (sitios de inicio de la transcripción) debido nuevamente a las PTMs como las mono y dimetilaciones en los residuos de lisina de las histonas [19]. Los objetivos del desplazamiento de las

histonas por protaminas son dos. El primero es neutralizar la carga del ADN [25], propiciando la compactación del genoma paterno en un índice de 1/20 el volumen comparado con el núcleo de células somáticas lo que provoca que el núcleo del espermatozoide sea altamente hidrodinámico [26,27] y el segundo es proteger al genoma paterno de nucleasas y factores ambientales [26].

Por otra parte, se ha sugerido que la retención adecuada de histonas en el espermatozoide de mamíferos desempeñan un papel en la memoria epigenética inter y transgeneracional [28]. Sin embargo, no hay evidencia contundente disponible de la función clave de la dinámica entre la organización de la cromatina, el establecimiento del epigenoma y el mantenimiento de la información epigenética en el espermatozoide, solo se ha sugerido que las proteínas arquitectónicas como CTCF y los complejos de cohesinas en conjunto con marcas epigénéticas en histonas retenidas contribuyen con el establecimiento del epigenoma en espermatozoide del ratón [7].

1.6 La proteína CTCF

La proteína arquitectónica CTCF (factor de unión a secuencias CCCTC) es un factor de transcripción multifuncional que se conserva evolutivamente, tiene una función clave en la conformación tridimensional de la cromatina [6,29] en el posicionamiento de los nucleosomas [30], así como para la impronta génica [1]. Debido a la ubicuidad de CTCF en diferentes tipos celulares y la gran variedad de funciones en las que participa, se le considera un factor esencial para el desarrollo de la vida [6]. Así mismo CTCF esta compuesta por tres dominios altamente

conservados en vertebrados y no vertebrados. El dominio N-terminal interactúa con el complejo de cohesinas que contribuyen a la formación de asas (loops), mientras que el C-terminal interactúa con otras proteínas de unión al ADN [31] y el dominio central que contiene los 11 dedos de zinc que interactúan con secuencias específicas en el ADN [1], (Figura 2).

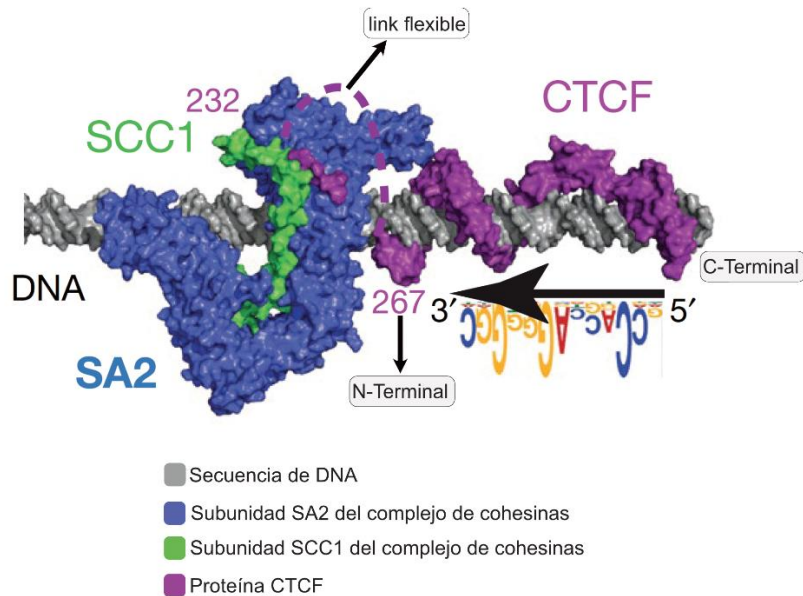


Figura 2. Modelo molecular de unión de CTCF al complejo de cohesinas y al ADN. La longitud de unión flexible es variable en el extremo N-Terminal y se postula que es indispensable para la correcta interacción de CTCF con el complejo de cohesinas, Tomado y adaptado de [31].

1.7 Aislamiento y secuenciación de ARN de célula única

La célula es la unidad funcional de cualquier organismo, sin embargo, existen diferentes tipos celulares con características y funciones que juntas forman un tejido u órgano de cualquier ser vivo, por lo que, la presencia y los niveles de ARN (Ácido ribonucleico) en una célula definen su identidad y sus funciones fisiológicas. De esta manera, en los últimos años, el uso de tecnología de secuenciación de ARN a nivel de célula individual ha representado un reto para las ciencias computacionales, los modelos matemáticos y las tecnologías de alto rendimiento

que por fortuna los avances actuales hacen posible la cuantificación del transcriptoma a nivel de célula única. Esta técnica es referida como secuenciación de ARN de célula única (scRNAseq por su abreviación en inglés) [32] que ha sido aplicada en varias especies [33] y especialmente en diferentes tejidos humanos en estado sano o patológico. Así, al comparar los análisis de transcriptoma de RNA-seq (secuenciación de ácido ribonucleico por sus abreviación en inglés) de todo el tejido que contiene mezclas de células con los obtenidos por scRNAseq, esta última proporciona la oportunidad de diferenciar la composición celular de cada tejido y entender los procesos moleculares. Además de determinar la dinámica en los estados transcripcionales de cada célula con el objetivo de entender la diversidad celular de cada tejido [34,35].

Por lo tanto, el desarrollo y avance de scRNAseq, ha permitido identificar tipos celulares de acuerdo a su transcriptoma completo [36]. Adicionalmente, se ha enfatizado que el uso de scRNAseq no es una sola técnica, sino un conjunto de protocolos los cuales tienen como objetivo: 1) el aislamiento de células, 2) la preparación de librerías y 3) la secuenciación de las muestras. De esta manera, el aislamiento de las células requiere la disociación del órgano/tejido/cultivo celular para la obtención de una suspensión celular que a través de la tecnología de fluidos cada célula se puede aislar en una gota de aceite. Por otra parte, la preparación de las librerías involucra una serie de amplificaciones de fragmentos de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) que se seleccionan por el extremo 3' o 5' según las características del fabricante. Por último, la profundidad de secuenciación generalmente utilizada es de 25,000-50,000 lecturas por célula [36], (Figura 3).

Pasos clave para el uso de scRNAseq

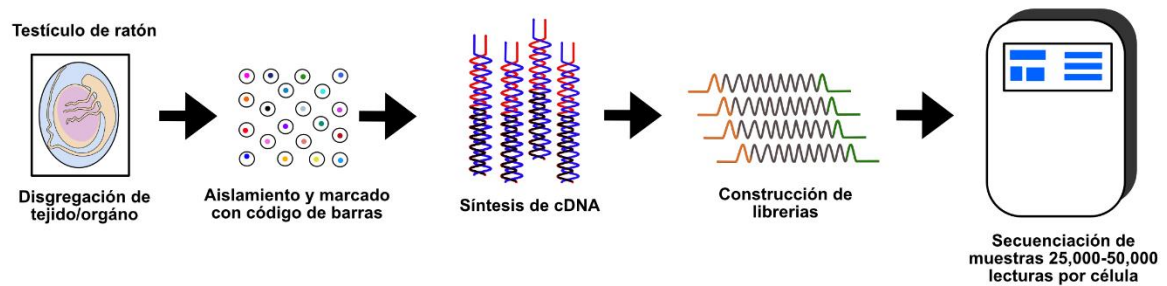


Figura 3. Protocolos involucrados en el uso de scRNAseq. 1) la disgregación del tejido/organo es clave, en ella pueden ser utilizados métodos enzimáticos o mecánicos. Posteriormente se obtiene una suspensión celular que servirá como muestra para el aislamiento utilizando tecnología de microfluidos y que se marcarán con los códigos de barra. 2) La preparación de las librerías incluye la síntesis de ADN complementario (cDNA por sus siglas en inglés) debido a que se realiza un enriquecimiento de ARNm y se realiza la construcción de las librerías añadiendo adaptadores moleculares que servirán para el proceso de secuenciación. 3) La secuenciación se realiza en plataformas comerciales de alto rendimiento con una profundidad de lectura que oscila de las 25,000 a las 50,000 lecturas por célula.

1.8 Tecnología de microfluidos

La tecnología de microfluidos en el aislamiento de células es la responsable del encapsulamiento y aislado a través de diferentes canales. Uno de esos canales conduce el aceite, el cual, sirve para encapsular a la célula individualmente, mientras que los otros dos canales conducen la suspensión celular y la mezcla maestra de códigos de barras. De tal manera que todos los canales convergen para que cada gota de aceite generada contenga perlas con un código de barra específico para identificar a la célula aislada. En cada gota, los transcritos de ARNm son unidos a un identificador molecular único (UMI, por sus siglas en inglés). El UMI es una secuencia corta de nucleótidos que sirve como un marcador molecular que se acopla al fragmento de ADN o ARN para la formación de las librerías y ayuda a reducir el ruido de fondo producido durante la secuenciación [37] (Figura 4) .

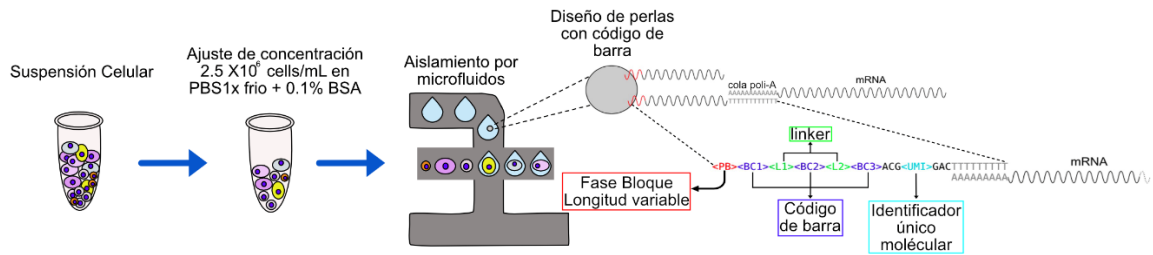


Figura 4. Tecnología de microfluidos y diseño de perlas identificadoras. Se obtiene la suspensión celular que debe ajustarse a la concentración indicada por el fabricante. Posteriormente, la suspensión es cargada en el cartucho para realizar el aislamiento de las células. Cada gota contiene perlas identificadoras que permiten bioinformáticamente identificar el origen de cada transcrito por célula. En el caso de las perlas diseñadas por *BIO-RAD*, contienen una fase bloque de nucleótidos en longitud variable, tres secuencias de código de barra y una secuencia que contiene el identificador molecular. Al final del diseño de la perla contiene una secuencia de poli-T (T: timina) que selecciona el ARNm maduro. Tomado y modificado de [38,39].

En este estudio, se utilizó scRNAseq para identificar los defectos transcripcionales producidos por la ausencia de CTCF en las principales etapas de la espermatogénesis. Se encontró que las alteraciones transcripcionales ocurren en las etapas tempranas y medias durante la espermiogénesis. Sin embargo, en las etapas tardías también se observaron alteraciones significativas en los perfiles transcripcionales, funciones biológicas y defectos morfológicos. De esta manera, se describió el impacto que tiene la ausencia de CTCF durante las etapas principales de la espermatogénesis.

2 Antecedentes

La generación de organismos transgénicos permiten estudiar y describir la función de genes o proteínas durante un proceso específico. De esta forma al eliminar un gen del genoma en un organismo se produce un individuo transgénico knock-out (KO), en el cual, se pueden estudiar los procesos biológicos afectados en ausencia de dicho gen y su proteína.

Para el caso de la proteína CTCF, no se puede generar un organismo KO debido a que es una proteína esencial para el desarrollo, por lo que la ausencia de CTCF no es compatible con el desarrollo de individuos [40]. Sin embargo, previamente en nuestro grupo de investigación, se generó un modelo de ratón KO condicional (*Ctcf*-cKO) [7], en el cuál, el gen de *Ctcf* es eliminado única y exclusivamente durante la espermatogénesis [7]. En dicho modelo, el gen de *Ctcf* esta flaqueado por secuencias de corte específicas para la proteína CRE recombinasa (sitios *loxP*). Esta recombinasa, no es endógena del ratón, por lo que el gen de *Ctcf* no esta afectado en estos ratones. Sin embargo, al cruzar estos ratones con otra línea de ratones que expresan la proteína CRE recombinasa de manera tejido-específica (ratón knock-in) se obtiene una descendencia de ratones que eliminan al gen de *Ctcf* de manera específica de los tejidos que expresan a la CRE recombinasa (Figura 5A). En este caso, se usaron ratones en los que el gen *ctcf* tiene sitios *loxP* en ambos extremos y además expresan a la proteína CRE recombinasa solo en células que inician la espermatogénesis. Debido a que la transcripción del gen para la CRE recombinasa esta controlado por el promotor del gen *Stra8* que a su vez solo se expresa al día 3 post-natal en las espermatogonias y es detectado en espermatocitos en etapa de pre-leptoteno [41] [42], logrando eliminar al inicio de la etapa de meiosis al gen de *Ctcf* (Figura 5A).

En estos ratones *Ctcf*-cKO, la meiosis y espermiogénesis son completadas (Figura 5B), sin embargo, se reportaron anomalías morfológicas en el testículo como atrofia del túbulo seminífero y un bajo conteo espermático, lo que conlleva a problemas de infertilidad. Además, los espermatozoides generados por los ratones *Ctcf*-cKO

tienen morfología anormal del núcleo, alteraciones en los niveles de PRM1 y una reducción en el patrón de incorporación de la histona H2B [7], lo que postula que CTCF está involucrado en procesos de retención de histonas.

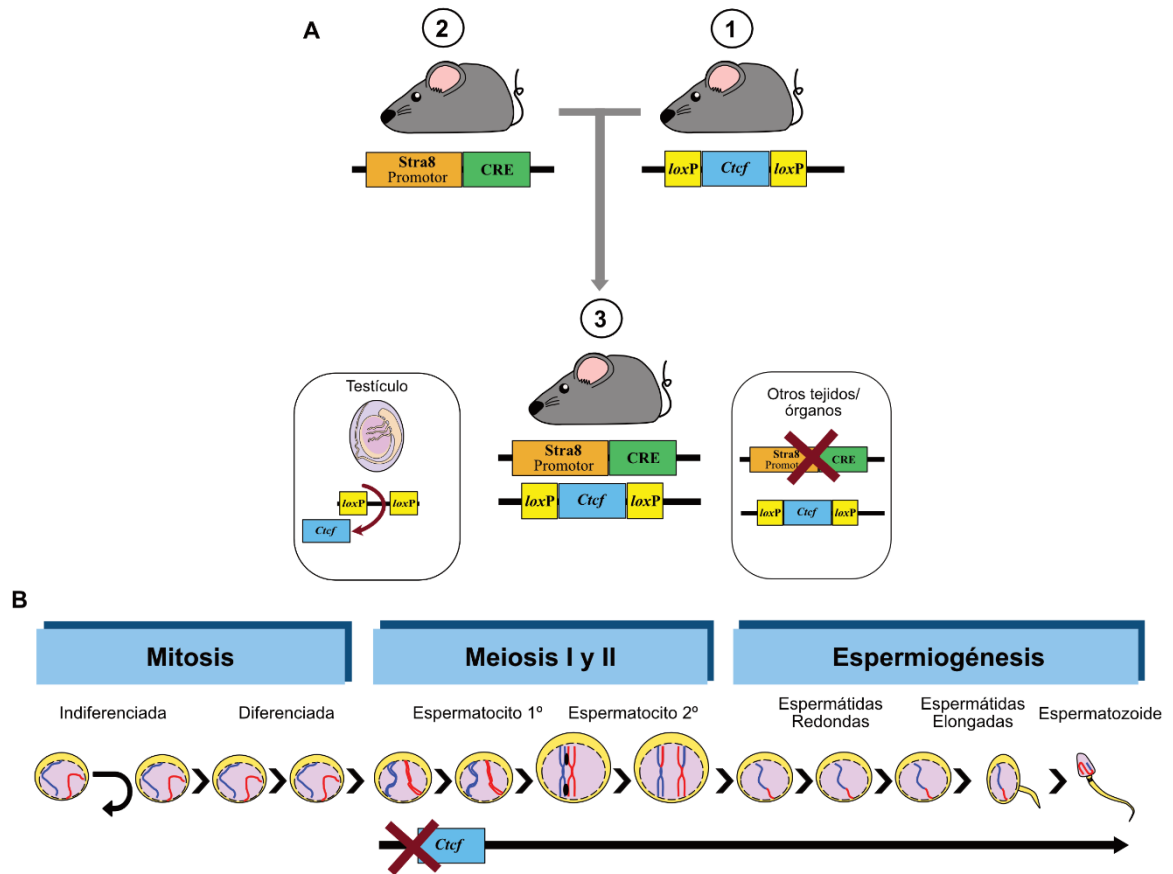


Figura 5. A) Generación de ratones KO condicionales. Se usan dos líneas de ratones transgénicos: (1) un ratón "floxed" que porte el gen de *Ctcf* flanqueado por secuencias *loxP*. (2) un ratón transgénico CRE con el promotor de *Stra8* que es tejido-específico que expresa la proteína recombinasa CRE solo al inicio de la espermatogénesis. El cruce del ratón "floxed" con el transgénico para CRE originará un animal (3) cuyo genoma es portador del transgén *Cre* y del gen "floxed". La expresión de CRE inducirá la recombinación de las secuencias *loxP*, de tal forma que se inactivará el gen de *Ctcf* sólo en tejidos en los que exista expresión de *Stra8* y en consecuencia de CRE. **B) Eliminación del gen *Ctcf* al inicio de la meiosis.** El sistema *Cre/loxP* recombinasa activado por la vía de señalización de *Stra8* elimina a *Ctcf* y a partir de la meiosis la proteína CTCF se deja de expresar. Este sistema lo hace específico para testículo y permite evaluar los efectos que provoca la ausencia de CTCF durante la espermatogénesis. Modelo basado en lo reportado por [7].

3 Justificación

Existen reportes que mencionan que la organización del genoma en el núcleo del espermatozoide esta orquestada por proteínas arquitectónicas como CTCF e histonas. Adicionalmente, se sugiere que estas proteínas confieren cierto tipo de memoria epigénética durante el desarrollo embrionario de un nuevo organismo. Además, se postula una relación directa entre la presencia de CTCF con la retención de histonas y la organización del genoma en el espermatozoide. En ese sentido, estudios previos demostraron que algunas histonas no son retenidas en ausencia de CTCF. En consecuencia, es probable que CTCF contribuya al correcto establecimiento y organización del genoma del espermatozoide. Por esta razón, es importante describir los efectos estructurales y moleculares relacionados con la ausencia de CTCF durante el proceso de espermatogénesis en el ratón. Favorablemente, el contar con un modelo murino, el cuál no expresa CTCF durante la espermatogénesis permite investigar algunos de estos efectos.

4 Hipótesis

CTFC es una proteína estructural que regula la organización y función del genoma en espermátidas de ratón, por lo que la ausencia de CTCF causará alteraciones estructurales y moleculares que dejarán anomalías morfológicas en la espermatogénesis del ratón.

5 Objetivo general

Evaluar los programas transcripcionales y las alteraciones estructurales durante la espermatogénesis de ratón en ausencia de CTCF.

5.1 Objetivos particulares

- Analizar el transcriptoma de células individuales durante la espermatogénesis en ratones *Ctcf*-cKO.
- Identificar vías de enriquecimiento alteradas relacionadas con funciones biológicas durante la espermatogénesis en ratones *Ctcf*-cKO.
- Asociar los defectos presentes en los programas transcripcionales con las alteraciones en proteínas relacionadas con la organización del genoma en células espermatogénicas de ratones *Ctcf*-cKO.
- Identificar los cambios morfológicos asociados a los programas transcripcionales afectados durante la espermatogénesis en ratones *Ctcf*-cKO.

6 Materiales y métodos

6.1 Animales

Los ratones utilizados para este trabajo tienen un transfondo genético de la cepa C56BL/6J. El protocolo experimental fue avalado por los comités de bioética la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (PI_2019_08_002), y de ética y bioseguridad del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIM/2021/061).

En este estudio, se utilizó un modelo murino transgénico previamente generado y validado en el cual, *Ctcf* es eliminado durante la espermatogénesis [7]. Por su parte, los ratones utilizados tenían entre 12 y 15 semanas de edad con el objetivo de disminuir las variaciones relacionadas a este factor. De esta manera, se comparó el ratón condicional knockout (*Ctcf*-cKO con genotipo *Stra8-iCre-Ctcf^{f/Δ}*) contra el ratón silvestre (WT) con genotipos *Ctcf^{f/f}*, *Ctcf^{wt/f}* o *Ctcf^{wt/wt}*. Todos los ejemplares fueron manipulados de acuerdo a lo establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, "Especificaciones técnicas para la producción" [43]. Los ratones fueron anestesiados y eutanasiados por dislocación cervical para posteriormente, ser colocados en una bandeja de disección y realizar la extracción quirúrgica de ambos testículos.

6.2 Secuenciación de ARN de células individuales

Se realizó la disociación de las células testiculares de acuerdo con lo reportado previamente [44] con ligeras modificaciones. Brevemente, se extrajeron los testículos de dos ratones WT y dos ratones *Ctcf*-cKO y se les removió la túnica albugínea. Inmediatamente, se colocaron los tubúlos seminíferos en pequeñas cajas petri para su separación mecánica y después se transfirió el tejido a un tubo cónico de 15 mL adicionado con 5 mL de buffer enzimático (20 mM HEPES pH 7.2, 6.6 mM piruvato de sodio, 0.05% lactato en 1x HBSS), suplementado con 100 U/mL de colagenasa tipo I y 2 U/mL de Dnasa. Los túbulos fueron incubados durante 15 minutos a 32 °C y la suspensión celular fue pasada por filtros de material sintético de 40 µm utilizando un tubo nuevo para cada condición. Adicionalmente, se agregó suero fetal bovino a una concentración final del 2%. Se sedimentaron las células

por centrifugación a 1000 g durante 10 minutos a 4 °C, luego con cuidado se aspiró el sobrenadante para después añadir 1 mL de buffer enzimático.

Posteriormente, se resuspendió el sedimento celular y la suspensión fue transferida a tubos de 1.5 mL para después centrifugar a 1000 g durante 10 minutos a 4 °C. Transcurrido el tiempo, se aspiró el sobrenadante con el objetivo de eliminar la mayor cantidad posible de eritrocitos de la suspensión celular, se realizaron 3 lavados en baño frío con PBS pre-enfriado y después se centrifugó para formar el sedimento. Finalmente, las células testiculares fueron resuspendidas en PBS adicionado con 0.1% de BSA y la concentración celular fue ajustada a 2.5×10^6 células/mL. Solo las suspensiones celulares con viabilidad mayor al 90% fueron usadas en los subsecuentes análisis y ambos parámetros (concentración y viabilidad celular) fueron determinadas utilizando el contador automático TC20 de *BIO-RAD* (Figura 6).

Después, se realizó el aislamiento de células individuales y el marcado con códigos de barras de las suspensiones celulares generadas usando el sistema basado en gotas (One-touch ddSEQ, *BIO-RAD*) siguiendo las especificaciones del fabricante. Por último, se generaron las librerías de las células aisladas y marcadas con el código de barra usando la enzima Nextera incluida en el SureCell WTA 3' Library Prep Kit (Illumina) y se realizó la secuenciación de última generación usando la plataforma NextSeq 500/550 de Illumina con una profundidad de 250,000 lecturas/célula.

Una vez realizada la secuenciación, se obtuvieron archivos denominados FASTQ, que básicamente contienen datos de secuenciación e información sobre calidad, a estos se les determina un puntaje de calidad en escala logarítmica resumida en la Tabla 1, cada puntaje representa la probabilidad de que un nucleótido sea incorporado o llamado incorrectamente durante el proceso de secuenciación. De esta manera, a través de un gráfico de semáforo se verificó que los archivos en este estudio tienen buenos puntajes de calidad resultado del proceso de secuenciación (Figura 7). Posteriormente, se generaron cuatro bases de datos de dos réplicas biológicas provenientes de ratones WT y *Ctcf*-cKO.

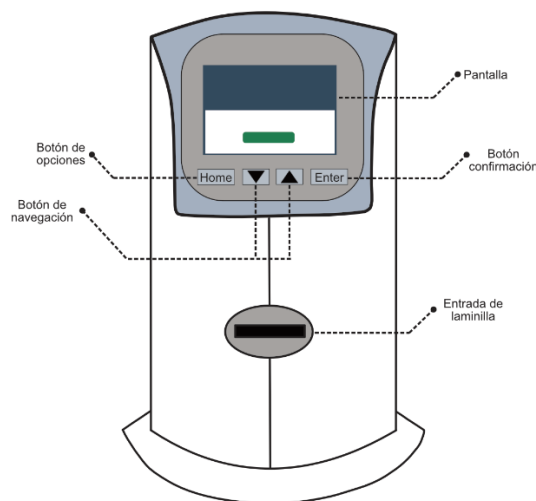


Figura 6. Contador automático celular. Representación gráfica del contador portátil que emplea laminillas desechables cuadradas tipo hemocitómetro para un volumen de 10 μ L y con espacio para dos muestras. El contador utiliza microscopía con auto-enfoque que analiza varios planos focales permitiendo resultados en 30 segundos y en tiempo real. Este aparato puede contar células con un diámetro de 6 a 50 μ m y en un intervalo de concentración $5 \times 10^4 - 1 \times 10^7$ células/mL.

Tabla 1. Interpretación de los puntajes de calidad, tomada y adaptada [45].

Phread Puntaje de calidad	Probabilidad de incorporación incorrecta de la base	Porcentaje de precisión de incorporación
10	1 en 10	90%
20	1 en 100	99%
30	1 en 1000	99.9%
40	1 en 10,000	99.99%

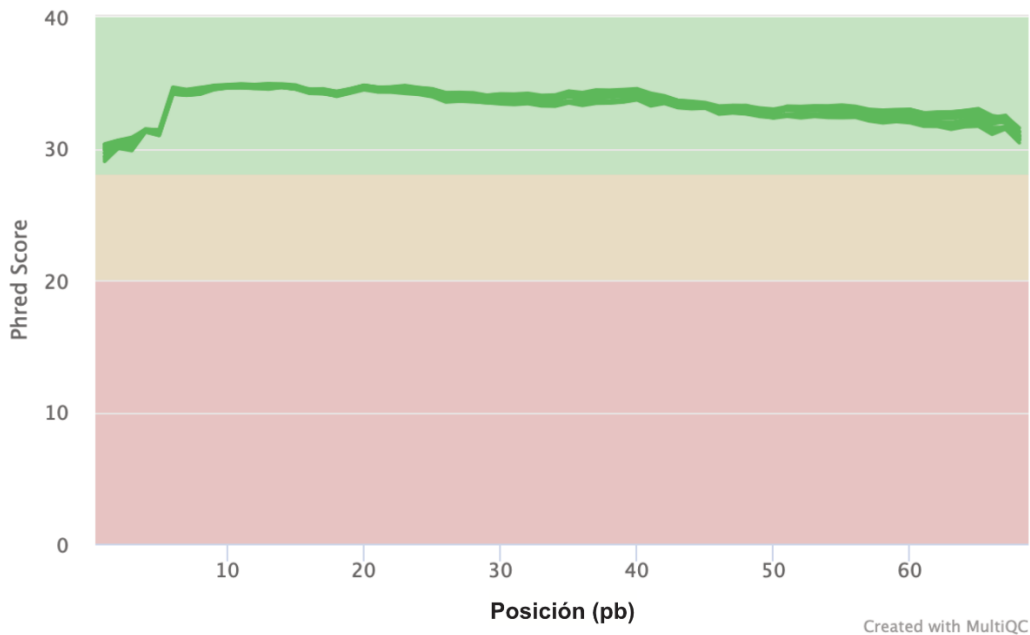


Figura 7. Gráfico de semáforo con puntajes de calidad. La zona de color verde indica que los archivos FASTQ tienen puntajes buenos de calidad, es decir, la probabilidad de incorporación incorrecta de una base es de 1 en 10,000.

6.3 Análisis de Datos

Con el objetivo de procesar los datos de secuenciación del ARNm de células individuales, se generaron cuatro matrices de conteo de expresión alineando los datos crudos contra el genoma de referencia de ratón (GRCm38.98) siguiendo reportes previos utilizando los algoritmos: *ddSeeker* y *scPipe* [39,46] con los parámetros establecidos para los análisis subsecuentes de las matrices de conteo de expresión.

Para los análisis posteriores de las matrices de conteo se utilizaron los paquetes cargados en R: *harmony* versión 0.1.0 [47] para integrar las bases de datos y corregir el ruido de fondo durante la secuenciación y *Seurat* versión 4.1.0 [48] para la reducción de dimensiones e identificación de poblaciones celulares referidas de aquí en adelante como “clusters”. Finalmente, se usó *Monocle3* versión 1.2.6 para

el análisis de pseudotiempo [49]. Brevemente, se crearon los objetos de Seurat con las matrices de conteo y se realizó el procesamiento de acuerdo con las guías de procesamiento que utilizan la paquetería de Seurat [48]. En el caso de los parámetros de control de calidad que incluyen: el filtrado para excluir células con mas de 7,000 y menos de 200 genes identificados y células que con mas del 10% de expresión de genes mitocondriales [50,51]. Para la normalización y escalamiento de los datos se utilizaron las funciones “LogNormalize” y “ScaleData” en Seurat antes de la integración con harmony. Finalmente, para la reducción de dimensiones y la formación de clusters se utilizaron los parametros de dimensiones = 1:15, con una resolución de 1.0 en Seurat y harmony.

Por otra parte, los genes diferencialmente expresados (DGE, por su abreviación en inglés) se determinaron con la función “Fold.change” con los parámetros pre-establecidos en Seurat. Adicionalmente, los mapas de similitud fueron creados con los clusters de este estudio y los previamente reportados [21] y esto se realizó comparando los DGE marcadores especificos en ambos estudios utilizando la función “FindAllMarkers” en Seurat y seleccionando los genes con un valor de p ajustado < 0.05) y con la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Genes en común}) \times 100}{[(N1 \text{ genes} + N2 \text{ genes}) - \text{Genes en común}]}$$

(1)

Donde:

Genes en común: son el número de genes compartidos en ambos clusters

N1 genes: número total de DGE en el cluster de referencia

N2 genes: número total de DGE en el cluster de éste estudio

6.4 Análisis de enriquecimiento de vías

Para analizar las anotaciones de las funciones biológicas de los genes regulados de manera positiva o negativa se usó el servidor en línea (internet) de la base de datos para la anotación, visualización y descubrimiento integrado (DAVID, por sus siglas en inglés) [52], utilizando el genoma de *Mus musculus* como referencia para los análisis de ontología de genes (GO, por sus siglas en inglés). Además, para un análisis más robusto de enriquecimiento de rutas biológicas se utilizó GSEA [53]. Se obtuvieron y usaron todas las anotaciones reportadas contenidas en la base de datos de ratón GSKB [54]. Las diferencias significativas fueron asignadas con un $FDR \leq 0.05$ and valor de $p \leq 0.01$.

6.5 Mapas de enriquecimiento

Los mapas de interacción se construyeron con la información obtenida del análisis de enriquecimiento de vías usando el software *Cytoscape* versión: 3.9.1. Se tomó en cuenta el índice de Jaccard con valores ≥ 0.4 . Se asoció significancia estadística en las vías de enriquecimiento de acuerdo con los genes compartidos. Además, se determinaron las etiquetas de las colecciones de funciones biológicas usando la función de "AutoAnnote". Un mapa preliminar se obtuvo con *Cytoscape*, sin embargo, el diseño final se realizó en Affinity Designer versión 1.10.4.

6.6 Procesamiento de cortes histológicos

La técnica de microscopía electrónica y los análisis de inmunofluorescencia se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología previamente reportada [7]. Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios: rabbit polyclonal anti-Transition

Protein 1 (TNP1) de Abcam, catálogo: ab73135; mouse monoclonal antibody anti-Transition Protein 2 (TNP2) de Santa Cruz Biotechnology, catálogo: sc-393843; mice anti-Protamine 1 (PRM1) y mice anti-Protamine 2 (PRM2) de Briar Patch Biosciences LLC, catálogo: Hup1N and Hup2B respectivamente. Para las inmunofluorescencias se utilizaron los anticuerpos secundarios: goat-anti-rabbit IgG, Alexa Flour 594 from Invitrogen, catálogo: A-11008; goat-anti-mouse IgG, Alexa Flour 488 from Invitrogen, catálogo: A28175; goat-anti-mouse IgG, Alexa Flour 594 from Invitrogen, catálogo: A32742.

6.7 Western Blot de proteínas de testículos de ratones

Para la técnica de western blot se utilizaron ambos testículos de dos ratones WT y dos *Ctcf*-cKO. Primero, se anesteciaron los animales para posteriormente realizar las eutanasias. En seguida, se hicieron las extracciones de los testículos con el posterior retiro de la túnica albugínea. Luego, se colocaron los testículos en tubos cónicos de 14 mL adicionados con 5 mL de medio HEPES pH 7.4, para comenzar con la disgregación mecánica utilizando el homogeneizador manual TissueRupture II de Qiagen durante 5 minutos en cada muestra. Se utilizaron una serie de Buffer para la extracción fraccionada de las proteínas celulares como previamente se reportó [55].

Brevemente, se centrifugaron las suspensiones celulares a 100 RFC (Fuerza centrífuga relativa) a 4°C para obtener un precipitado denominado “botón”, el cuál fue resuspendido y lavado agregando 1 mL de PBS 1X frío y después se centrifugo a 100 RFC a 4°C. Luego, se retiró el PBS y se agregaron 2.5 mL de buffer 1

(consultar anexo, sección 12.2) adicionado con inhibidor de proteasas. Se incubó la suspensión celular durante 10 minutos y después se centrifugó a 2,000 RFC para obtener un botón celular. Posteriormente, se aspiró el sobrenadante y se conservó porque en él se encuentran las proteínas de la fracción del citosol celular.

Por otra parte, al botón obtenido se le agregaron 2.5 mL del buffer 2 (consultar anexo, sección 12.2) para resuspenderlo y se incubó durante 30 minutos, para después centrifugarlo a 7,000 RFC durante 10 minutos para obtener un botón y restos celulares. El sobrenadante se aspira y se conserva porque en este extracto se encuentran las proteínas unidas a la membrana de los organelos, como el retículo endoplasmático, golgi, mitocondrias y proteínas luminarias nucleares. Por su parte, al botón se le agregaron 2.5 mL de buffer 3 frío (consultar anexo, sección 12.2) y se re-suspendió con vortéx. Luego, se incubaron las muestras a 4°C durante 1 hora, para favorecer la solubilización del núcleo y la digestión del ADN genómico. Después, se centrifugaron las muestras a 7,000 RFC durante 10 minutos para obtener el botón de proteínas insolubles. El sobrenadante se conservó porque contiene el extracto con proteínas nucleares y de membrana.

Por último, al botón de células de cada muestra se les agregó 2.5 mL de buffer 4 (consultar anexo, sección 12.2) para resuspenderlo con vortéx y calentarlo. Después, se centrifugó a 8,000 RFC durante 10 minutos para que se formará el botón con los restos celulares. El sobrenadante se conserva porque contiene la fracción de proteínas nucleares insolubles. Por último, el sobrenadante/botón de cada extracto fue cuantificado por el método de Bradford.

Posteriormente, se calcularon las diluciones correspondientes para que en 15 μ L de volumen tuvieran una concentración de 200 μ g/mL. Finalmente, a las diluciones se les agregó Laemmli Sample Buffer 1X de *BIO-RAD* y se calentaron a 90°C durante 10 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, para su posterior preservación o procesamiento. Las muestras se cargaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 15% y se realizó la electroforesis utilizando el equipo Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell de *BIO-RAD*, inicialmente las muestras se corrieron a 40 volts durante 20 minutos y posteriormente a 120 volts durante 60 minutos.

Concluida la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) usando el equipo Mini Trans-Blot Cell de *BIO-RAD* a 40 volts durante 120 minutos en cámara fría. Después, se realizó el bloqueo de la membrana de PVDF con una solución de Blotting Grade Blocker de *BIO-RAD* al 5% en TBS 1X + Tween al 0.1% (TBST) y se incubó durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Luego, se agregaron los anticuerpos primarios para TNP1, TNP2, H2B de Santa Cruz Biotechnology, catálogo: sc-515937. Los tres anticuerpos primarios se diluyeron 1:1000 en TBST y se dejaron incubar toda una noche en agitación a 4°C.

Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario de las membranas y se lavaron 3 veces con TBST durante 5 minutos. Después, se les agregó el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa [1/1000] (*BIO-RAD*, Núm. De Cat. 1705046) y se incubó durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Por último, las

membranas se lavaron 3 veces con TBST durante 5 minutos y se revelaron utilizando el kit de detección Western Blotting Cytiva Life Sciences Amersham ECL Select (Cytiva RPN2235). La captura de imagen se realizó con el equipo de detección de quimioluminiscencia Fusion FX (Vilber).

7 Resultados

7.1 La secuenciación de ARN de célula única revela las poblaciones celulares de la espermatogénesis

Previamente, se reportó que la eliminación condicional de *Ctcf* durante la espermatogénesis de ratón produce espermatozoides maduros anormales [7]. Sin embargo, para determinar las etapas de la espermatogénesis en las que estas alteraciones toman lugar se realizó scRNAseq de células espermátogénicas de dos ratones wild type (WT) y dos ratones *Ctcf*-cKO. Después del procesamiento de las muestras, preparación de librerías para secuenciación y secuenciación, se obtuvieron un total de 909 células.

Posteriormente, se realizó el control de calidad para filtrar células con alto o bajo conteo de genes y alto porcentaje de expresión de genes mitocondriales resultando en un total de 908 células que pasaron los controles de calidad (Figura 8A-B). En seguida, se realizó la integración de las diferentes bases de datos para homogenizar variaciones relacionadas al procesamiento de muestras (Anexo-Figura suplementaria 1A y 1B). Por último, se realizó la reducción de dimensiones y la proyección de perfiles transcripcionales de las células usando el método de reducción de dimensiones UMAP por sus siglas en inglés (Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction).

La proyección reveló 10 clusters, en ambos genotipos (Figure 9A and 9B). Aunque, ambos genotipos mostraron los mismos clusters, se identificaron cambios en las proporciones en el número de células dentro del mismo cluster (Figura 8B-C).

Debido a que se utilizó una plataforma de microfluidos de baja captura de células comparada con la plataforma más usada que es de mayor captura (ddSEQ de *BIO-RAD* vs Chromium de 10X Genomics, respectivamente), se decidió incrementar el número de lecturas por célula para así compensar y estimar de manera más robusta los perfiles transcripcionales del sistema [56]. Primero, se exploró si los 10 clusters con las 908 células (405 y 503 células de los testículos de los genotipos WT y *Ctcf*-cKO) representan las poblaciones celulares que se encuentran en los testículos de ratón. Para esto, se comparó y graficó el porcentaje de similitud (definido como el porcentaje de marcadores moleculares compartidos entre dos clusters) entre los genes diferencialmente expresados (DGE) de cada uno de los 10 clusters y los DGE de cada uno de los 17 clusters obtenidos previamente utilizando scRNAseq de 4,651 células provenientes de testículos de dos ratones WT [21].

De esta manera, se identificó que los clusters 4, 7 y 8 del presente estudio muestran el mayor porcentaje de similitud con los clusters que contienen marcadores para células de Sertoli y peritubulares (clusters 15 y 17 en [21]) (Figure 9C). Por otra parte, el cluster 5 tiene un perfil transcripcional relacionado con espermatogonias/espermatocitos (clusters 10, 8, 6 y 9 en [21]). Por su parte, el cluster 2 es similar a los espermatocitos/espermátidas redondas (clusters 6, 9, 12, 2, 7, 13, 11 y 5 en [21]). Finalmente, los clusters 0, 1 y 3 muestran similitud con las

espermátidas redondas tempranas, medias y tardías (clusters 12, 2, 7, 13, 11, 5, 3, 1 y 4 en [21]) (Figure 9C).

Para corroborar las similitudes previas y la asignación de la identidad a los clusters, se inspeccionó la expresión específica de marcadores moleculares para células de Leydig, Sertoli y espermatogonias reportados previamente en dos estudios diferentes [21,57]. En consecuencia, se encontró que los clusters 4, 6, 7, 8 y 9 muestran marcadores moleculares para células somáticas (células de Sertoli y Leydig) (Figura 9D), mientras que las células del cluster 5 expresan marcadores para espermatogonias y células meióticas (espermatoцитos) (Figura 9D). Por su parte, el cluster 3 muestra expresión de marcadores para espermatoцитos y espermátidas redondas (Figura 9D). Por último, se identificó que los clusters 3, 1 y 0 contienen marcadores para espermátidas redondas (Figura 9D). Debido a que los clusters 4, 6, 7, 8 y 10 contienen células somáticas donde la eliminación condicional de *Ctcf* no es activa [7], se decidió remover estos clusters para los posteriores análisis (Figura 10).

Adicionalmente, para aportar mas evidencias sobre la correcta identificación de los clusters se utilizó un paquete en R (ScType versión 3.0) [58], el cuál es un anotador automático de células que utiliza marcadores moleculares previamente publicados [57] (Anexos-Tabla suplementaria 1). De esta forma, la identificación automática mostró resultados similares a los obtenidos previamente, donde los clusters de células somáticas se conservan, mientras que los relacionados al proceso de espermatogénesis cambian ligeramente pero corresponden a la generación de

células haploides (Figura 11). Estos resultados justifican una vez más la depuración de las células somáticas para los subsecuentes análisis y la identificación de las etapas representativas de la espermatogénesis en el resto de las poblaciones celulares.

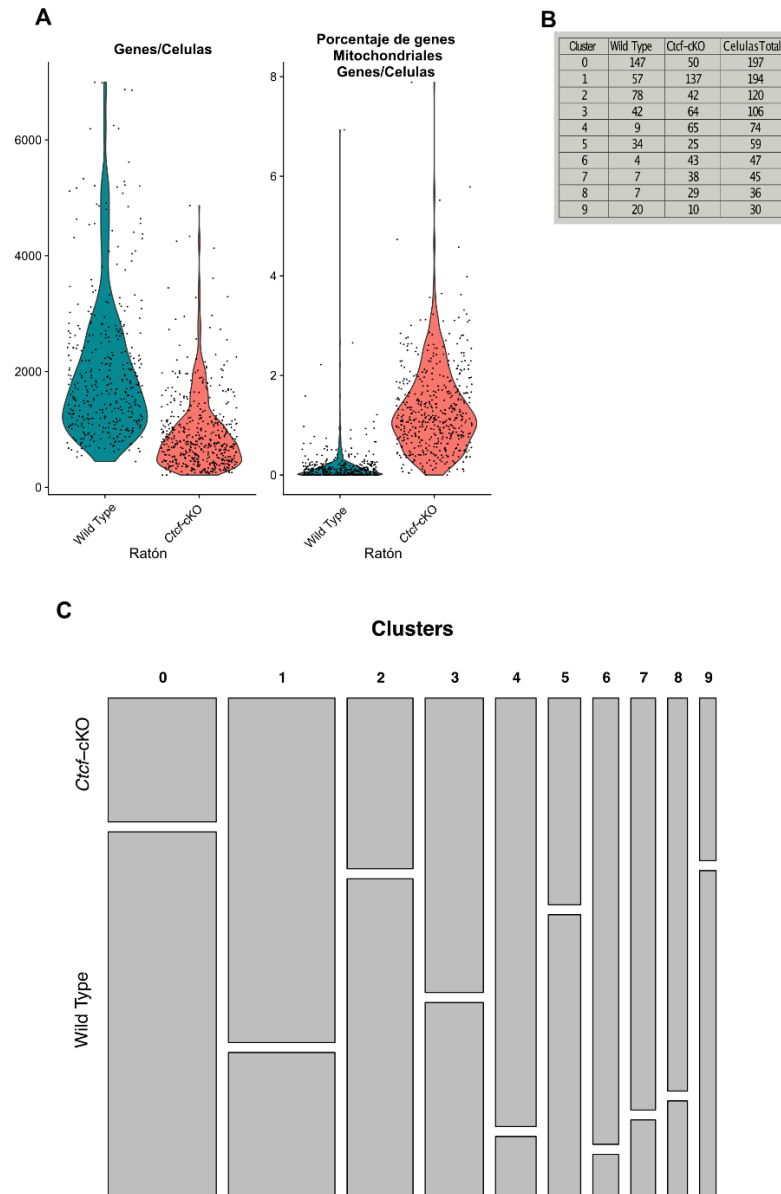


Figura 8. Control de calidad y proporciones celulares. (A) Gráfica de violín de genes y porcentaje de genes mitocondriales presentes en células de testículos de ratón WT y *Ctcf*-cKO. (B) Tabla con el número de células que corresponden a cada cluster en ambos genotipos (WT y *Ctcf*-cKO). (C) Gráfica de barras con la proporción de células de cada cluster. El ancho de las barras es proporcional al número de células contenidas en el cluster.

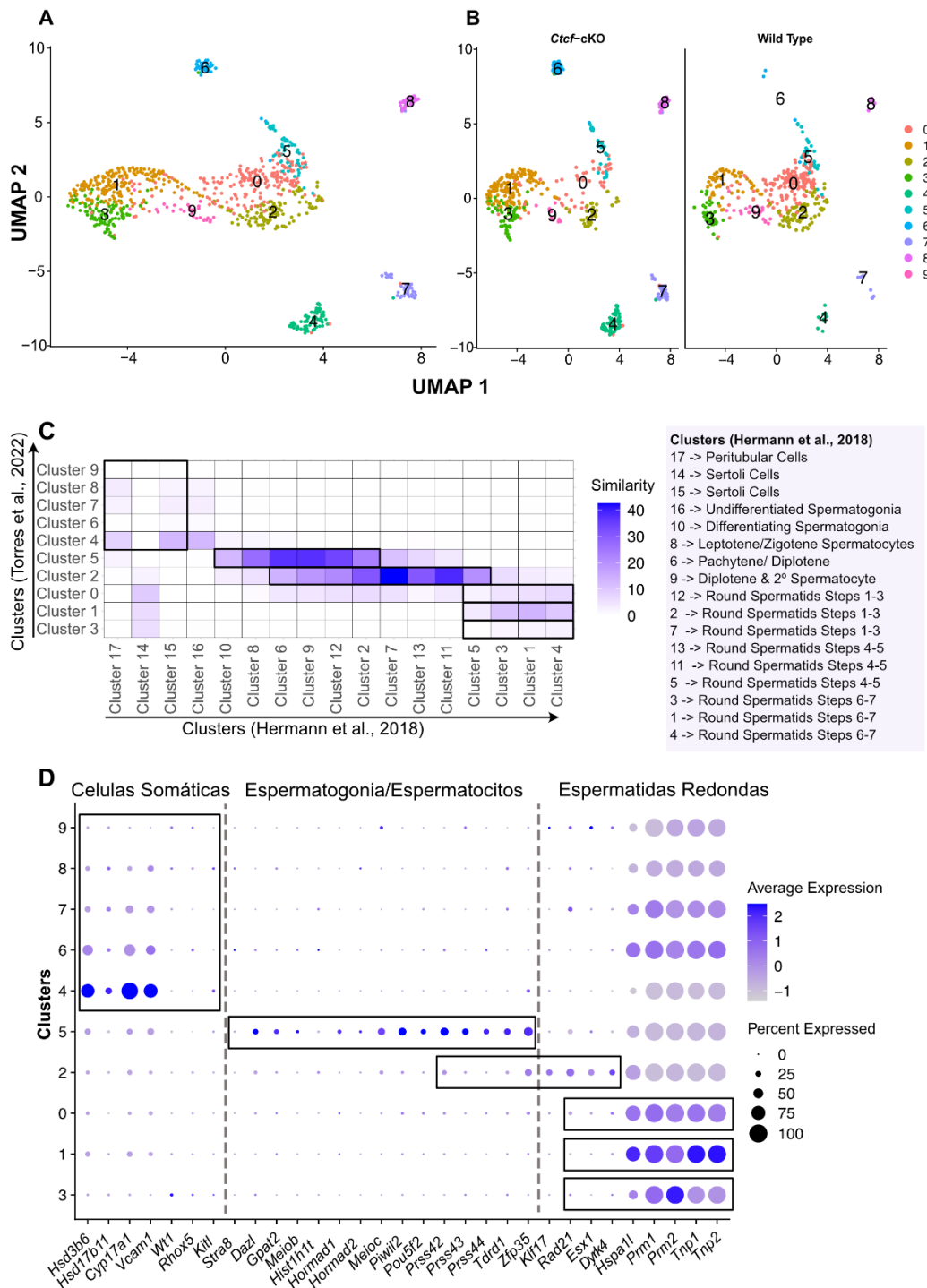


Figura 9. Clusters, validación e identificación de poblaciones celulares de testículos de ratones WT y *Ctcf-cKO*. (A) proyección de UMAP con los 10 clusters de ambos genotipos (WT y *Ctcf-cKO*). (B) Visualización de los cluster por genotipo, los clusters se visualizan dependiendo de su clave de color del lado izquierdo. (C) Heatmap que muestra los porcentajes de similitud compartida entre los 10 clusters obtenidos con los 17 clusters reportados previamente [21]. Se consideraron solo los genes con valores de p ajustado <0.05 para crear la lista de genes de cada cluster. La identidad de los clusters es mencionada en el recuadro de la derecha. (D) Gráfica de puntos con las proporciones de células de cada cluster expresando cada marcador (tamaño del punto) y el promedio de expresión (escala de color).

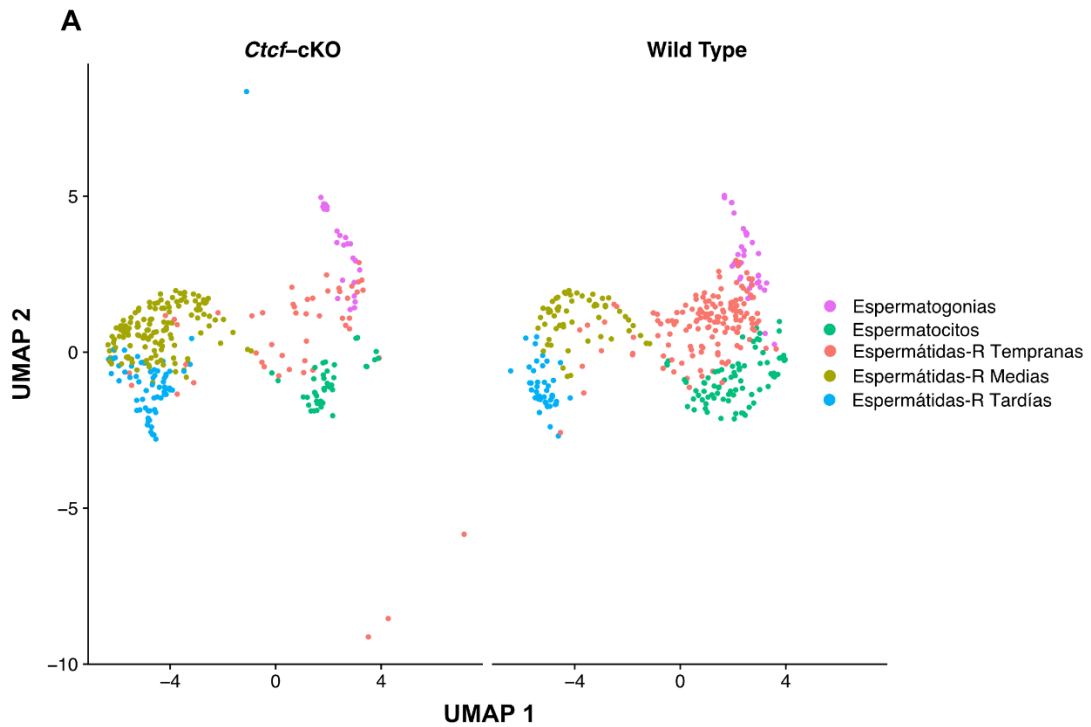


Figura 10. Visualización de UMAP con los clusters por genotipo sin células somáticas. Los clusters son distinguidos de acuerdo a la clave del color ubicada en la derecha. Espermátidas-R: Espermátidas redondas.

Por último, para comprobar las identidades y obtener una mejor resolución de los clusters con células espermatogénicas, se realizó un análisis de trayectoria usando Monocle 3. Este algoritmo utiliza y aprende la secuencia de cambios en la expresión génica por los que debe pasar cada célula como parte de un proceso biológico dinámico. Una vez que ha aprendido la “trayectoria” general de los cambios en la expresión génica, Monocle 3 puede colocar cada célula en su posición adecuada en la trayectoria [49].

Con el análisis de pseudotiempo, el cluster 5 se estableció como el estado inicial (espermatogonias/espermatocitos) seguido del cluster 2 (espermatocitos/espermátidas redondas), después el cluster 0, cluster 1 y cluster 3. Sin embargo, estos últimos tres clusters inicialmente identificados como

espermátidas redondas, son ahora identificados como espermátidas redondas tempranas, medias y tardías (Figura 12A y 12B). Con estos hallazgos se verificó que los clusters identificados recapitulan la espermatogénesis en ambos genotipos (Figura 10, 11 y 12B-C) lo que hace posible analizar los defectos transcripcionales durante la espermatogénesis en ausencia de CTCF en las células de ratones *Ctcf*-cKO.

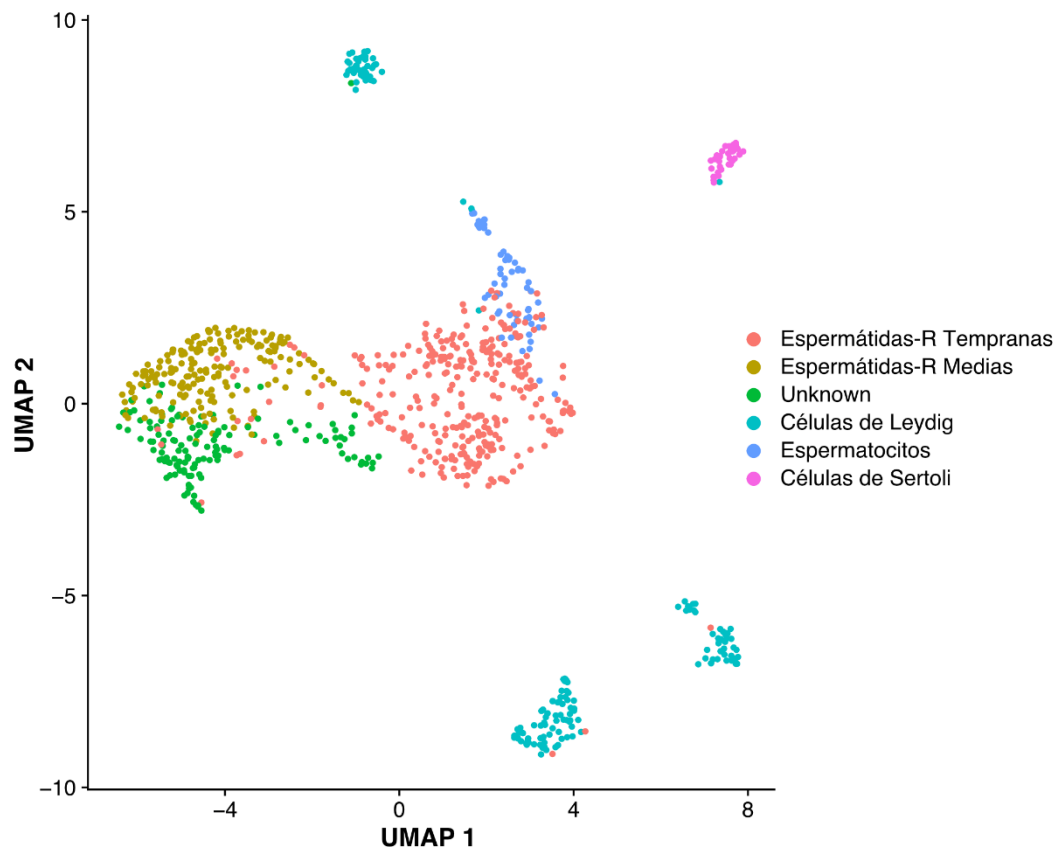


Figura 11. Identificación automática de los clusters utilizando ScType. La identificación celular se llevo a cabo utilizando marcadores moleculares específicos para poblaciones celulares presentes en testículo de ratón previamente publicadas [57] y compilados en la Tabla suplementaria 1. Espermátidas-R: Espermátidas redondas.

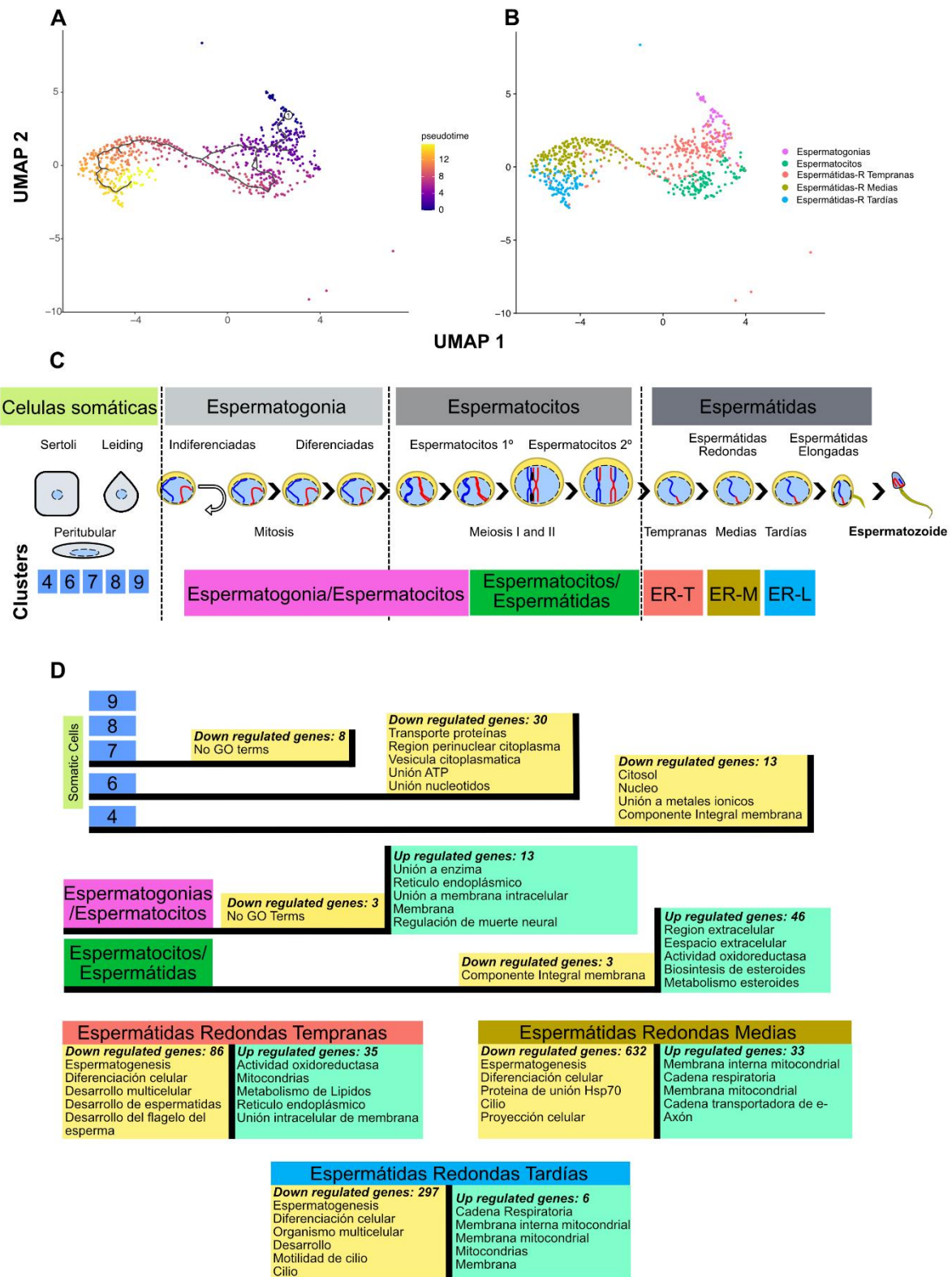


Figura 12. Predicción de la trayectoria y anotaciones funcionales en DAVID. (A) Análisis de pseudotiempo de células en espermatogénesis. La escala de color muestra la trayectoria de especialización del proceso. La proyección fue construida usando el UMAP previo y con un parametro de k=3 en Monocle 3, version 1.2.6. (B) Proyección de UMAP sin células somáticas e identificación de clusters por marcadores moleculares. (C) Línea del tiempo del proceso de

espermatogénesis localizando los clusters identificados en este trabajo basado en el mapa de similitud, identificación de marcadores moleculares y análisis de pseudotiempo. Espermatidas-R: Espermatidas redondas. ER-T: Espermatidas Redondas Tempranas, ER-M: Espermatidas Redondas Medias, ER-L: Espermatidas Redondas Tardías. (D) Expresión Diferencial de Genes (valor de p ajustado <0.05) usado entre células de testículos de ratón *Ctcf*-cKO contra células de ratones WT de cada cluster y se muestran los primeros 5 términos de ontología de genes (Top 5 GO) de los genes regulados de manera positiva (up-regulated) recuadros verdes y los genes regulados de manera negativa (down-regulated genes) recuadros amarillos.

7.2 Alteraciones en los perfiles transcripcionales de espermatogonias y

espermatocitos

Para evaluar si la pérdida de *Ctcf* produce alteraciones transcripcionales durante la espermatogénesis, se realizó la DGE entre las células provenientes del mismo cluster pero distinto genotipo (*Ctcf*-cKO vs WT). Después, para obtener una visión global de las funciones biológicas de las proteínas codificadas por los genes regulados de manera negativa y positiva, se llevo a cabo un análisis con el software DAVID que proporciona un conjunto completo de herramientas de anotación funcional para comprender el significado biológico detrás de grandes listas de genes y se seleccionaron los cinco términos mas representados estadísticamente [52,59]. En ese sentido, se encontraron alteraciones menores entre las células *Ctcf*-cKO comparadas con las WT de los clusters 4, 6 y 7, mientras que en los clusters 8 y 9 no se identificaron genes alterados, todos estos clusters fueron identificados como células somáticas.

En el caso de los clusters 4, 6 y 7 se identificaron 13, 30 y 8 genes regulados de manera negativa, respectivamente (logfc.threshold = 0.25 y valor de p ajustado <0.05, Anexos-Listas 1-3). La mayoría de estos genes muestran términos de ontología de genes (GO por su abreviación en inglés) relacionados con procesos de señalización a excepción del cluster 7 en el cual no se observó ningún término

GO (Figura 12D). Por otra parte, en el cluster identificado como espermatogonias/espermatocitos se detectaron 3 genes regulados de manera negativa y 13 de manera positiva en células provenientes de ratones *Ctcf*-cKO (valor de p ajustado <0.05 , Anexos-Lista 4) mientras que los genes regulados de manera negativa no tienen asociados ningún GO, en cambio, los regulados de manera positiva están relacionados mayoritariamente con anotaciones de componentes celulares (Figura 12D), lo que sugiere que las alteraciones transcripcionales en espermatogonias y espermatocitos no provocan cambios mayores en la viabilidad y función de estas células.

Adicionalmente, los niveles de ARNm de marcadores meióticos cruciales (genes: *Stra8*, *Dazl*, *Kit*, *Id4*, *Piwil2*, *Syce2*, *Sycp3*, *Rec8*) en estos clusters no mostraron diferencias significativas entre las células de los ratones WT y *Ctcf*-cKO (Figura 13), lo que concuerda con datos previos donde se demuestra que los puntos de revisión de las vías de señalización biológicas (i.e., formación del complejo de recombinación sinaptonémico) no están alterados [7].

Por su parte, en las células *Ctcf*-cKO del cluster identificado como espermatocitos/espermátidas, se encontraron 3 genes regulados de manera negativa y 46 regulados de manera positiva (adjusted p value <0.05 , Anexos-Lista 5). Los genes regulados de manera negativa están asociados con componentes integrales de la membrana, mientras que los regulados positivamente están involucrados mayoritariamente en procesos extracelulares y metabólicos (Figura 12D). Esto sugiere que los procesos de especialización celular no están del todo

afectados a nivel de ARNm por la ausencia del gen *Ctcf*, lo cuál concuerda con la etapa de identificación celular (Figura 12C-D).

7.3 Los defectos en perfiles transcripcionales de espermátidas redondas provocan anomalías en funciones biológicas

Durante la espermatogénesis, ocurren cambios drásticos en la morfología que dan como resultado la forma típica de torpedo y fisiología como la gran cantidad de mitocondrias presentes en las células haploides que se diferencian al espermatozoide maduro [19]. Por otra parte, una mayor regulación y cambios en los perfiles transcripcionales en espermátidas redondas producen varios clusters o tipos celulares con firmas moleculares únicas como las observadas en estudios previos de scRNAseq [20,21,57] y en este estudio. Concordantemente con lo mencionado, los clusters que representan las espermátidas redondas tempranas, medias y tardías mostraron un número menor de genes regulados de manera positiva comparado con los que están regulados de manera negativa.

Por su parte, en las espermátidas redondas tempranas, los 35 genes regulados positivamente están relacionados con actividades metabólicas (Anexos-Lista 6), mientras que en las espermátidas redondas medias, los 33 genes regulados positivamente están involucrados en procesos mitocondriales y en la formación del axón (Anexos-Lista 7). Finalmente, en las espermátidas redondas tardías los 6 genes regulados positivamente están involucrados con los componentes mitocondriales (Figura 12D), (Anexos-Lista 8). A su vez, se identificaron 86, 632 y 297 genes regulados de manera negativa en las espermátidas redondas

tempranas, medias y tardías, respectivamente (Anexos-Listas 6-8). Todos estos genes tienen anotaciones relacionadas con la espermatogénesis, desarrollo de las espermátidas, flagelo del espermatozoide y procesos de diferenciación, (Figura 12D).

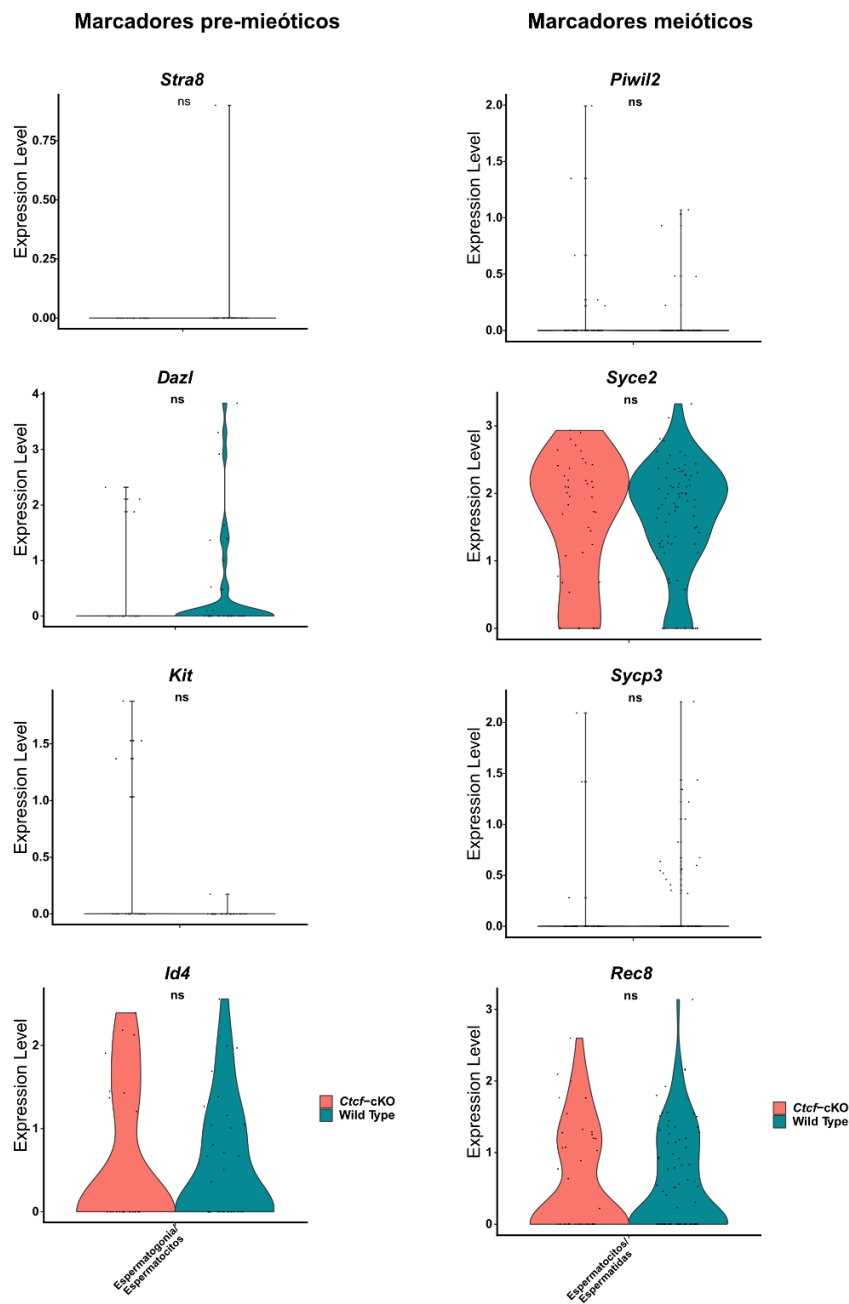


Figura 13. Gráficas de violín. Se muestran los niveles de ARNm detectados por scRNAseq de algunos marcadores pre-meióticos y meióticos cruciales en los clusters identificados como espermatogonia/espermatocitos y espermatocitos/espermátidas. No se encontraron diferencias significativas valor de $p > 0.05$.

Previamente, se reportó la presencia de alteraciones severas en la morfología de los espermatozoides maduros provenientes de ratones *Ctcf*-cKO [7], por lo que se decidió realizar un análisis más robusto para caracterizar las vías biológicas alteradas y sobrerrepresentadas durante la espermatogénesis que pudiera explicar los defectos morfológicos en el espermatozoide maduro.

El análisis consistió en un enriquecimiento de vías usando la herramienta GSEA [53] y con el uso del software *Cytoscape* se visualizaron las vías de enriquecimiento (representadas como nodos cuyo tamaño es proporcional al número de genes desregulados en una base de datos específica). Cuando varias vías están asociadas por similitud se muestran como círculos interconectados, representando un nivel de proceso de alto grado en una función biológica específica [60]. Con éste análisis, se identificaron vías biológicas sobre-representadas (vías biológicas alteradas o enriquecidas) en células de la espermatogénesis provenientes de ratones *Ctcf*-cKO, (Figura 14A-E). En ese sentido, en el cluster de espermatogonias/espermatocitos no se encontraron vías enriquecidas (Figura 14A), mientras que en el cluster de espermatocitos/espermátidas se observaron vías alteradas relacionadas con la expresión de genes en testículos o espermátidas, metilación de promotores en el ADN y la expresión diferencial de genes en modelos KO para la diferenciación de espermatocitos/espermátidas (Figura 14B). Entre los modelos de ratón KO con defectos transcripcionales similares a las vías identificadas en este cluster se reportan los siguientes: la obstrucción del desarrollo de espermátidas nulos para el gen *Tslc1* [61], la

progresión detenida de los espermatocitos en ratones nulos para el gen *Spo11^{-/-}* y *Cldn11^{-/-}* [62,63].

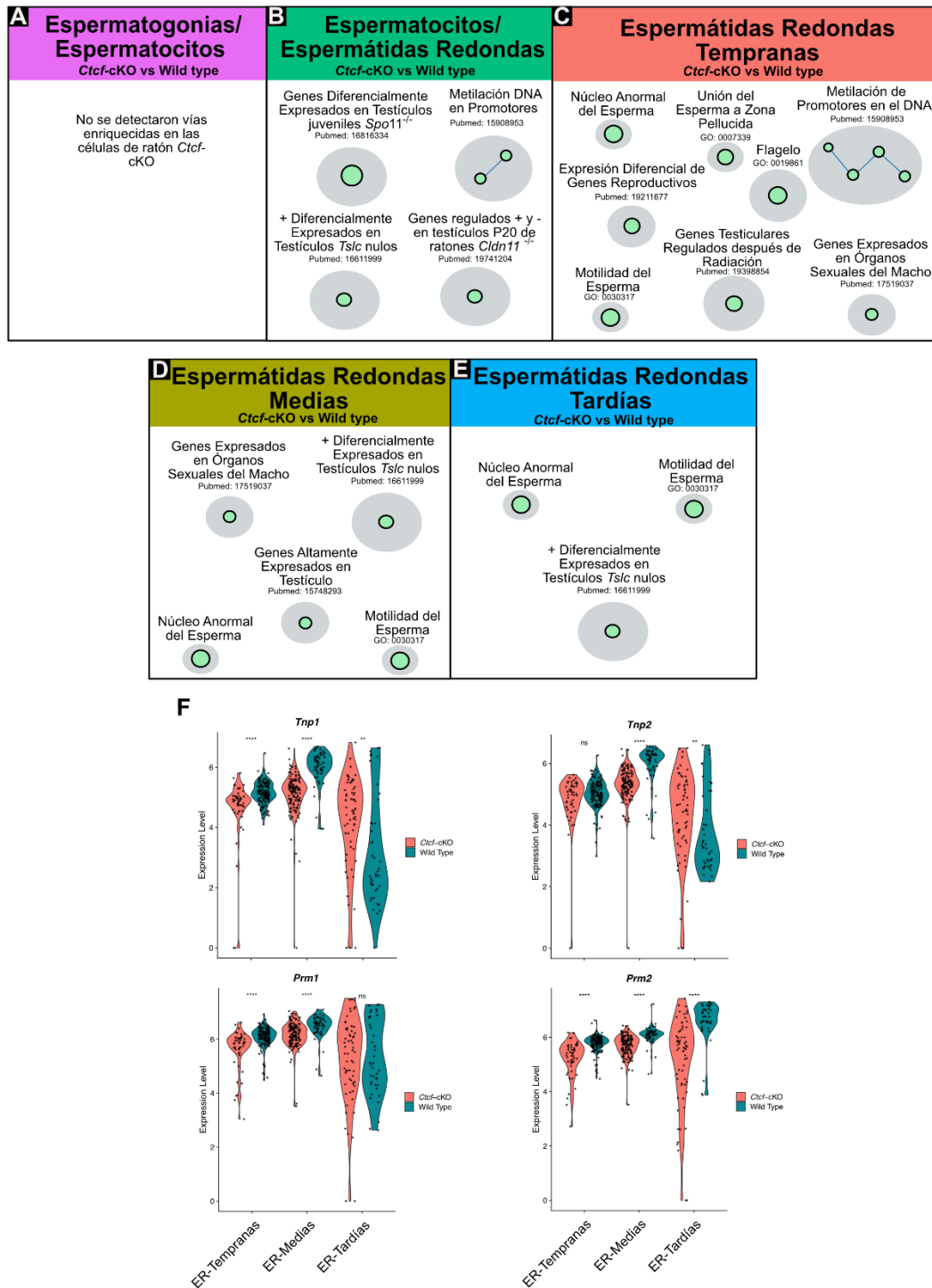


Figura 14. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) de células provenientes del ratón *Ctcf-cKO* contra células del ratón WT y expresión diferencial de genes clave para el recambio de histonas. (A-E) Mapas de enriquecimiento de vías o funciones biológicas alteradas en células *Ctcf-cKO* contra células WT. Las comparaciones fueron realizadas en cada cluster. Cada círculo verde

(nodo) representa una vía. Un vínculo entre vías fue establecido cuando dos vías tienen un índice de Jaccard > 0.4 , dado el gen expresado. Todas las vías enriquecidas tienen un FDR < 0.05 y un valor de $p < 0.01$. (F) Gráfica de violín con la expresión de los perfiles de los genes *Tnp1*, *Tnp2*, *Prm1* y *Prm2* en espermátidas redondas tempranas, medias y tardías de ratones *Ctcf*-cKO y WT. Las diferencias estadísticas están basadas en el Wilcoxon rank sum test, los asteriscos indican un valor de $p < 0.05$.

Por su parte, en el cluster de las espermátidas redondas tempranas se encontraron vías relacionadas con el núcleo de espermatozoides anormales, flagelo, motilidad espermática y con la metilación de promotores en el ADN entre otras (Figura 14C). Finalmente, en los clusters de espermátidas redondas medias y tardías se identificaron vías fisiológicas involucradas en la movilidad del espermatozoide, núcleo anormal en el espermatozoide y obstrucción del desarrollo de espermátidas en ratones nulos para el gen *Tslc1* [61] (Figura 14D-E). Todos estos hallazgos indican que las espermátidas redondas sufren alteraciones transcripcionales que podrían provocar malformaciones en el espermatozoide maduro de los ratones *Ctcf*-cKO.

7.4 La vía de incorporación de protaminas está afectada en las espermátidas de ratones *Ctcf*-cKO

Para corroborar los resultados obtenidos por los datos de GSEA que sugieren anomalías en el desarrollo de espermátidas y en el núcleo del espermatozoide, se decidió analizar las proteínas clave involucradas en el proceso de recambio de histonas por protaminas [18,19]. Primero, se observó la alteración en la regulación de los niveles de ARNm de los genes *Tnp1*, *Tnp2*, *Prm1* y *Prm2* en las espermátidas redondas (tempranas, medias y tardías) identificadas en la etapa de espermiogénesis (Figura 14F). Posteriormente, se decidió detectar la incorporación de estas proteínas en el núcleo de espermátidas utilizando inmunofluorescencia en cortes histológicos de testículos de ratón *Ctcf*-cKO y WT. Se observó que mientras

en espermátidas elongadas/elongamiento del ratón WT, ambas proteínas TNP1 y TNP2 son co-expresadas (Figura 15A-E), en el 25% de los tubúlos seminíferos analizados de las espermátidas del ratón *Ctcf*-cKO en algunas espermátidas (sin la forma elongada típica) se detectó la señal solo para TNP1 (Figura 15F-J). Además, para estimar la interferencia por el ruido de fondo, se realizaron los controles negativos (cortes histológicos con solo anticuerpo secundario) (Figura 16).

Por otra parte, se encontró de manera general que la señal para ambas proteínas (PRM2 y PRM1) en espermátidas redondas en ambos genotipos *Ctcf*-cKO y WT (Figura 15K-R y Figura 17A-L, respectivamente). Sin embargo, aunque la identificación de la señal para PRM1 en espermátidas fue detectada (17E-H) el 30% de los tubúlos seminíferos analizados del ratón *Ctcf*-cKO mostraron “espermátidas” con un patrón de expresión alterado (Figura 17I-L). Una vez más, se utilizaron controles negativos para estimar el ruido de fondo (Figura 18). Estos datos sugieren que el proceso de incorporación de protamina está alterado en las espermátidas del ratón *Ctcf*-cKO. Adicionalmente, se decidió explorar los niveles de las proteínas H2B, TNP1 y TNP2 presentes en las fracciones celulares citoplasmáticas, nucleares solubles y nucleares insolubles de testículos de ambos genotipos (WT y *Ctcf*-cKO).

De manera cualitativa se encontró que los niveles de H2B en los testículos de ratón en la fracción insoluble (asociada a la cromatina) están perturbados, lo cual, concuerda con los hallazgos reportados previamente, donde la señal para la H2B en espermatozoides maduros está disminuida en el genotipo *Ctcf*-cKO [7],

sucediendo algo similar para la proteína TNP1 al compararlos con los extractos de la fracción insolubles de los testículos de ratón WT (Figura 19).

7.5 Las espermátidas del ratón *Ctcf*-cKO muestran anomalías en la formación del acrosoma y la compactación nuclear

Finalmente, se caracterizaron algunas de las vías morfológicas alteradas en los perfiles transcripcionales en espermátidas redondas previamente identificadas con los análisis de DAVID y GSEA. De esta manera, se realizó una caracterización morfológica detallada de las células en espermatogénesis utilizando microscopía electrónica de transmisión (ME). Se describieron principalmente dos fenotipos en las espermátidas que confirman los hallazgos de la morfología anormal en el espermatozoide obtenida por los análisis de términos GO y GSEA.

El primero, está relacionado con la biogénesis del acrosoma. En espermátidas redondas provenientes del ratón WT, se observó que el saco del acrosoma y la capucha del acrosoma (Hc) con su respectiva formación esférica en la superficie del núcleo se encuentran como se esperaba [64] (Figura 20A), mientras que en las espermátidas redondas del ratón *Ctcf*-cKO estas dos estructuras están planas discrepando con lo usualmente reportado (Figura 20B).

Siguiendo el proceso de diferenciación espermática de una forma esférica a una asimétrica en los pasos 8-10, se observó que el acrosoma y el Hc están condensados y aplanados dando lugar a una vesícula acrosomal altamente electrodensa [65] (Figura 20C). Sin embargo, no se observaron estos cambios en

la formación de la vesícula del acrosoma en las espermátidas elongadas del ratón *Ctcf*-cKO (Figura 20D).

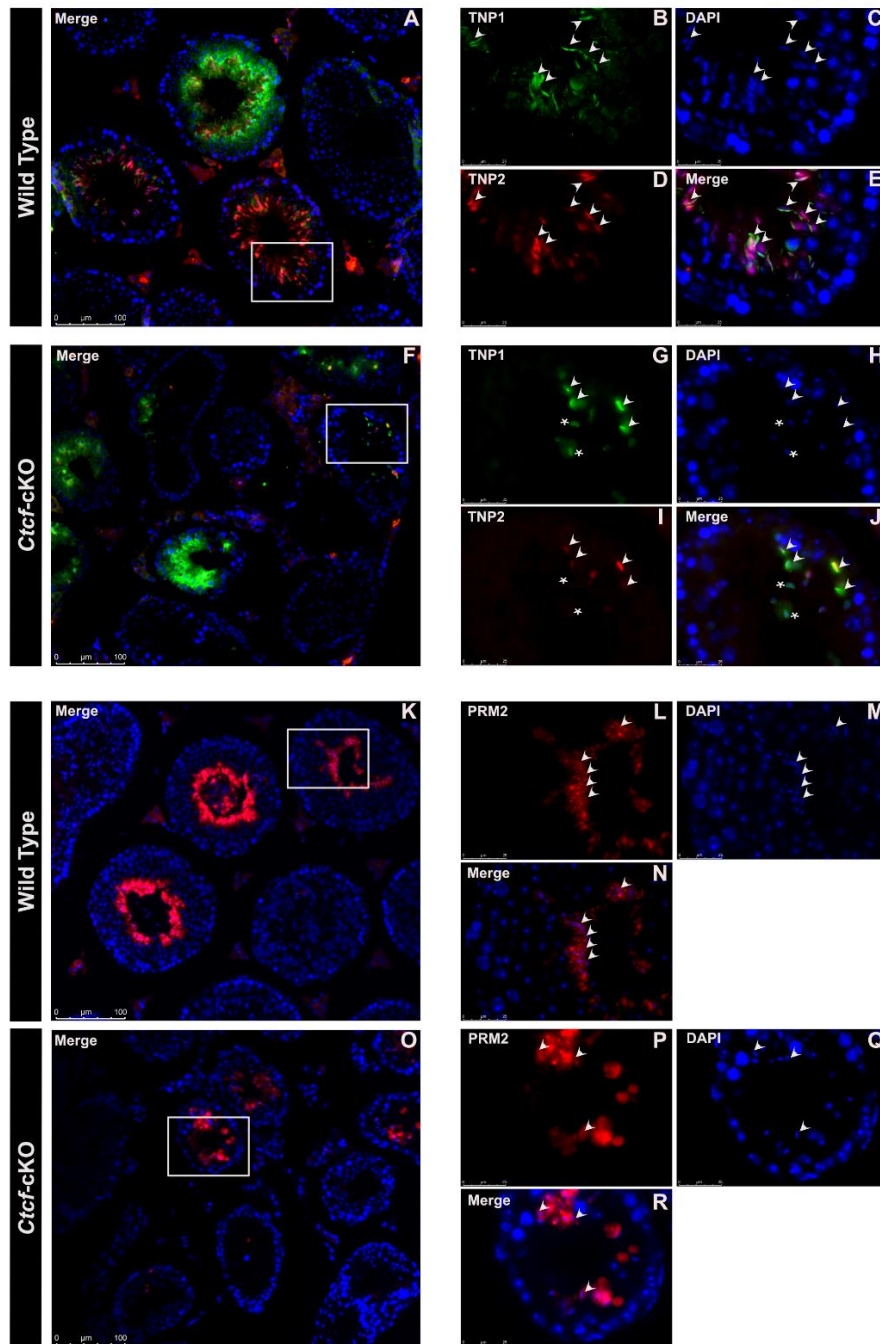


Figura 15. Micrografías de Inmunofluorescencia para los anticuerpos TNP1, TNP2 y PRM2 en cortes histológicos de testículos de ratón WT y *Ctcf*-cKO. (A-E) Muestran inmunodetección simultánea para TNP1 y TNP2 en espermátidas elongadas de cortes WT. (F-G) Inmunodetección simultánea para TNP1 y TNP2 en espermátidas elongadas de testículos de ratón *Ctcf*-cKO. La espermátidas elongadas con inmunodetección para ambas proteínas están señaladas con flechas, mientras que las espermátidas anormales con señal solo para TNP1 están indicadas con asteriscos. El 25% de los tubúlos seminíferos muestran espermátidas con un patrón anormal de

inmunodetección. (K-N) Immunodetección de PRM2 en espermátidas elongadas de cortes de testículo WT. (O-R) Immunodetección de PRM2 en espermátidas elongadas de cortes histológicos de testículo de ratón *Ctcf-cKO*. Las espermátidas elongadas con inmunodetección para PRM2 se indican con flechas. Los análisis se realizaron en tres ratones de cada genotipo.

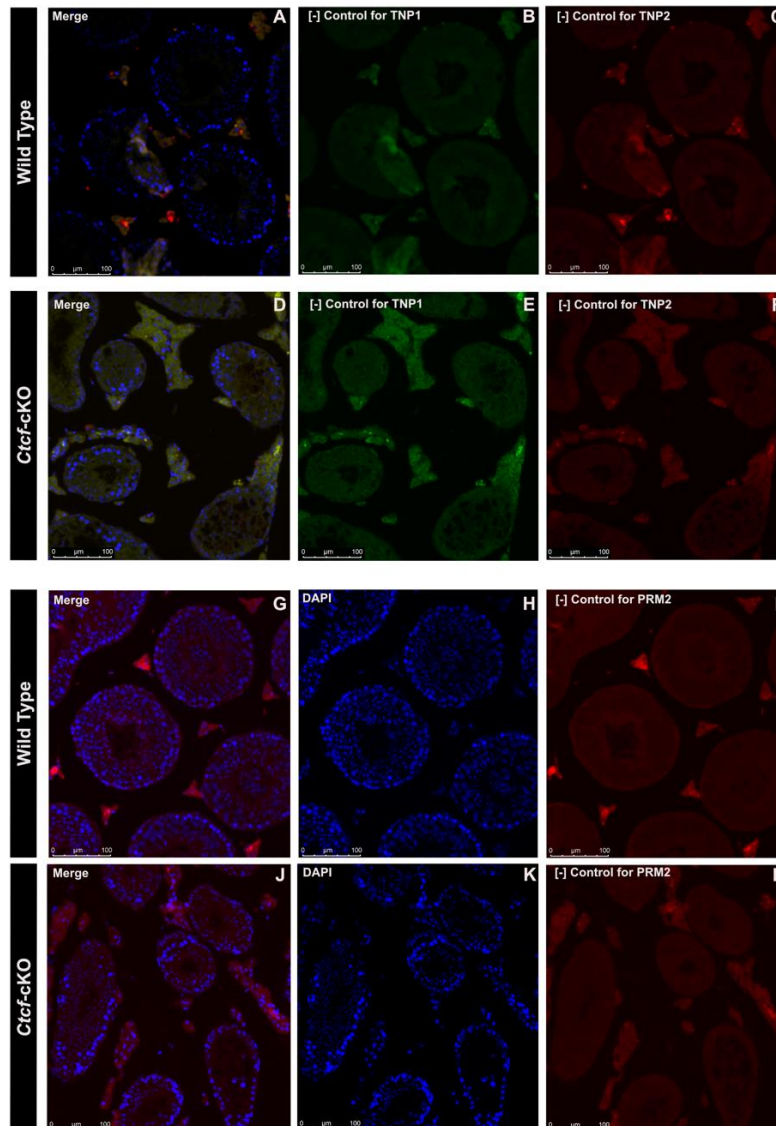


Figura 16. Micrografías de controles negativos para TNP1, TNP2 y PRM2 en cortes histológicos de testículos de ratón Wild Type y *Ctcf-cKO*. Se identificaron los cortes histológicos de los tubúlos seminíferos, las laminillas se incubaron con solución salina de fosfatos (PBS) en lugar del anticuerpo primario y los anticuerpos secundarios para la detección de TNP1, TNP2 y PRM2.

Adicionalmente, en espermátidas elongadas del ratón WT, se observó que la vesícula acrosomal estaba bien definida en la región apical del núcleo de espermátidas elongadas (Figura 20E), mientras que en espermátidas elongadas

del ratón *Ctcf*-cKO se observó una vesícula acrosomal no bien definida localizada en regiones nucleares diferente a la zona apical (Figura 20F). Finalmente, se observó que el acrosoma en espermatidas elongadas de los testículos de ratón WT está típicamente localizado en la zona apical y está bien delimitada (Figura 20G), pero en espermatidas elongadas del ratón *Ctcf*-cKO no se formó apropiadamente (Figura 20H).

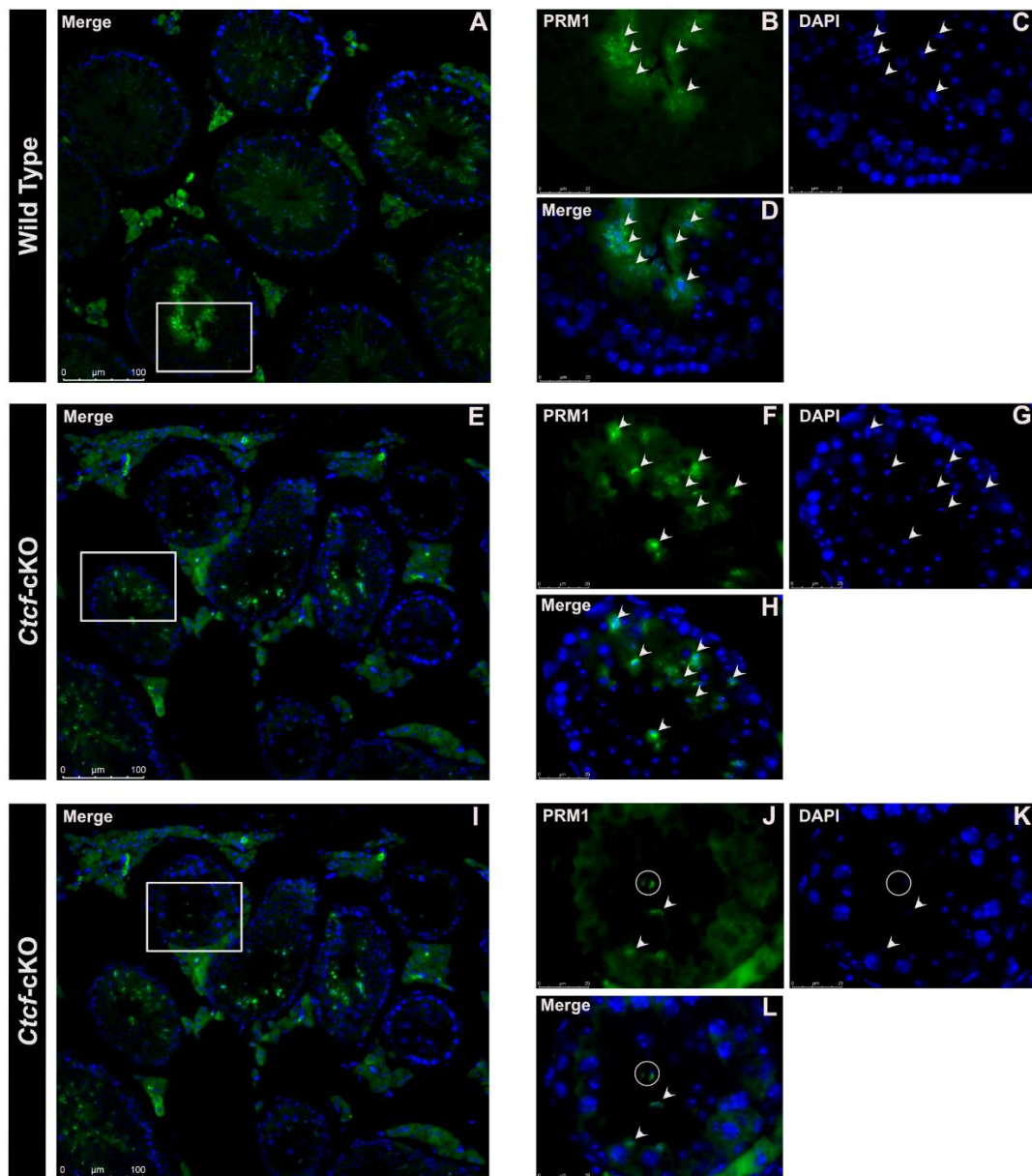


Figura 17. Micrografías inmunofluorescentes para el anticuerpo de PRM1 en cortes histológicos de testículos de ratón WT y *Ctcf*-cKO. (A-D) Inmunodetección para PRM1 en

espermátidas elongadas de cortes de testículos de ratón WT. En algunas espermátidas elongadas de manera representativa la señal para PRM1 se indica con flechas. (E-H) Immunodetección de PRM1 en espermátidas elongadas provenientes de cortes de testículo de ratón *Ctcf*-cKO. En algunas espermátidas elongadas de manera representativa la señal para PRM1 se indica con flechas. (I-L) Immunodetección de PRM1 en espermátidas elongadas de cortes histológicos de ratón *Ctcf*-cKO . 30% de los tubúlos seminíferos analizados contienen células con señal anormal para PRM1 señalada con un círculo.

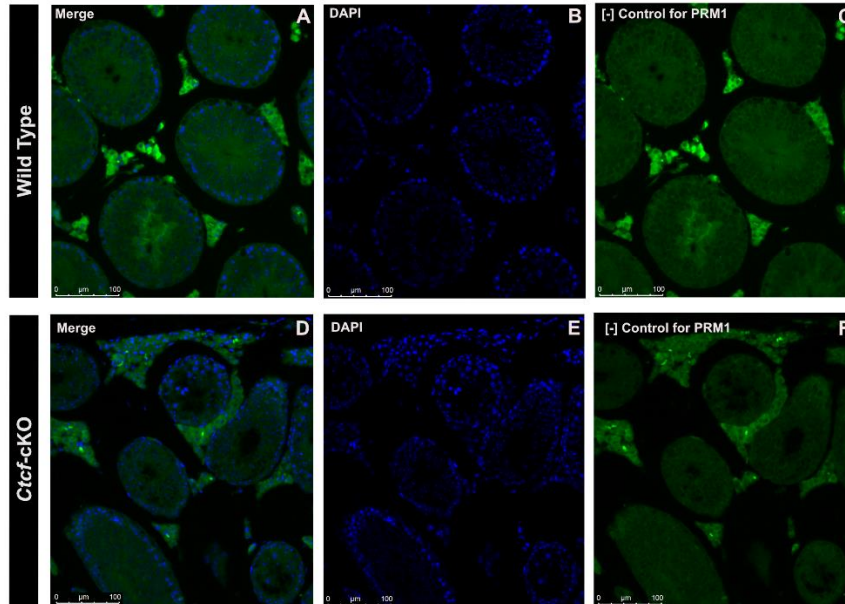


Figura 18. Micrografías de controles negativos para PRM1 en cortes histológicos de testículos de ratón Wild Type y *Ctcf*-cKO. Se identificaron los cortes histológicos de los tubúlos seminíferos, las laminillas se incubaron con solución salina de fosfatos (PBS) en lugar del anticuerpo primario y los anticuerpos secundarios para la detección de PRM1.

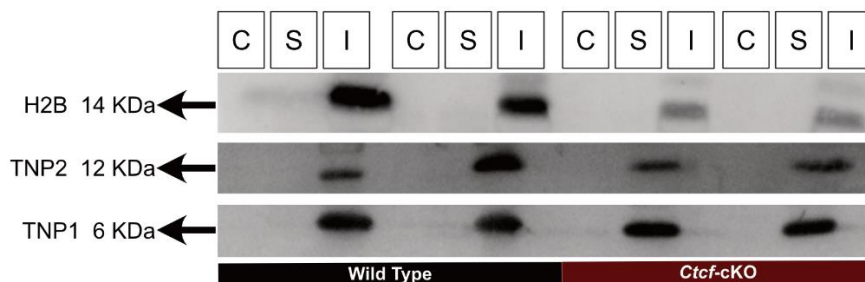


Figura 19.- Western blot para proteínas nucleares. En la parte superior de la imagen se muestran las fracciones celulares evaluadas. C: Citoplasmática; S= Fracción soluble nuclear; I= Fracción insoluble nuclear. Se utilizaron 2 ratones de cada genotipo. H2B: Histona 2B, TNP1: Proteína de Transición 1; TNP2: Proteína de Transición 2.

El segundo fenotipo que se detectó está relacionado con la envoltura nuclear y aunque no se detectaron defectos en las espermátidas redondas en las primeras etapas (Figura 20 I-J), si se detectaron los defectos en la forma del núcleo de

espermátidas provenientes del ratón *Ctcf*-cKO cuando recién comienza la elongación de la espermátida. En este punto, se observó la continuidad de la envoltura nuclear (Figura 20K) en las espermátidas WT, sin embargo, se identificó la alteración en la continuidad de la envoltura nuclear en las espermátidas del ratón *Ctcf*-cKO (Figura 20L). En cuanto a la compactación de la cromatina, se observó que en espermátidas del ratón WT se presenta un patrón de compactación homogéneo (Figura 20M) no ocurriendo esto en el caso de las espermátidas del ratón *Ctcf*-cKO (Figura 20N). Por último, se observó que la forma anormal de núcleo es evidente en espermátidas del ratón *Ctcf*-cKO comparadas con las espermátidas del ratón WT (Figura 20O-P).

8 Discusión

A pesar de que CTCF es una proteína clave en la formación del espermatozoide, en la fertilidad y del establecimiento del epigenoma en ratón [22], se sabe poco de su función a lo largo de las diferentes etapas de la espermatogénesis. En este estudio con el análisis del transcriptoma de células individuales en diferentes etapas de la espermatogénesis se encontró que no hay mayores alteraciones en las funciones biológicas de las células en mitosis y meiosis en ausencia de CTCF. Sin embargo, las células haploides que están en espermiogénesis tienen cambios significativos en sus perfiles transcripcionales y en la morfología. De acuerdo con esto, los análisis de términos GO y GSEA de los genes alterados indican que en las espermátidas redondas tempranas, medias y tardías tienen defectos en la diferenciación de espermátidas y en la morfología del espermatozoide. Adicionalmente, se observaron defectos en el proceso de recambio de histonas por

protaminas, en la compactación nuclear y en la biogénesis del acrosoma en las diferentes etapas de la espermiogénesis.

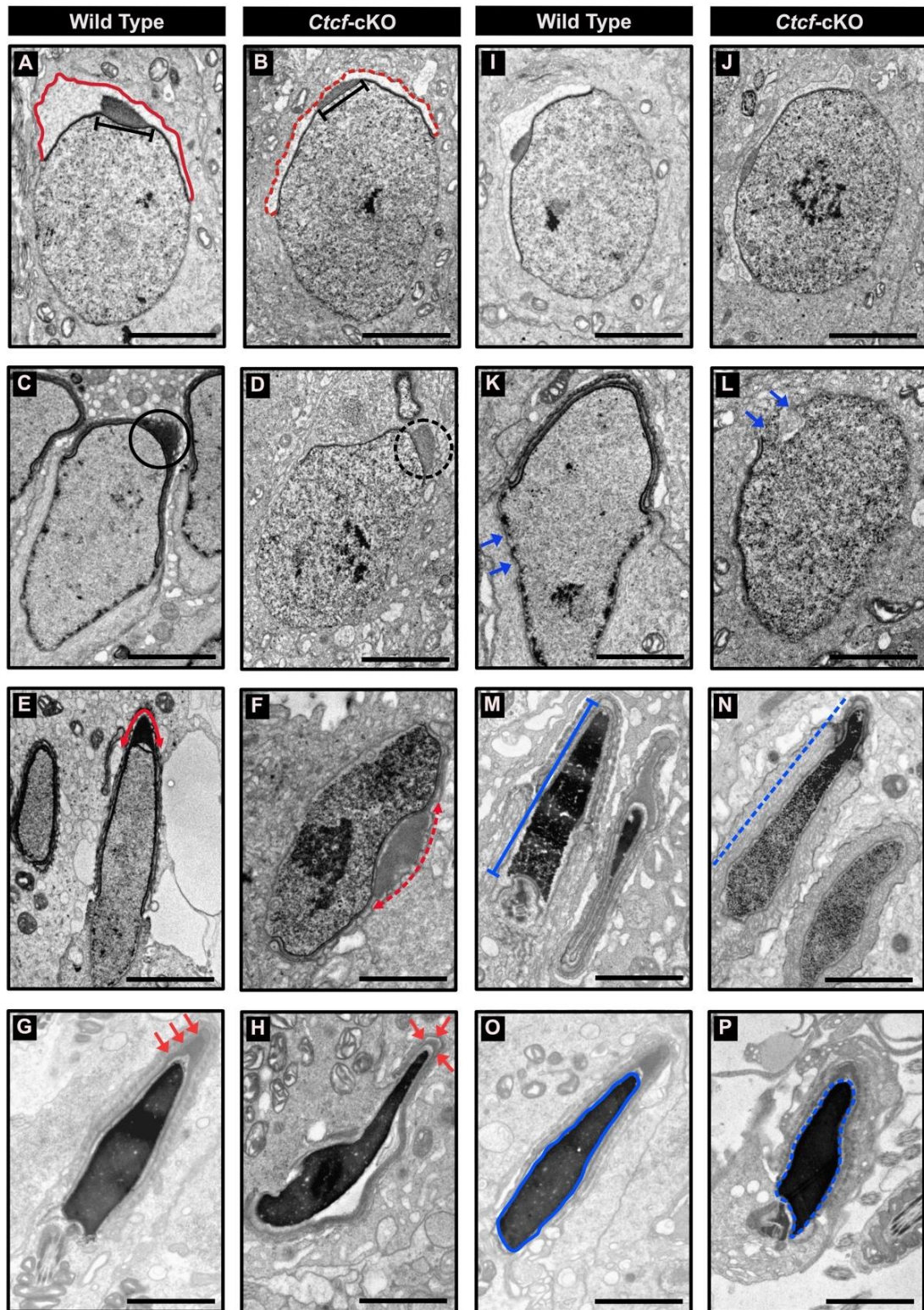


Figura 20. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de espermátidas provenientes de testículos de ratones WT y *Ctcf*-cKO. (A) Micrografía que muestra el saco del acrosoma (línea roja) y la capucha de la cabeza (Hc) (línea con barras negra) de una espermátida redonda de ratón WT. (B) Saco del acrosoma anormal (línea discontinua roja) y capucha de la cabeza (línea con barras negra) de una espermátida redonda de ratón *Ctcf*-cKO. (C) Capucha de la cabeza plana y condensada (círculo negro) de una espermátida en elongamiento proveniente del ratón WT. (D) Capucha de cabeza anormal (círculo negro discontinuo) de espermátidas en elongamiento provenientes de ratón *Ctcf*-cKO. (E) Acrosoma propiamente formado en la región apical anterior de una espermátida elongada de ratón WT (flecha de cabeza doble roja). (F) Acrosoma mal posicionado (flecha de cabeza doble discontinua roja) en espermátida elongada de ratón *Ctcf*-cKO. (G) Acrosoma en la región apical anterior en una espermátida elongada de testículo de ratón WT (flecha roja). (H) Acrosoma anormal y morfología alterada de una espermátida elongada de testículo *Ctcf*-cKO (flecha roja). (I) y (J) Adecuada morfología nuclear y compactación de la cromatina en espermátidas redondas de testículos de ratón WT y *Ctcf*-cKO. (K) Espermátida elongada con material electrodensito asociado a la envoltura nuclear y de la membrana nuclear (flechas azules) de ratones WT. (L) Espermátida elongada con envoltura nuclear discontinua proveniente de ratón *Ctcf*-cKO (flechas azules). (M) Espermátida elongada con cromatina condensada (línea azul con barras) proveniente de ratón WT. (N) Espermátida elongada con condensación anormal de la cromatina de testículo de ratón *Ctcf*-cKO (línea discontinua azul). (O) Espermátida elongada de testículo que muestra un completo empaquetamiento de la cromatina dentro del núcleo (línea azul del contorno) de ratón WT. (P) Espermátida elongada de testículo que muestra un aparente empaquetamiento de la cromatina (línea de contorno discontinua azul) pero con morfología anormal de la cabeza en ratones *Ctcf*-cKO. La barra representa una escala de 2 μ m.

En un estudio previo, se reportó que el espermatozoide maduro proveniente de la cauda de epidídimo de los ratones *Ctcf*-cKO presentan malformaciones en el acrosoma y la compactación nuclear [7]. Por lo que los hallazgos reportados en este estudio aportan que los defectos son producidos por alteraciones en los perfiles transcripcionales de genes relacionados en espermátidas redondas. En los estudios de scRNAseq de la espermatogénesis de ratón se reporta la heterogeneidad celular [20,21], por lo que se utilizaron marcadores estado específicos de estos estudios para identificar y validar los clusters en el diagrama de flujo bioinformático. Adicionalmente, se ha documentado que el uso de scRNAseq puede descubrir tipos celulares que son enmascarados cuando se usa RNAseq de todo el tejido [66,67].

Concordantemente, se encontró que durante el estado de espermátidas redondas de los ratones *Ctcf*-cKO, la metilación de promotores en el ADN esta afectada, este hallazgo debe ser explorado apropiadamente en nuestro modelo de ratón *Ctcf*-cKO, porque de acuerdo con estudios previos la metilación del ADN en la línea germinal tiene el potencial de regular la expresión génica en la descendencia. Las fallas en este proceso podrían tener consecuencias graves en el desarrollo post-fertilización [68]. En el ratón, la desmetilación del genoma ocurre en estados tempranos del desarrollo de las células germinales primordiales. Sin embargo, una onda de metilación de *nov* añade memoria epigenética a sitios genómicos específicos (regiones improntadas) en la etapa de pro-espermatogonia antes del nacimiento [69,70].

De esta forma se identificó que la metilación en promotores del ADN es afectada en los análisis durante la etapa de espermátidas redondas de ratones *Ctcf*-cKO, esto podría implicar que en la condición WT en un proceso continuo. Sin embargo, aún no se ha reportado la metilación de *nov* en el ADN durante la diferenciación de espermátidas. En su lugar, se ha sugerido que los mecanismos activos de la metilación del ADN están actuando para reprimir transposones en la línea germinal ya que MORC1 reprime los elementos transponibles en la línea germinal de ratones macho [71]. De acuerdo con esto, la transcripción del gen responsable de la represión de transposones MORC1, se encuentra afectada (análisis de GSEA) en espermátidas redondas de los ratones *Ctcf*-cKO.

A pesar de los bajos conteos, el espermatozoide con algunas alteraciones morfológicas y bioquímicas se sigue produciendo en ausencia de CTCF [7]. En este estudio se encontró que la mayoría de estos defectos son creados a nivel transcripcional en espermatidas redondas y resultan en un fenotipo que se observa a lo largo del proceso de la diferenciación del espermatozoide. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual CTCF controla esta función biológica no ha sido del todo descrita. Un posible mecanismo que se puede asociar a CTCF es el establecimiento de epigenoma del espermatozoide y la retención/reemplazo de histonas [22]. En espermatidas redondas, CTCF y el complejo de cohesinas ocupa regiones genómicas específicas orquestando la organización del genoma o del epigenoma del espermatozoide [22,72]. De tal forma que la ausencia de CTCF, la desorganización del epigenoma conlleva a los defectos transcripcionales descritos y la formación de espermatozoides anormales, no funcionales y con defectos en el proceso de retención de histonas.

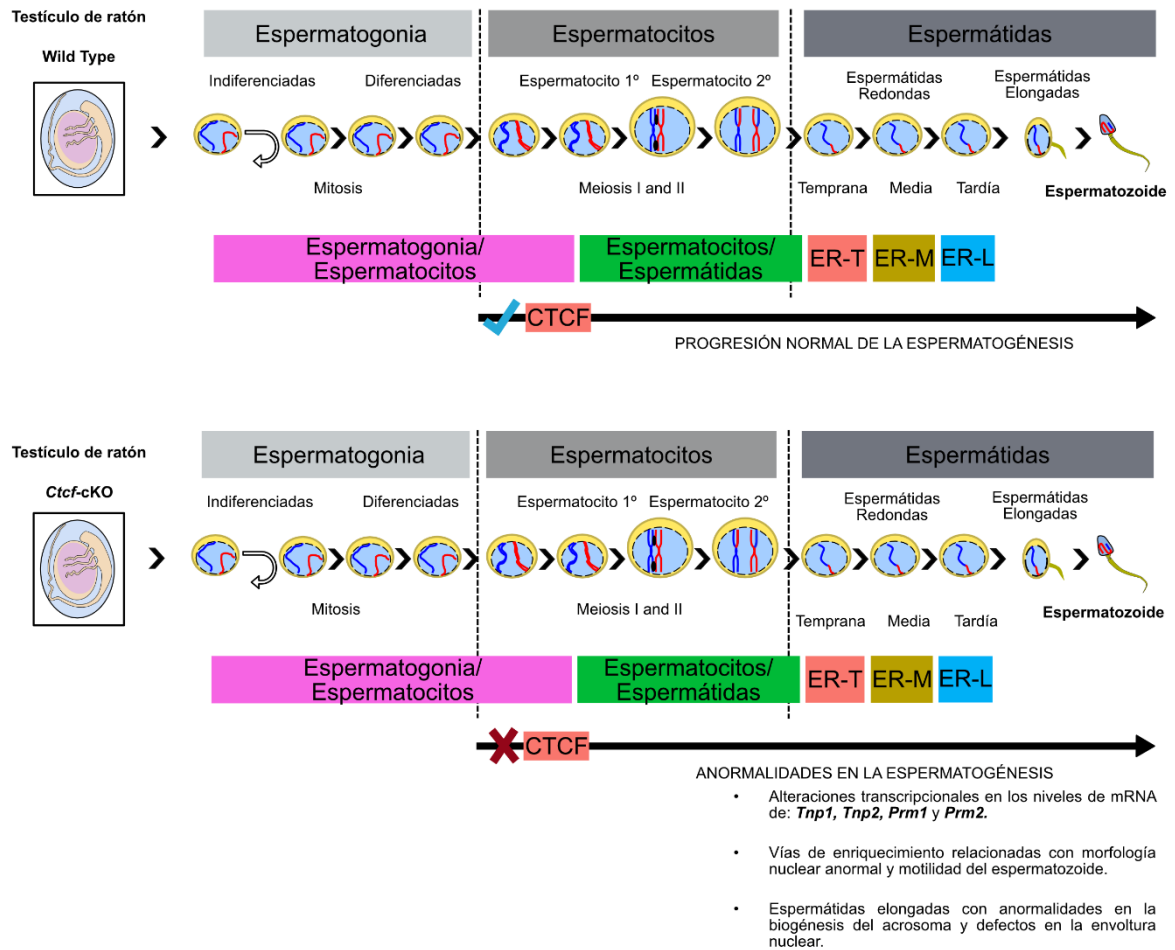
Por otra parte, se ha especulado que BORIS (un parálogo de CTCF) podría contribuir junto con CTCF con organizar el genoma de las espermatidas. De manera interesante, se ha demostrado que las unidades heterodímeras CTCF/BORIS regulan la transcripción en algunos genes específicos de espermatidas redondas, reprimiendo genes y que contribuyen de cierta manera a la organización del genoma del esperma [73]. Adicionalmente, se demostró que la expresión ectópica de Boris en células que no expresan BORIS, produce un intercambio de unión de homodímeros de CTCF/CTCF por heterodímeros de CTCF/BORIS en la cromatina [74]. Por lo tanto, aunque la contribución individual de CTCF y BORIS a la

espermatogénesis son diferentes [75], sería interesante estudiar si con la ausencia de CTCF en regiones específicas del genoma BORIS es capaz de unirse a esos sitios e interactuar con los motivos de unión a los que preferencialmente se une CTCF. En general, se puede especular que la ausencia de CTCF en espermátidas redondas tiene un impacto fuerte en la organización del epigenoma alterando los programas transcripcionales regulatorios específicos del espermatozoide. Sin embargo, estudios detallados de accesibilidad de la cromatina a nivel de célula única sería necesarios para explorar esta hipótesis. Adicionalmente, este estudio subraya la importancia de CTCF para la correcta progresión de la espermiogénesis.

9 Conclusiones

- Se logró analizar el transcriptoma de células individuales durante la espermatogénesis de ratones *Ctcf*-cKO.
- Se identificó que las vías de enriquecimiento alteradas durante la espermatogénesis de ratones *Ctcf*-cKO están relacionadas con defectos en la diferenciación de espermátidas.
- Se identificó que están alteradas las proteínas clave TNP2 y PRM1 para la compactación del genoma en espermátidas de ratones *Ctcf*-cKO.
- Finalmente, se asoció que las vías de enriquecimiento detectadas con los hallazgos morfológicos son principalmente defectos en la biogénesis del acrosoma y en la envoltura nuclear.

10 Modelo propuesto



Esquema de la espermatogénesis de ratón. En la parte superior se representa la progresión normal de la espermatogénesis de ratón en presencia de CTCF. Mientras que en la parte inferior se enlistan los principales hallazgos que provoca la ausencia de CTCF durante la espermatogénesis de ratón. ER-T: Espermátidas Redondas Tempranas, ER-M: Espermátidas Redondas Medias, ER-L: Espermátidas Redondas Tardías.

11 Perspectivas

Este estudio utilizó tecnología de vanguardia que ha revolucionado la descripción de procesos biológicos (desarrollo, envejecimiento, patologías) en los cuales el papel del scRNA-seq ha sido clave, sin embargo, el modelo de ratón empleado aún no ha sido del todo descrito, algunos aspectos importantes que valdrían la pena explorar serían: realizar pruebas de capacitación espermática en ambos genotipos, también se podría caracterizar utilizando secuenciación de última generación los ARNs presentes en espermatozoides maduros de ambos genotipos, incluso evaluar las interacciones de la cromatina en células individuales para determinar que territorios asociados topológicamente se pierden en ausencia de CTCF. Una vez teniendo la descripción de estos procesos se podría considerar utilizar los espermatozoides del ratón *Ctcf*-cKO para pruebas de fertilización *in vitro* y evaluar que efectos tiene la ausencia de CTCF en las primeras etapas del desarrollo embrionario.

12 Referencias

- [1] Arzate-Mejía RG, Recillas-Targa F, Corces VG. Developing in 3D: the role of CTCF in cell differentiation. *Development* 2018; 145:dev137729.
- [2] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Garland Science; 2002.
- [3] Cromatina. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Cromatina>. Accessed 30 December 2022.
- [4] Cubeñas-Potts C, Corces VG. Architectural Proteins, Transcription, and the Three-dimensional Organization of the Genome. *FEBS Lett* 2015; 589:2923–2930.
- [5] Le Dily F, Baù D, Pohl A, Vicent GP, Serra F, Soronellas D, Castellano G, Wright RHG, Ballare C, Filion G, Marti-Renom MA, Beato M. Distinct structural transitions of chromatin topological domains correlate with coordinated hormone-induced gene regulation. *Genes Dev* 2014; 28:2151–2162.
- [6] Phillips JE, Corces VG. CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 2009; 137:1194–1211.
- [7] Hernández-Hernández A, Lilienthal I, Fukuda N, Galjart N, Höög C. CTCF contributes in a critical way to spermatogenesis and male fertility. *Sci Rep* 2016; 6:28355.
- [8] Nowakowski A. *Generación de ratones transgénicos con expresión específica de Recombinasa Cre en megacariocitos* 2010.
- [9] Cuénot L. La loi de Mendel et l'hérédité de la pigmentation chez les souris. *Arch Zool exp gén* 1902; 3e:27–30.
- [10] Rader KA. *Of Mice, Medicine, and Genetics: C. C. Little's Creation of the Inbred Laboratory Mouse, 1909–1918. Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* 1999; 30:319–343.
- [11] Capecchi MR. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 1980; 22:479–488.
- [12] Weitzman JB. The mouse genome. *Genome Biology* 2002; 3:spotlight-20021205-02.
- [13] Damkier HH, Prasad V, Hübner CA, Praetorius J. Nhe1 is a luminal Na⁺/H⁺ exchanger in mouse choroid plexus and is targeted to the basolateral membrane in Ncbe/Nbcn2-null mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 296:C1291–C1300.
- [14] Ferry G, Giganti A, Cogé F, Bertaux F, Thiam K, Boutin JA. Functional invalidation of the autotaxin gene by a single amino acid mutation in mouse is lethal. *FEBS Lett* 2007; 581:3572–3578.
- [15] Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 2000; 26:99–109.
- [16] White-Cooper H, Bausek N. Evolution and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365:1465–1480.
- [17] Garg SG, Martin WF. Mitochondria, the Cell Cycle, and the Origin of Sex via a Syncytial Eukaryote Common Ancestor. *Genome Biol Evol* 2016; 8:1950–1970.
- [18] Dadoune J-P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech* 2003; 61:56–75.
- [19] Torres-Flores U, Hernández-Hernández A. The Interplay Between Replacement and Retention of Histones in the Sperm Genome. *Front Genet* 2020; 11:780.
- [20] Green CD, Ma Q, Manske GL, Shami AN, Zheng X, Marini S, Moritz L, Sultan C, Gurczynski SJ, Moore BB, Tallquist MD, Li JZ, et al. A Comprehensive Roadmap of Murine Spermatogenesis Defined by Single-Cell RNA-Seq. *Dev Cell* 2018; 46:651-667.e10.
- [21] Hermann BP, Cheng K, Singh A, Roa-De La Cruz L, Mutoji KN, Chen I-C, Gildersleeve H, Lehle JD, Mayo M, Westernströer B, Law NC, Oatley MJ, et al. The Mammalian Spermatogenesis Single-Cell Transcriptome, from Spermatogonial Stem Cells to Spermatids. *Cell Rep* 2018; 25:1650-1667.e8.
- [22] Jung YH, Sauria MEG, Lyu X, Cheema MS, Ausio J, Taylor J, Corces VG. Chromatin States in Mouse Sperm Correlate with Embryonic and Adult Regulatory Landscapes. *Cell Rep* 2017; 18:1366–1382.
- [23] Luo Z, Wang X, Jiang H, Wang R, Chen J, Chen Y, Xu Q, Cao J, Gong X, Wu J, Yang Y, Li W, et al. Reorganized 3D Genome Structures Support Transcriptional Regulation in Mouse Spermatogenesis. *IScience* 2020; 23:101034.
- [24] van de Werken C, van der Heijden GW, Eleveld C, Teeuwssen M, Albert M, Baarends WM,

- Laven JSE, Peters AHFM, Baart EB. Paternal heterochromatin formation in human embryos is H3K9/HP1 directed and primed by sperm-derived histone modifications. *Nat Commun* 2014; 5:5868.
- [25] Mali P, Kaipia A, Kangasniemi M, Toppari J, Sandberg M, Hecht NB, Parvinen M. Stage-specific expression of nucleoprotein mRNAs during rat and mouse spermiogenesis. *Reprod Fertil Dev* 1989; 1:369–382.
- [26] Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006; 12:417–435.
- [27] Steger K, Balhorn R. Sperm nuclear protamines: A checkpoint to control sperm chromatin quality. *Anat Histol Embryol* 2018; 47:273–279.
- [28] Siklenka K, Erkek S, Godmann M, Lambrot R, McGraw S, Lafleur C, Cohen T, Xia J, Suderman M, Hallett M, Trasler J, Peters AHFM, et al. Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. *Science* 2015; 350:aab2006.
- [29] Ali T, Renkawitz R, Bartkuhn M. Insulators and domains of gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 2016; 37:17–26.
- [30] Yh J, Meg S, X L, Ms C, J A, J T, Vg C. Chromatin States in Mouse Sperm Correlate with Embryonic and Adult Regulatory Landscapes. *Cell Reports* 2017; 18.
- [31] Li Y, Haarhuis JHI, Sedeño Cacciatore Á, Oldenkamp R, van Ruiten MS, Willems L, Teunissen H, Muir KW, de Wit E, Rowland BD, Panne D. The structural basis for cohesin-CTCF-anchored loops. *Nature* 2020; 578:472–476.
- [32] Lao KQ, Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, Wang X, Tuch B, Bodeau J, Siddiqui A, Surani MA. mRNA-Sequencing Whole Transcriptome Analysis of a Single Cell on the SOLiD™ System. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT* 2009; 20:266.
- [33] Cao J, Packer JS, Ramani V, Cusanovich DA, Huynh C, Daza R, Qiu X, Lee C, Furlan SN, Steemers FJ, Adey A, Waterston RH, et al. Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism. *Science* 2017; 357:661–667.
- [34] Shalek AK, Satija R, Shuga J, Trombetta JJ, Gennert D, Lu D, Chen P, Gertner RS, Gaublotte JT, Yosef N, Schwartz S, Fowler B, et al. Single-cell RNA-seq reveals dynamic paracrine control of cellular variation. *Nature* 2014; 510:363–369.
- [35] Grün D, Lyubimova A, Kester L, Wiebrands K, Basak O, Sasaki N, Clevers H, van Oudenaarden A. Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types. *Nature* 2015; 525:251–255.
- [36] Andrews TS, Hemberg M. Identifying cell populations with scRNASeq. *Mol Aspects Med* 2018; 59:114–122.
- [37] Chen G, Ning B, Shi T. Single-Cell RNA-Seq Technologies and Related Computational Data Analysis. *Front Genet* 2019; 10:317.
- [38] surecell-single-cell-rna-seq-data-sheet-1070-2016-014.pdf n.d.
- [39] Romagnoli D, Boccalini G, Bonechi M, Biagioni C, Fassan P, Bertorelli R, De Sanctis V, Di Leo A, Migliaccio I, Malorni L, Benelli M. ddSeeker: a tool for processing Bio-Rad ddSEQ single cell RNA-seq data. *BMC Genomics* 2018; 19:960.
- [40] Franke M, De la Calle-Mustienes E, Neto A, Almuedo-Castillo M, Irastorza-Azcarate I, Acemel RD, Tena JJ, Santos-Pereira JM, Gómez-Skarmeta JL. CTCF knockout in zebrafish induces alterations in regulatory landscapes and developmental gene expression. *Nat Commun* 2021; 12:5415.
- [41] Sadate-Ngatchou PI, Payne CJ, Dearth AT, Braun RE. Cre recombinase activity specific to postnatal, premeiotic male germ cells in transgenic mice. *Genesis* 2008; 46:738–742.
- [42] Oulad-Abdelghani M, Chazaud C, Bouillet P, Sapin V, Chambon P, Dollé P. Meis2, a novel mouse Pbx-related homeobox gene induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Dev Dyn* 1997; 210:173–183.
- [43] Muñoz LIO. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999, ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA PRODUCCION, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO. 2001:59.
- [44] Kossack N, Terwort N, Wistuba J, Ehmcke J, Schlatt S, Schöler H, Kliesch S, Gromoll J. A combined approach facilitates the reliable detection of human spermatogonia in vitro. *Hum Reprod* 2013; 28:3012–3025.
- [45] Khetani MP Radhika. Quality control using FastQC; 2019. https://hbctraining.github.io/Training-modules/planning_successful_rnaseq/lessons/QC_raw_data.html. Accessed 28 September 2022.
- [46] Tian L, Su S, Dong X, Amann-Zalcenstein D, Biben C, Seidi A, Hilton DJ, Naik SH, Ritchie

- ME. scPipe: A flexible R/Bioconductor preprocessing pipeline for single-cell RNA-sequencing data. *PLoS Comput Biol* 2018; 14:e1006361.
- [47] Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony - PubMed n.d.
- [48] Satija R, Farrell JA, Gennert D, Schier AF, Regev A. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol* 2015; 33:495–502.
- [49] Trapnell C, Cacchiarelli D, Grimsby J, Pokharel P, Li S, Morse M, Lennon NJ, Livak KJ, Mikkelsen TS, Rinn JL. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat Biotechnol* 2014; 32:381–386.
- [50] Bailur JK, McCachren SS, Doxie DB, Shrestha M, Pendleton K, Nooka AK, Neparidze N, Parker TL, Bar N, Kaufman JL, Hofmeister CC, Boise LH, et al. Early alterations in stem-like/resident T cells, innate and myeloid cells in the bone marrow in preneoplastic gammopathy. *JCI Insight* 2019; 5:e127807, 127807.
- [51] Okada D, Cheng JH, Zheng C, Yamada R. Data-driven comparison of multiple high-dimensional single-cell expression profiles. *J Hum Genet* 2022; 67:215–221.
- [52] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2009; 37:1–13.
- [53] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:15545–15550.
- [54] Lai L, Hennessey J, Bares V, Son EW, Ban Y, Wang W, Qi J, Jiang G, Liberzon A, Xijin Ge S. GSKB: A gene set database for pathway analysis in mouse. *Bioinformatics*; 2016.
- [55] Holden P, Horton WA. Crude subcellular fractionation of cultured mammalian cell lines. *BMC Res Notes* 2009; 2:243.
- [56] Zhang MJ, Ntranos V, Tse D. Determining sequencing depth in a single-cell RNA-seq experiment. *Nat Commun* 2020; 11:774.
- [57] Lukassen S, Bosch E, Ekici AB, Winterpacht A. Characterization of germ cell differentiation in the male mouse through single-cell RNA sequencing. *Sci Rep* 2018; 8:6521.
- [58] Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T. Fully-automated and ultra-fast cell-type identification using specific marker combinations from single-cell transcriptomic data. *Nat Commun* 2022; 13:1246.
- [59] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009; 4:44–57.
- [60] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003; 13:2498–2504.
- [61] van der Weyden L, Arends MJ, Chausiaux OE, Ellis PJ, Lange UC, Surani MA, Affara N, Murakami Y, Adams DJ, Bradley A. Loss of TSLC1 causes male infertility due to a defect at the spermatid stage of spermatogenesis. *Mol Cell Biol* 2006; 26:3595–3609.
- [62] Smirnova NA, Romanienko PJ, Khil PP, Camerini-Otero RD. Gene expression profiles of Spo11^{-/-} mouse testes with spermatocytes arrested in meiotic prophase I. *Reproduction* 2006; 132:67–77.
- [63] Mazaud-Guittot S, Meugnier E, Pesenti S, Wu X, Vidal H, Gow A, Le Magueresse-Battistoni B. Claudin 11 deficiency in mice results in loss of the Sertoli cell epithelial phenotype in the testis. *Biol Reprod* 2010; 82:202–213.
- [64] Cheng CY, Mruk DD. The biology of spermatogenesis: the past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365:1459–1463.
- [65] Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol Biol Cell* 2003; 14:4628–4640.
- [66] Bacher R, Kendzierski C. Design and computational analysis of single-cell RNA-sequencing experiments. *Genome Biol* 2016; 17:63.
- [67] Chaudhry F, Isherwood J, Bawa T, Patel D, Gurdziel K, Lanfear DE, Ruden DM, Levy PD. Single-Cell RNA Sequencing of the Cardiovascular System: New Looks for Old Diseases. *Front Cardiovasc Med* 2019; 6:173.
- [68] Stewart KR, Veselovska L, Kelsey G. Establishment and functions of DNA methylation in the germline. *Epigenomics* 2016; 8:1399–1413.
- [69] McSwiggin HM, O'Doherty AM. Epigenetic reprogramming during spermatogenesis and

male factor infertility. *Reproduction* 2018; 156:R9–R21.

[70] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293:1089–1093.

[71] Pastor WA, Stroud H, Nee K, Liu W, Pezic D, Manakov S, Lee SA, Moissiard G, Zamudio N, Bourc'his D, Aravin AA, Clark AT, et al. MORC1 represses transposable elements in the mouse male germline. *Nat Commun* 2014; 5:5795.

[72] Jung YH, Kremisky I, Gold HB, Rowley MJ, Punyawai K, Buonanotte A, Lyu X, Bixler BJ, Chan AWS, Corces VG. Maintenance of CTCF- and Transcription Factor-Mediated Interactions from the Gametes to the Early Mouse Embryo. *Mol Cell* 2019; 75:154-171.e5.

[73] Rivero-Hinojosa S, Pugacheva EM, Kang S, Méndez-Catalá CF, Kovalchuk AL, Strunnikov AV, Loukinov D, Lee JT, Lobanenko VV. The combined action of CTCF and its testis-specific paralog BORIS is essential for spermatogenesis. *Nat Commun* 2021; 12:3846.

[74] Pugacheva EM, Rivero-Hinojosa S, Espinoza CA, Méndez-Catalá CF, Kang S, Suzuki T, Kosaka-Suzuki N, Robinson S, Nagarajan V, Ye Z, Boukaba A, Rasko JEJ, et al. Comparative analyses of CTCF and BORIS occupancies uncover two distinct classes of CTCF binding genomic regions. *Genome Biol* 2015; 16:161.

[75] Suzuki T, Kosaka-Suzuki N, Pack S, Shin D-M, Yoon J, Abdullaev Z, Pugacheva E, Morse HC, Loukinov D, Lobanenko V. Expression of a testis-specific form of Gal3st1 (CST), a gene essential for spermatogenesis, is regulated by the CTCF paralogous gene BORIS. *Mol Cell Biol* 2010; 30:2473–2484.

13 Anexos

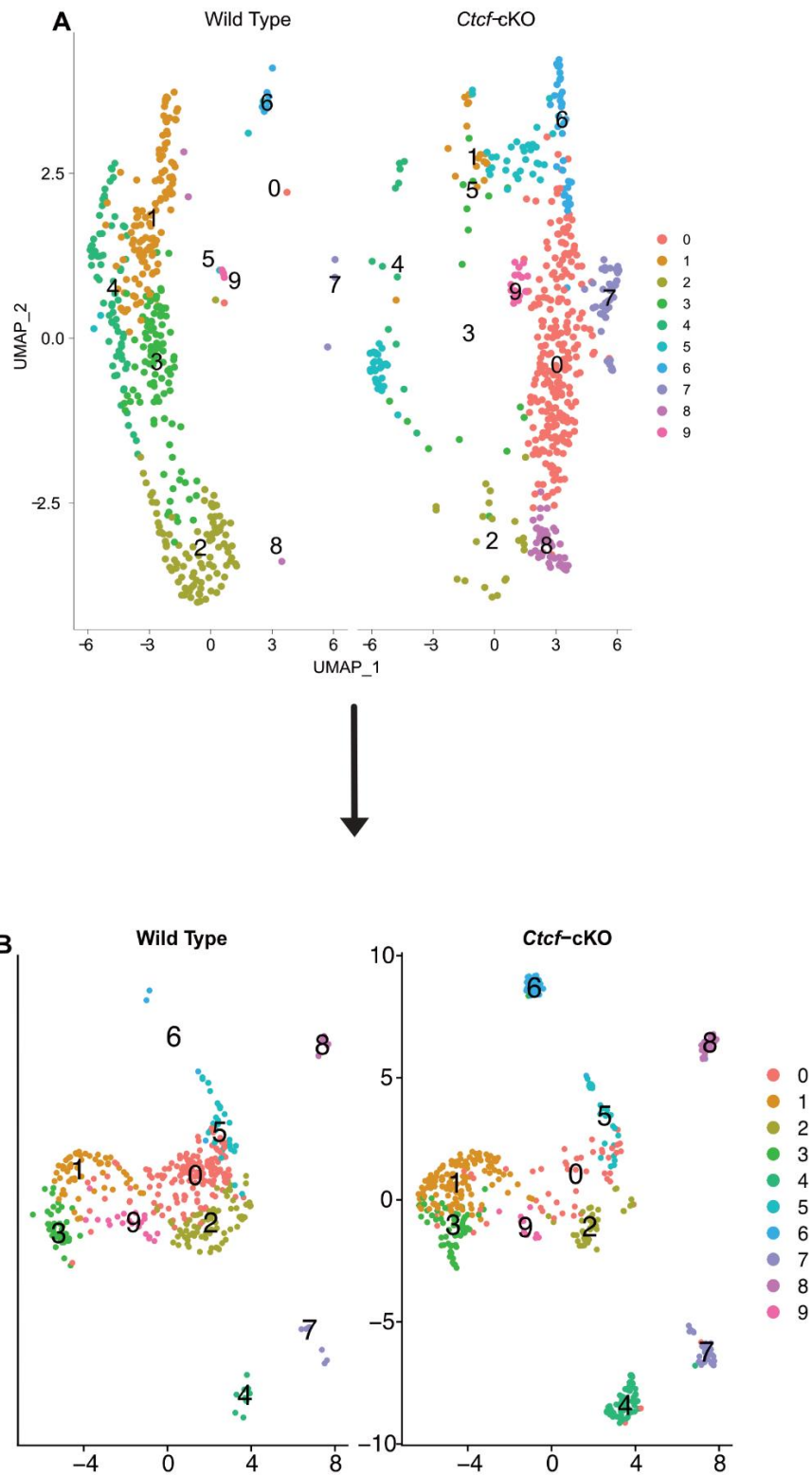


Figura Suplementaria 1. Reducción de dimensiones. A) UMAP sin corrección de ruido de fondo (batch-correction). B) UMAP con corrección de ruido de fondo usando el paquete en R de harmony versión 0.1.0.

13.1 Tabla Suplementaria 1

Tabla suplementaria 1. Marcadores moleculares específicos para células de testículo de ratón

Tipo celular	Marcador molecular
Leydig	VCAM1, CYP17A1, HSD17B11, HSD3B6, BMI1, ITGB1, TOB1, UBA1, PGK1, ZBTB16
Sertoli	NOTCH1, NOTCH2, CLOCK, PER1, DYRK2, ADGRA3, ITGB1, KITL, SOX8, RHOX5, WT1, WSB2, TEXT19.2, BIK, ETV5
Espermatogonias	SMAD4, SMAD5, USPY9, TFCEP2, BEX1, U2AF1, PHF5A, TOP2A, SMC1B, CLOCK, TAF3, TAF7, UCHL1, BRCA2, CRABP1, CCNB1, CCNA2, CD9, MOV10L1, TEXT14, TEXT15, NXF2, USP26, ESX1, ZFP318, MITF, UTP3, RAD21, TAF4B, KIT, NANOS3, SOHLH1, ACTB, H3F3B, EPCAM, SOHLH2, TAF7L, TEX11, HIST1H1A, SCML2, STRA8, TEXT19.1, DAZL
Espermatocitos	U2AF1, PHF5A, TOP2A, SMC1B, SYCE1, DYRK1B, PRSS44, PRSS42, PRSS43, ZMYND15, TBP, PIWIL1, SYCE3, PIN1, BRCA2, SMAD1, CCNB2, CCNB1, CCNE2, MEIOC, NEK2, DAZAP1, KHDRBS1, YBX2, BRDT, OVOL1, POU5F2, ADAM2, TESK1, PDHA2, CCNA1, TDRD1, PIWIL2, RNF17, DDX4, TEX12, STK31, SYCP2, SYCP1, HSPA2, ZFP35, FER, WDR33, PBX4, GPAT2, STAG3, CLGN, PCNA, BOLL, SPO11, KDM3A, HORMAD1, ID4, HORMAD2, BSG, SYCP3
Espermátidas redondas tempranas	TEX40, DYRK3, DRYK2, ZMYND15, TRIM27, TBP, FOXJ1, BMI1, SMAD6, CCND3, CCNB1, CCNB2, DDX25, GK2, GYKL1, PABPC2, ADAD1, MAK, CCNA1, DDX4, TUBA3A, HSF2, STAT4, NR6A1, ZNRF4, PMFBP1, KLF17, CAMK4, SLXL1, ACRV1, REC8, CREM, H3F3
Espermátidas redondas medias	BCL2L11, SUFU, LXH1, REXO1, SPA17, MEIG1, NR6A1, HSPA1L, ZNRF4, SPZ1, PMFBP1, MSH4, ACTL11, HIL1S, PGK2, TNP2, ACTB, PRM1, TNP1, PRM2
Espermátidas redondas tardías	H1FNT, AKAP4, DYRK1B, CDKN1C, SUFU, REXO1, GAPDHS, SMCP, SPA17, MEIG1, CRISP2, MEA1, STAT4, HSPA1L, ZNRF4, SPZ1, PMFBP1, ACTL11, CAMK4, HILS1, PRM2
Endoteliales	VWF, TIE1, TEK, LY6C1

13.2 Preparación de buffers para fraccionamiento de proteínas de testículo de ratón

Buffer 1 Digitonina Buffer (Citosol) 150 mM de NaCl 50 mM HEPES pH 7.4 25 µg/mL digitonina	Buffer 2 NP40 Buffer (Organelos de Membrana) 150 mM de NaCl 50 mM HEPES pH 7.4 1% NP40
Buffer 3 RIPA Buffer (Membrana nuclear) 150 mM de NaCl 50 mM HEPES pH 7.4 0.5% deoxicolato de sodio 0.1% Sulfato Docecil de Sodio (SDS) Benzona	Buffer 4 E-RIPA Extracción Buffer (proteínas insolubles) 150 mM de NaCl 50 mM HEPES pH 7.4 0.5% deoxicolato de sodio 0.1% Sulfato Docecil de Sodio (SDS) 100 mM Ditiotretitol (DTT)

13.3 Listas de Genes Diferencialmente Expresados

Lista 1 de genes diferencialmente expresados cluster 4

Gene	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
B9D1	4.63E-08	-0.941810618	0	0.444	0.00079423
PPHLN1	4.63E-08	-1.173769097	0	0.444	0.00079423
CORO2A	5.08E-07	-1.884377436	0.062	0.667	0.00871529
SURF1	7.82E-07	-1.893007501	0.062	0.667	0.01341827
SCARB1	1.02E-06	-1.642297501	0.092	0.778	0.01755883
GNPDA2	1.68E-06	-1.715981545	0.015	0.444	0.02878396
RBX1	1.69E-06	-1.142937611	0.092	0.778	0.02899616
RPE	2.03E-06	-1.48610326	0.015	0.444	0.0347609
G2E3	2.67E-06	-1.193915633	0	0.333	0.04587972
GM12231	2.67E-06	-1.943191135	0	0.333	0.04587972
GSR	2.67E-06	-1.347637043	0	0.333	0.04587972
SLC45A4	2.67E-06	-0.892837603	0	0.333	0.04587972
TEX43	2.67E-06	-1.41367327	0	0.333	0.04587972

Lista 2 de genes diferencialmente expresados cluster 6

Gen	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
ARCN1	8.52E-09	-2.104796982	0	0.75	0.00014624
HSP90AA1	8.52E-09	-3.567478881	0	0.75	0.00014624
JMJD1C	8.52E-09	-2.209468903	0	0.75	0.00014624
KMT2A	8.52E-09	-3.068364856	0	0.75	0.00014624
NUP205	8.52E-09	-2.652969461	0	0.75	0.00014624
PSPC1	8.52E-09	-2.842553092	0	0.75	0.00014624
SPINT1	8.52E-09	-3.116782235	0	0.75	0.00014624
SYCP1	8.52E-09	-4.005757758	0	0.75	0.00014624
TOMM70A	8.52E-09	-2.224189977	0	0.75	0.00014624
UBA2	8.52E-09	-1.753030872	0	0.75	0.00014624
VPS50	8.52E-09	-2.325121971	0	0.75	0.00014624
ZMYM5	8.52E-09	-2.070894695	0	0.75	0.00014624
NEMF	8.40E-08	-2.711282597	0.047	1	0.00144214
MIER1	5.68E-07	-3.003242905	0.023	0.75	0.00975322
AFTPH	8.53E-07	-2.509572528	0.023	0.75	0.0146326
CDKN2D	8.53E-07	-3.03831146	0.023	0.75	0.0146326
LUC7L3	8.53E-07	-2.734610229	0.023	0.75	0.0146326
MARCH7	8.53E-07	-3.743804634	0.023	0.75	0.0146326
PAIP1	8.53E-07	-1.963492363	0.023	0.75	0.0146326
RBM39	8.53E-07	-2.929477964	0.023	0.75	0.0146326
THUMPD3	8.53E-07	-2.370545994	0.023	0.75	0.0146326
VAMP3	8.53E-07	-2.332078326	0.023	0.75	0.0146326

YIPF4	8.53E-07	-3.411918412	0.023	0.75	0.0146326
CUL1	1.27E-06	-2.168377584	0.023	0.75	0.02182183
FAM20B	1.27E-06	-2.102875038	0.023	0.75	0.02182183
IFRD1	1.27E-06	-2.401267025	0.023	0.75	0.02182183
PDRG1	1.27E-06	-2.089415973	0.023	0.75	0.02182183
TLN1	1.27E-06	-2.568380066	0.023	0.75	0.02182183
ZC3H7A	1.27E-06	-2.415105744	0.023	0.75	0.02182183
SETX	2.77E-06	-2.578733961	0.093	1	0.04759586

Lista 3 de genes diferencialmente expresados cluster 7

Gen	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
ZPBP	4.74E-08	-2.161094211	0.026	0.857	0.00081416
4933424G06RIK	5.85E-08	-1.667167278	0	0.714	0.00100378
TOR1AIP2	5.85E-08	-1.694617515	0	0.714	0.00100378
1700001L19RIK	2.16E-07	-2.269116112	0.079	1	0.00370342
TPRN	1.62E-06	-1.832428664	0.026	0.714	0.02772245
1700113H08RIK	1.68E-06	-1.806046615	0	0.571	0.02875499
FAM183B	1.68E-06	-1.551107106	0	0.571	0.02875499
SLCO6C1	2.73E-06	-1.330289649	0.026	0.714	0.0467931

Lista 4 de genes diferencialmente expresados en el cluster de espermatogonias/espermatocitos

Gen	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
GSTM1	1.15E-09	4.920231294	0.92	0.294	1.97E-05
GSTM2	2.78E-09	3.580083587	0.84	0.118	4.76E-05
FABP3	1.42E-08	3.438869749	0.76	0.059	0.0002439
EPHX1	1.04E-07	3.176010248	0.64	0	0.00178788
HSD3B6	1.04E-07	2.921287925	0.64	0	0.00178788
LCN2	2.06E-07	3.959651419	0.76	0.176	0.00353548
ACSBG1	2.15E-07	2.361406748	0.68	0.059	0.0036975
APOE	2.58E-07	3.578783779	0.8	0.265	0.00443645
CLU	3.66E-07	3.190096012	0.8	0.265	0.00628931
MT-ND4	4.95E-07	1.568284663	0.96	0.735	0.00850247
CST3	6.61E-07	2.24891861	0.92	0.618	0.01134745
MT-CYTB	1.53E-06	0.973165561	0.96	0.794	0.02628204
ALDH2	2.22E-06	2.727847408	0.64	0.088	0.03804782
ARL 6.00	2.67E-06	-1.014407577	0	0.618	0.04590601
PANK2	2.67E-06	-1.413173819	0	0.618	0.04590601
TOP2A	2.67E-06	-1.612912135	0	0.618	0.04590601

Lista 5 de genes diferencialmente expresados en el cluster de espermatoцитos/espermátidas

Gen	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
MT-CYTB	8.31E-17	2.716867921	1	0.551	1.43E-12
GSTM1	4.67E-16	3.479932958	0.929	0.295	8.01E-12
MT-ND4	1.81E-14	2.948132108	0.929	0.449	3.11E-10
APOE	1.82E-14	2.717900558	0.81	0.154	3.13E-10
PTGDS	6.10E-14	3.294695292	0.857	0.256	1.05E-09
CLU	2.35E-13	2.554790566	0.81	0.231	4.03E-09
CYP17A1	2.83E-12	1.868137351	0.548	0.013	4.85E-08
LCN2	9.01E-12	2.464857427	0.714	0.167	1.55E-07
MT-ND2	9.51E-12	1.932550241	0.81	0.244	1.63E-07
FABP3	1.70E-11	2.077717431	0.595	0.051	2.92E-07
IGFBP7	2.40E-11	1.782842771	0.643	0.09	4.13E-07
DCN	3.88E-11	3.001594345	0.667	0.115	6.66E-07
CYP11A1	3.91E-11	1.901689443	0.476	0	6.71E-07
HBB-BS	3.91E-11	2.2800242	0.476	0	6.71E-07
HMGCS2	1.19E-10	1.706859611	0.595	0.064	2.05E-06
AGT	1.66E-10	2.577684332	0.619	0.115	2.84E-06
CST3	2.23E-10	2.286640139	0.738	0.269	3.82E-06
GSN	3.11E-10	2.401598199	0.667	0.154	5.34E-06
ALDH1A1	4.02E-10	2.042076301	0.595	0.077	6.90E-06
ACSBG1	4.49E-10	1.69989543	0.524	0.038	7.71E-06
SPARC	8.07E-10	1.794902758	0.619	0.115	1.38E-05
ALDH2	9.86E-10	1.712738711	0.524	0.051	1.69E-05
GSTM2	1.15E-09	2.62217416	0.643	0.167	1.98E-05
MT-ND1	1.23E-09	2.237635325	0.786	0.346	2.12E-05
CITED1	2.47E-09	1.394393554	0.476	0.038	4.24E-05
RBBP7	3.15E-09	1.765123681	0.548	0.077	5.40E-05
EPHX1	9.02E-09	1.802981081	0.405	0.013	0.00015473
FADS2	3.03E-08	1.280151444	0.381	0.013	0.00051973
HSD3B6	3.03E-08	1.542291907	0.381	0.013	0.00051973
APOC1	3.74E-08	1.682291129	0.405	0.026	0.00064219
SELENOP	4.47E-08	1.283303929	0.429	0.038	0.00076647
SERPINF1	5.06E-08	1.258377269	0.381	0.013	0.00086909
HSD3B1	7.29E-08	1.386947889	0.333	0	0.00125052
AKR1CL	7.31E-08	1.110556313	0.476	0.064	0.00125542
IGFBP6	1.94E-07	1.161093763	0.476	0.064	0.00332984
AKR1A1	2.01E-07	1.273983459	0.429	0.051	0.00345775
COMT	2.28E-07	0.716394994	0.952	0.962	0.00391425
1700013D24RIK	3.79E-07	-1.255915923	0.5	0.846	0.00650568

TLE5	4.88E-07	1.267857302	0.476	0.09	0.00838234
CHCHD10	5.89E-07	1.520484114	0.5	0.128	0.01011251
ACAA2	7.77E-07	0.923244538	0.286	0	0.01334068
CTSD	8.15E-07	0.941825409	0.357	0.026	0.01398159
ADAMTS5	8.53E-07	0.890703179	0.357	0.026	0.01464599
TMEM176A	1.44E-06	1.167726013	0.333	0.026	0.02471545
BC051142	1.78E-06	-0.96393944	0.881	0.962	0.03061528
GSTA4	1.82E-06	0.956366624	0.333	0.026	0.03117948
FTH1	1.90E-06	1.83458417	0.786	0.628	0.03257997
LYZ2	2.06E-06	0.972600041	0.31	0.013	0.03536975
ADAM39	2.10E-06	-1.047652944	0.167	0.628	0.03611627

Lista 6 de genes diferencialmente expresados en el cluster de espermátidas redondas tempranas

Gen	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
FAM243	3.03E-11	-1.809616101	0.04	0.633	5.20E-07
5031439G07RIK	1.14E-09	-1.631434839	0.04	0.565	1.96E-05
1700017N19RIK	6.48E-08	-1.50781465	0.06	0.503	0.00111145
1700012A03RIK	6.05E-11	-1.377995694	0.44	0.898	1.04E-06
SPACA4	4.44E-07	-1.371764765	0.08	0.503	0.00761968
PKIB	7.86E-09	-1.342820708	0.2	0.741	0.00013492
CEP295NL	1.51E-08	-1.331247805	0.22	0.769	0.00025881
TSSK6	4.94E-12	-1.326489287	0.5	0.98	8.48E-08
TPPP2	2.49E-10	-1.315897665	0.38	0.891	4.28E-06
1700024P04RIK	1.86E-09	-1.296253633	0.32	0.884	3.20E-05
MICOS13	1.23E-09	-1.293820217	0.26	0.844	2.11E-05
LYZL6	7.54E-07	-1.276840829	0.04	0.429	0.01294128
CEP112	2.58E-08	-1.261168496	0.16	0.68	0.00044212
IQCF3	3.34E-10	-1.227468474	0.54	0.966	5.74E-06
LPIN1	4.51E-08	-1.22136687	0.18	0.66	0.00077369
1700009J07RIK	3.23E-07	-1.215886703	0.2	0.68	0.00554508
1700034E13RIK	8.59E-09	-1.198621247	0.26	0.789	0.00014746
ITPR3OS	3.76E-07	-1.196027765	0.08	0.524	0.00644598
SMKR-PS	6.24E-07	-1.187829247	0.18	0.626	0.01071526
UBQLN3	6.67E-09	-1.165541282	0.18	0.714	0.0001145
CARHSP1	1.60E-07	-1.136648579	0.14	0.626	0.00274712
1700013G24RIK	1.79E-09	-1.124187926	0.48	0.959	3.07E-05
UBE2W	4.63E-07	-1.113768309	0.06	0.49	0.00793875
CHL1	4.66E-09	-1.108666754	0.34	0.878	8.01E-05
PHACTR1	1.13E-07	-1.100300544	0.06	0.531	0.00193754
DCUN1D1	5.70E-07	-1.10015455	0.18	0.646	0.0097772

1700113H08RIK	5.99E-07	-1.099235083	0.08	0.517	0.01028547
ERGIC2	5.78E-07	-1.085988064	0.14	0.592	0.0099203
ISG20L2	6.88E-07	-1.073827544	0.2	0.66	0.01180015
GTSF1L	1.79E-07	-1.071015957	0.22	0.701	0.00307347
1700031M16RIK	3.55E-08	-1.064325351	0.26	0.803	0.00060993
BCL2L14	2.83E-07	-1.062869981	0.3	0.816	0.00485408
1700016P04RIK	2.45E-07	-1.059053193	0.18	0.66	0.00421114
CSTL1	1.90E-06	-1.044318761	0.24	0.673	0.0325933
IQCF4	3.28E-07	-1.042920442	0.36	0.85	0.00562492
TCTEX1D2	2.75E-06	-1.030302876	0.08	0.497	0.04718935
4930571K23RIK	3.91E-08	-1.027777588	0.6	0.918	0.00067067
1700011L22RIK	5.87E-07	-1.02347513	0.12	0.585	0.0100819
CCDC50	2.07E-06	-1.012333252	0.16	0.612	0.03552616
SMCP	2.35E-15	-1.009029194	0.88	1	4.04E-11
NUPR1L	2.32E-08	-0.99954051	0.56	0.959	0.00039886
4921507P07RIK	1.23E-06	-0.984391264	0.4	0.81	0.02112951
SPATC1	1.27E-08	-0.982980153	0.14	0.694	0.00021863
LRRC8B	1.64E-07	-0.967765019	0.22	0.789	0.00281856
1700019D03RIK	1.31E-06	-0.949092467	0.4	0.884	0.02245633
CRAT	2.11E-07	-0.946405385	0.3	0.81	0.00361493
MEA1	7.05E-07	-0.940492036	0.22	0.687	0.01209511
4933415F23RIK	7.14E-07	-0.932311374	0.28	0.762	0.01226268
GNPAT	2.13E-06	-0.924547315	0.12	0.558	0.03662805
1700129C05RIK	7.89E-07	-0.918598936	0.3	0.789	0.01354662
4933411K16RIK	4.96E-07	-0.916285697	0.58	0.932	0.00851499
ST6GALNAC2	4.79E-08	-0.91259929	0.76	0.973	0.00082268
GM9999	3.13E-08	-0.912483366	0.58	0.952	0.00053655
SPZ1	2.08E-07	-0.901598985	0.58	0.966	0.00357152
1700001C19RIK	4.82E-07	-0.892014362	0.48	0.905	0.00827156
TBC1D20	3.00E-07	-0.891513132	0.36	0.878	0.00515504
CYPT12	1.83E-07	-0.877410047	0.36	0.912	0.00314261
1700003E16RIK	4.47E-07	-0.876151044	0.46	0.912	0.00767115
GALNTL5	1.98E-07	-0.87319296	0.38	0.837	0.00339755
FSCN3	1.48E-06	-0.87182958	0.2	0.66	0.02540385
SPATA19	8.76E-07	-0.853697735	0.4	0.864	0.01503214
AI507597	7.01E-07	-0.84731402	0.36	0.878	0.01203128
RPL41	5.40E-07	-0.838196541	0.26	0.789	0.00926574
ANKEF1	5.88E-07	-0.813972764	0.32	0.796	0.01008448
GAPDHS	7.45E-11	-0.807126662	0.9	1	1.28E-06
FAM71F2	1.75E-06	-0.80110082	0.58	0.932	0.0300304

DNAJB8	2.34E-06	-0.796165751	0.5	0.939	0.04018777
SPATA3	4.84E-07	-0.796037507	0.66	0.952	0.00830449
DBIL5	7.10E-11	-0.794326237	0.9	1	1.22E-06
ODF1	3.74E-10	-0.791105018	0.88	0.98	6.42E-06
CRISP2	6.14E-10	-0.781929707	0.86	1	1.05E-05
OTUB2	2.35E-07	-0.780111324	0.36	0.857	0.00403765
TXNDC2	1.35E-06	-0.777639095	0.44	0.891	0.02314069
CDIPTOS	1.11E-06	-0.764492505	0.58	0.98	0.01899398
LRRC57	1.73E-06	-0.759094257	0.52	0.918	0.0296704
OAZ3	4.83E-12	-0.755175915	0.92	1	8.30E-08
CABYR	5.86E-07	-0.715823098	0.3	0.83	0.01005914
RNF138	4.37E-07	-0.68378173	0.78	0.98	0.00750635
FABP9	2.12E-06	-0.674537302	0.78	0.986	0.03639439
BC048671	7.68E-07	-0.660160503	0.14	0.633	0.01317795
SAYSD1	2.34E-06	-0.653522322	0.26	0.714	0.04009159
PRM2	5.14E-12	-0.634087862	1	1	8.82E-08
GSTM5	4.11E-07	-0.571032147	0.9	1	0.00704646
ODF2	2.30E-06	-0.496677053	0.94	1	0.03947121
PRM1	7.70E-08	-0.483133045	1	1	0.00132111
TNP1	2.54E-06	-0.455274276	0.96	1	0.0435675
ALDH1B1	1.91E-09	1.323106807	0.26	0.007	3.28E-05
GAMT	1.67E-06	1.515790894	0.28	0.048	0.02863915
VCAM1	6.02E-07	1.561425914	0.36	0.082	0.01032861
MT-ND1	1.13E-08	1.646770375	0.82	0.592	0.00019323
DEFB19	8.68E-08	1.741567603	0.54	0.218	0.00148924
FADS1	1.86E-10	1.757272791	0.26	0	3.19E-06
CES1D	3.27E-10	1.787964255	0.3	0.014	5.62E-06
TMEM176B	7.09E-08	1.78954431	0.32	0.048	0.00121645
FTH1	2.00E-09	1.794321826	0.78	0.653	3.43E-05
FXVD6	1.17E-08	1.794361556	0.28	0.02	0.00020027
TLE5	1.38E-07	1.806465373	0.42	0.116	0.00236017
AARD	1.25E-06	2.00625989	0.54	0.279	0.02151284
APOC1	1.33E-10	2.202048893	0.48	0.095	2.28E-06
EPHX1	3.76E-13	2.205730246	0.38	0.014	6.45E-09
CD81	1.16E-07	2.22928977	0.4	0.102	0.00199858
CLU	1.14E-09	2.343119427	0.68	0.367	1.95E-05
ACSBG1	5.15E-12	2.464783119	0.46	0.061	8.84E-08
MT-CYTB	7.72E-21	2.474159	0.98	0.803	1.33E-16
MT-ND4	1.88E-19	2.515216998	0.94	0.748	3.23E-15
ALDH2	1.70E-11	2.56712707	0.52	0.109	2.91E-07

LCN2	1.48E-11	2.589011062	0.68	0.265	2.54E-07
CYP11A1	1.23E-18	2.638243903	0.54	0.02	2.10E-14
FABP3	6.60E-11	2.715389241	0.46	0.082	1.13E-06
FADS2	8.71E-13	2.716236009	0.42	0.034	1.50E-08
CST3	1.05E-15	2.740245506	0.78	0.286	1.80E-11
HSD3B6	1.08E-10	2.806454244	0.38	0.041	1.86E-06
ALDH1A1	4.97E-14	2.845604839	0.68	0.211	8.52E-10
GSTM2	3.89E-15	2.917929768	0.72	0.231	6.68E-11
CYP17A1	1.02E-15	2.919693946	0.44	0.014	1.76E-11
AKR1CL	5.13E-17	3.022491348	0.54	0.041	8.80E-13
HBB-BS	1.67E-12	3.308406604	0.36	0.014	2.87E-08
APOE	1.21E-15	3.421553979	0.78	0.313	2.08E-11
AGT	3.64E-14	3.440358448	0.6	0.122	6.25E-10
PTGDS	2.61E-18	3.66363707	0.82	0.313	4.48E-14
GSTM1	2.05E-21	3.777533753	0.92	0.483	3.52E-17

Lista 7 de genes diferencialmente expresados en el cluster de espermátidas redondas medias

Gen	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
4930503B20RIK	5.48E-17	-1.495052101	0.263	0.93	9.40E-13
4930570D08RIK	4.05E-20	-1.453179698	0.015	0.579	6.95E-16
SPATA19	5.67E-13	-1.427431616	0.511	0.93	9.74E-09
PPP1R2-PS7	2.37E-14	-1.360770998	0.226	0.842	4.07E-10
CYLC2	4.93E-14	-1.338718545	0.234	0.86	8.46E-10
SPATA4	2.09E-12	-1.247688743	0.365	0.93	3.58E-08
KLK1B8	1.24E-12	-1.225168656	0.248	0.825	2.12E-08
TNP1	8.48E-18	-1.207731114	0.993	1	1.46E-13
H2AL2A	1.18E-12	-1.171977099	0.387	0.947	2.03E-08
IQCM	9.25E-14	-1.159566686	0.08	0.596	1.59E-09
DYDC2	1.47E-14	-1.133604559	0.175	0.842	2.52E-10
TSACC	1.58E-11	-1.122998542	0.372	0.93	2.72E-07
IQCF1	8.75E-12	-1.117769891	0.409	0.93	1.50E-07
CCDC33	4.84E-12	-1.114075053	0.139	0.684	8.30E-08
2610318N02RIK	1.55E-11	-1.103963984	0.657	0.947	2.66E-07
PRSS58	1.62E-12	-1.100579685	0.234	0.86	2.78E-08
HMGB4	4.37E-13	-1.090895462	0.796	0.982	7.51E-09
CHCHD3	1.80E-12	-1.090720462	0.234	0.877	3.10E-08
1700017L05RIK	1.25E-17	-1.089491496	0.08	0.719	2.15E-13
TEX37	4.97E-10	-1.064140561	0.635	0.947	8.54E-06
KCTD16	1.46E-11	-1.04344612	0.292	0.895	2.50E-07
1700034E13RIK	7.49E-10	-1.043043447	0.387	0.877	1.28E-05

FAM229A	1.29E-11	-1.039024091	0.715	0.965	2.22E-07
ZFAND3	3.49E-10	-1.024995923	0.496	0.965	5.98E-06
TMCO2	5.84E-09	-1.021989035	0.226	0.702	0.00010031
FHL5	8.77E-11	-1.013104901	0.19	0.719	1.51E-06
1700029B22RIK	1.28E-13	-1.009451662	0.131	0.719	2.19E-09
FMN1	8.99E-16	-1.000874057	0.153	0.789	1.54E-11
GM11634	7.80E-10	-0.989229138	0.307	0.895	1.34E-05
CCDC70	1.45E-09	-0.988470383	0.336	0.877	2.48E-05
FAM71F1	4.64E-09	-0.987830851	0.431	0.912	7.96E-05
BC049762	4.42E-11	-0.983157271	0.19	0.719	7.58E-07
1700024P04RIK	4.25E-10	-0.972379333	0.445	0.965	7.29E-06
PSMF1	8.62E-11	-0.96887804	0.635	0.947	1.48E-06
RBM28	2.28E-13	-0.968067244	0.124	0.702	3.91E-09
LKAAEAR1	1.10E-12	-0.963568102	0.234	0.877	1.89E-08
TNP2	3.13E-15	-0.962225181	0.993	1	5.38E-11
ARL 9.00	4.64E-12	-0.95517889	0.139	0.667	7.96E-08
DNAJB9	5.30E-15	-0.946312513	0.08	0.649	9.09E-11
WDR31	1.75E-15	-0.944297485	0.109	0.719	3.00E-11
RIAD1	8.19E-12	-0.940121303	0.226	0.825	1.41E-07
RASA3	7.24E-17	-0.938138729	0.109	0.772	1.24E-12
AI507597	6.90E-10	-0.935836316	0.474	0.912	1.18E-05
2700046G09RIK	1.10E-15	-0.933718933	0.015	0.474	1.89E-11
CTAG2	2.60E-13	-0.932414958	0.204	0.825	4.46E-09
GM16541	1.67E-13	-0.927220396	0.124	0.702	2.86E-09
GM12669	5.82E-10	-0.923960968	0.022	0.333	9.98E-06
C030037D09RIK	1.56E-14	-0.92313072	0.095	0.649	2.67E-10
SMIM24	2.34E-08	-0.915668193	0.599	0.982	0.00040078
IQCF3	7.59E-11	-0.910254443	0.686	0.965	1.30E-06
ISG20	6.78E-17	-0.909496782	0.08	0.684	1.16E-12
CSTL1	1.66E-08	-0.909067493	0.35	0.842	0.00028511
GM5767	1.06E-12	-0.908408074	0.241	0.86	1.82E-08
SPATA24	3.19E-10	-0.902318059	0.715	0.982	5.48E-06
GM9795	1.07E-15	-0.901927313	0.036	0.544	1.83E-11
NOXRED1	5.10E-14	-0.900153853	0.175	0.807	8.76E-10
SRPK2	7.90E-10	-0.897869933	0.299	0.86	1.36E-05
1700011L22RIK	1.49E-13	-0.892883649	0.204	0.877	2.56E-09
CYPT3	2.77E-08	-0.889346582	0.394	0.877	0.00047611
CDC34B	1.04E-17	-0.884977294	0.051	0.632	1.79E-13
ROPN1	3.51E-09	-0.881312904	0.584	0.965	6.02E-05
DNAJB7	8.50E-09	-0.880986474	0.146	0.579	0.00014595

LRRC1	1.25E-10	-0.873362213	0.058	0.456	2.14E-06
PUDP	1.58E-12	-0.866247068	0.095	0.614	2.71E-08
EFCAB3	3.09E-16	-0.863346391	0.102	0.719	5.30E-12
MEIG1	9.80E-10	-0.85819268	0.745	0.982	1.68E-05
CEP295NL	8.19E-09	-0.846510892	0.416	0.895	0.00014054
CEP112	2.62E-10	-0.845908786	0.299	0.877	4.49E-06
GM8730	2.17E-11	-0.842885057	0.029	0.404	3.72E-07
CCDC7A	4.81E-10	-0.834587203	0.139	0.614	8.26E-06
RGSL1	1.63E-08	-0.834474529	0.029	0.316	0.00027988
1700008P02RIK	2.30E-13	-0.833184966	0.175	0.825	3.95E-09
BAZ1A	6.29E-08	-0.831051734	0.022	0.281	0.00107883
GM36423	2.46E-12	-0.830708368	0.212	0.825	4.21E-08
EIF5	6.63E-10	-0.825077776	0.277	0.825	1.14E-05
FRAT1	1.23E-08	-0.823605828	0.204	0.684	0.00021079
STAT4	2.11E-10	-0.823070108	0.263	0.842	3.62E-06
LPIN1	3.14E-10	-0.822096589	0.241	0.825	5.39E-06
TMSB10	5.43E-10	-0.821156855	0.226	0.772	9.31E-06
TASP1	7.02E-13	-0.821087772	0.139	0.719	1.21E-08
CBY3	2.85E-12	-0.816495343	0.153	0.737	4.89E-08
GM4332	7.68E-12	-0.815472622	0.241	0.842	1.32E-07
FAM53C	8.51E-10	-0.808342729	0.255	0.825	1.46E-05
1700034G24RIK	1.50E-10	-0.80325508	0.146	0.632	2.57E-06
ASB1	1.15E-10	-0.801572108	0.226	0.842	1.98E-06
NQO2	7.79E-15	-0.799420664	0.131	0.754	1.34E-10
1700013F07RIK	1.92E-11	-0.798757419	0.197	0.772	3.29E-07
1700020A23RIK	3.14E-10	-0.798144653	0.321	0.895	5.39E-06
GM4665	1.12E-12	-0.793219042	0.19	0.789	1.91E-08
GPRC5B	3.62E-14	-0.789402587	0.117	0.702	6.22E-10
MICAL3	9.12E-10	-0.788803025	0.234	0.772	1.56E-05
HMGB1-RS17	7.25E-09	-0.786321969	0.277	0.807	0.00012445
TBATA	8.71E-12	-0.784843241	0.168	0.754	1.50E-07
ALKBH3	3.19E-12	-0.78364292	0.095	0.596	5.47E-08
KLK1B26	9.25E-16	-0.780263366	0.095	0.702	1.59E-11
DEFB33	4.81E-12	-0.779870803	0.124	0.649	8.26E-08
STPG3	4.42E-14	-0.779615359	0.182	0.842	7.58E-10
GALNTL5	2.45E-08	-0.77654631	0.474	0.93	0.00042018
H2AL1N	3.10E-11	-0.776424918	0.175	0.737	5.32E-07
TESCL	1.69E-13	-0.776362368	0.204	0.86	2.90E-09
ACTRT2	2.79E-07	-0.775251369	0.591	0.947	0.00479224
1700061N14RIK	7.25E-10	-0.773816452	0.102	0.544	1.24E-05

GSTT4	4.82E-07	-0.773362298	0.445	0.93	0.00827288
CEP170	1.03E-11	-0.772912008	0.182	0.789	1.76E-07
CYLC1	4.02E-15	-0.769988986	0.102	0.702	6.90E-11
DPYSL3	7.35E-08	-0.761949341	0.438	0.912	0.00126227
CDC34	1.47E-07	-0.755955368	0.679	0.93	0.00253027
RNF133	1.98E-07	-0.751690151	0.445	0.912	0.00340385
ACTE1	4.29E-09	-0.751502866	0.321	0.895	7.37E-05
MORN4	1.14E-12	-0.749258218	0.058	0.526	1.95E-08
FAM220A	4.07E-11	-0.748409349	0.088	0.561	6.99E-07
WBSCR25	5.93E-09	-0.748061006	0.307	0.895	0.00010174
ASB9	1.40E-12	-0.746980232	0.161	0.772	2.40E-08
TTLL6	1.84E-07	-0.745217121	0.022	0.263	0.00315649
CCDC183	8.42E-16	-0.745118371	0.095	0.719	1.44E-11
PSMA6	6.00E-07	-0.741041162	0.438	0.947	0.01030264
HAUS4	2.50E-06	-0.740153891	0.08	0.368	0.04287123
GM6472	1.34E-10	-0.738675154	0.044	0.421	2.30E-06
EIF1-PS1	7.22E-14	-0.737238028	0.073	0.579	1.24E-09
EHBP1L1	4.87E-12	-0.737227459	0.095	0.596	8.35E-08
ACOT7	5.72E-09	-0.737020126	0.416	0.965	9.83E-05
FAM243	4.89E-12	-0.732354749	0.19	0.772	8.39E-08
4930592I03RIK	1.31E-13	-0.731832824	0.08	0.614	2.25E-09
1700052I22RIK	8.27E-15	-0.731186642	0.066	0.614	1.42E-10
TMCO5	1.52E-08	-0.726443034	0.27	0.772	0.00026012
USP2	1.49E-07	-0.725245441	0.431	0.895	0.00255609
CYP2A12	1.07E-17	-0.721689952	0.08	0.719	1.84E-13
CDRT4	9.15E-07	-0.719689529	0.482	0.93	0.01569831
CDKN1C	3.08E-10	-0.718699205	0.19	0.719	5.28E-06
AY702102	7.87E-10	-0.718413642	0.066	0.439	1.35E-05
SNRPD2	1.03E-09	-0.717554453	0.212	0.754	1.77E-05
SAMD4	2.50E-07	-0.717228994	0.358	0.877	0.00429557
ARL2BP	2.86E-06	-0.71635282	0.606	0.93	0.04904073
AIF1	9.14E-07	-0.715846879	0.606	0.947	0.01568716
RMDN2	2.51E-10	-0.713975095	0.131	0.632	4.31E-06
COMMD3	7.96E-10	-0.713527403	0.044	0.404	1.37E-05
GM4875	2.11E-10	-0.713083645	0.058	0.456	3.62E-06
EVA1C	1.91E-11	-0.71126893	0.058	0.491	3.27E-07
BTG1	1.55E-13	-0.711070698	0.102	0.667	2.65E-09
PKIB	1.15E-08	-0.710865445	0.365	0.93	0.0001981
4930449C09RIK	3.44E-08	-0.709293331	0.358	0.912	0.00059076
ADAM3	1.33E-07	-0.706060761	0.387	0.912	0.00228138

H1FNT	9.30E-08	-0.703776372	0.796	0.982	0.00159686
PRDX4	1.74E-08	-0.702569476	0.314	0.86	0.00029907
MICOS13	5.02E-08	-0.701449183	0.474	0.965	0.00086158
FABP12	8.18E-14	-0.700234306	0.146	0.754	1.40E-09
BC048562	4.21E-16	-0.696682857	0.036	0.561	7.23E-12
SPCS1	5.27E-09	-0.692497409	0.255	0.825	9.05E-05
GM4366	1.11E-12	-0.691812458	0.095	0.614	1.91E-08
ARMC12	1.77E-07	-0.688259047	0.358	0.86	0.00303167
CCDC54	1.25E-06	-0.687657608	0.46	0.947	0.02144319
CCDC198	5.67E-13	-0.681627218	0.08	0.596	9.73E-09
SVIP	8.89E-09	-0.679209351	0.336	0.93	0.00015259
BPIFA3	9.47E-08	-0.677998679	0.328	0.807	0.00162609
CCDC189	5.72E-12	-0.677300326	0.248	0.895	9.81E-08
IFT172	6.60E-09	-0.673285657	0.372	0.93	0.00011333
MCM7	1.32E-07	-0.672986505	0.051	0.351	0.00226487
1700012B07RIK	1.76E-07	-0.672979234	0.38	0.877	0.00302453
LARP1B	6.56E-12	-0.672496898	0.131	0.702	1.13E-07
CPXM1	9.00E-10	-0.670276248	0.051	0.421	1.54E-05
1700084D21RIK	3.36E-13	-0.669614758	0.029	0.456	5.77E-09
TMIGD3	3.95E-07	-0.669528027	0.08	0.404	0.00677725
1700013G24RIK	7.41E-07	-0.668573673	0.664	0.965	0.01272136
LIAS	4.39E-14	-0.666366072	0.022	0.456	7.54E-10
PRSS52	9.46E-08	-0.665623857	0.153	0.579	0.00162296
LELP1	8.41E-07	-0.663056353	0.467	0.877	0.01443248
GM49462	4.81E-10	-0.661795217	0	0.263	8.26E-06
CNTNAP5B	6.47E-10	-0.66147855	0.124	0.614	1.11E-05
FAM71A	2.50E-09	-0.659975672	0.058	0.421	4.29E-05
TMEM191C	2.18E-09	-0.655481864	0.307	0.877	3.75E-05
4930570E03RIK	1.79E-09	-0.655291771	0.066	0.439	3.06E-05
CTBP2	4.78E-08	-0.653595113	0.022	0.281	0.00081967
USP50	3.08E-08	-0.652330898	0.277	0.825	0.00052788
AC166172.1	1.54E-10	-0.651846597	0.102	0.579	2.64E-06
GM13539	3.68E-12	-0.651658522	0.007	0.351	6.32E-08
DNAJB3	4.13E-07	-0.650370545	0.774	0.965	0.00709657
GM47819	3.63E-12	-0.64966063	0.08	0.561	6.23E-08
1700003F12RIK	3.58E-08	-0.649277289	0.788	0.965	0.00061386
CDV3-PS	5.16E-11	-0.646747143	0.044	0.439	8.85E-07
MTRF1	6.13E-07	-0.645764585	0.365	0.86	0.01051588
CFAP57	5.30E-09	-0.641600133	0.007	0.263	9.10E-05
IZUMO3	1.51E-13	-0.64130183	0.102	0.667	2.58E-09

GM17202	6.50E-11	-0.640363673	0.007	0.316	1.12E-06
SPAG17	1.65E-12	-0.640177978	0.124	0.667	2.83E-08
1700010D01RIK	1.01E-13	-0.638120738	0.08	0.614	1.74E-09
SPATC1	1.84E-08	-0.63630395	0.314	0.895	0.00031565
MCU	1.52E-12	-0.63619672	0.051	0.491	2.62E-08
4930505A04RIK	2.39E-11	-0.63525511	0.153	0.702	4.11E-07
BCL2L14	4.61E-08	-0.625839663	0.336	0.86	0.000792
1700061F12RIK	2.69E-12	-0.625728353	0.022	0.404	4.62E-08
TXNDC8	1.41E-10	-0.62256732	0.175	0.719	2.42E-06
4930448K20RIK	1.40E-11	-0.622552276	0.08	0.561	2.40E-07
CDKL3	1.24E-08	-0.621961736	0.234	0.772	0.00021343
LRRC43	8.92E-11	-0.618139477	0.124	0.632	1.53E-06
PIFO	1.36E-12	-0.617630858	0.051	0.509	2.34E-08
SRXN1	9.20E-12	-0.616988959	0.124	0.649	1.58E-07
TEX30	2.71E-07	-0.616892533	0.263	0.789	0.00464802
MGAT4E	1.10E-10	-0.613978854	0.058	0.474	1.89E-06
PACRG	9.11E-09	-0.613742763	0.234	0.737	0.00015635
TMEM269	8.75E-13	-0.607115337	0.007	0.368	1.50E-08
1700031M16RIK	1.15E-06	-0.606524296	0.474	0.877	0.01979112
4930486I03RIK	5.17E-10	-0.605212	0.036	0.386	8.88E-06
UQCC1	6.75E-11	-0.603322346	0.029	0.386	1.16E-06
GM20163	1.68E-08	-0.602210532	0.029	0.316	0.0002883
PDCD5-PS	4.77E-10	-0.6002915	0.066	0.474	8.19E-06
LPP	2.38E-07	-0.600152276	0.27	0.789	0.00408874
THEGL	9.60E-07	-0.600070476	0.358	0.825	0.01648077
9130023H24RIK	3.82E-12	-0.599874074	0.007	0.351	6.56E-08
MORN3	4.06E-08	-0.599239861	0.328	0.877	0.00069702
DSCAML1	5.33E-13	-0.598539041	0.022	0.421	9.14E-09
GM4984	2.81E-13	-0.597786248	0.08	0.596	4.83E-09
FAM221B	6.41E-10	-0.597629338	0.226	0.789	1.10E-05
CCDC28A	3.29E-08	-0.597259277	0.248	0.754	0.00056492
1700057G04RIK	1.28E-11	-0.595658069	0.139	0.702	2.20E-07
NAA60	2.39E-10	-0.593534123	0.19	0.754	4.11E-06
1700015F17RIK	1.65E-06	-0.591907322	0.328	0.825	0.02839159
SPATA25	2.29E-12	-0.590875361	0.088	0.596	3.93E-08
1700019M22RIK	4.17E-12	-0.58924568	0.117	0.649	7.16E-08
GM9843	6.16E-09	-0.588874361	0.226	0.754	0.0001057
GM8566	8.45E-14	-0.588634643	0.058	0.561	1.45E-09
ZDBF2	3.96E-08	-0.587708241	0.292	0.825	0.00067904
RAB3IL1	4.96E-09	-0.586905403	0.27	0.825	8.51E-05

GDPD1	2.44E-08	-0.586650687	0.307	0.842	0.00041811
GM40709	1.02E-06	-0.5837255	0.029	0.263	0.0174891
PPP3R2	2.42E-10	-0.583570446	0.219	0.825	4.15E-06
CPTP	2.40E-10	-0.582460291	0.117	0.596	4.12E-06
TMEM64	9.67E-11	-0.582122867	0.168	0.702	1.66E-06
4930511M06RIK	1.76E-13	-0.58176136	0.007	0.386	3.03E-09
CDCA2	1.31E-09	-0.581267639	0.212	0.789	2.25E-05
1700018B08RIK	2.23E-07	-0.579182642	0.255	0.737	0.00383155
1700109G14RIK	3.17E-11	-0.577913488	0.109	0.614	5.45E-07
LPCAT3	4.06E-13	-0.57770923	0.102	0.667	6.97E-09
SMKR-PS	4.94E-10	-0.577587087	0.226	0.825	8.48E-06
LY6K	3.56E-11	-0.577116151	0.073	0.509	6.12E-07
CDIPTOS	1.53E-06	-0.575324811	0.752	1	0.02620794
ZFP704	1.49E-10	-0.572856548	0.051	0.439	2.55E-06
BZW1	1.42E-08	-0.572471324	0.263	0.825	0.00024438
4921539E11RIK	5.67E-11	-0.571113759	0.124	0.632	9.73E-07
4930413G21RIK	1.40E-14	-0.570077708	0.124	0.754	2.40E-10
ITSN2	2.53E-09	-0.569950779	0.109	0.544	4.34E-05
FAM110A	1.30E-09	-0.568554372	0.204	0.789	2.23E-05
TEPP	2.66E-06	-0.567855861	0.387	0.86	0.04561627
1700100L14RIK	3.02E-11	-0.566579499	0.109	0.614	5.18E-07
ACSL5	2.26E-14	-0.566364591	0.036	0.509	3.89E-10
4930406D18RIK	9.06E-15	-0.56443814	0.058	0.579	1.56E-10
RPL37	2.48E-15	-0.562950911	0.088	0.684	4.26E-11
CCIN	1.23E-09	-0.561970927	0.124	0.596	2.11E-05
RCC1	3.16E-07	-0.561369008	0.307	0.842	0.0054176
1700034J05RIK	7.23E-08	-0.559816209	0.117	0.526	0.0012403
PTTG1IP	1.08E-07	-0.558729609	0.277	0.754	0.00186167
1700003O11RIK	1.11E-11	-0.558578474	0.058	0.491	1.90E-07
PDZK1IP1	5.47E-07	-0.556266257	0.058	0.351	0.00939065
OSBPL1A	7.55E-08	-0.555633124	0.131	0.544	0.00129569
1700016P04RIK	1.79E-07	-0.555626153	0.372	0.877	0.00307533
LRRC27	8.81E-08	-0.555370513	0.277	0.789	0.0015116
EIF1	1.62E-09	-0.554892116	0.241	0.807	2.77E-05
1700009J07RIK	7.17E-08	-0.554172216	0.336	0.895	0.00123075
4933421O10RIK	1.76E-08	-0.55376427	0.255	0.789	0.00030127
4932412D23RIK	1.10E-06	-0.553032279	0.036	0.281	0.01896075
TUBB4B	6.09E-07	-0.55265591	0.416	0.877	0.01044527
MAGI1	1.25E-11	-0.549763067	0.022	0.386	2.14E-07
1700066J03RIK	4.59E-10	-0.548979101	0.036	0.386	7.88E-06

CCDC57	5.14E-08	-0.546245353	0.307	0.842	0.00088151
PRM2	3.55E-14	-0.545698535	1	1	6.08E-10
4933407I05RIK	1.62E-11	-0.545172596	0.073	0.526	2.78E-07
5033406O09RIK	5.66E-11	-0.544865299	0.022	0.368	9.71E-07
ASB12	2.69E-08	-0.544849076	0.029	0.316	0.00046162
TMOD4	5.58E-11	-0.544830872	0.029	0.386	9.58E-07
1700029F12RIK	2.64E-06	-0.544427543	0.504	0.982	0.04538948
BTBD9	3.42E-09	-0.544123623	0.066	0.439	5.86E-05
1700030C14RIK	2.14E-11	-0.543158953	0.109	0.632	3.66E-07
HYPM	6.82E-07	-0.539251758	0.35	0.877	0.01170956
FSCN3	1.74E-09	-0.539051295	0.27	0.86	2.98E-05
R3HCC1	1.11E-09	-0.537993418	0.088	0.509	1.91E-05
GM16226	1.43E-08	-0.536646517	0.241	0.789	0.00024483
FAM83E	2.97E-10	-0.534922964	0.117	0.596	5.09E-06
DNAJC5B	3.65E-07	-0.533726126	0.401	0.947	0.00626687
DNAJC7	1.04E-07	-0.533075464	0.226	0.737	0.00178953
TEX50	2.24E-13	-0.532477174	0.051	0.526	3.84E-09
4930589P08RIK	1.95E-09	-0.532123689	0.146	0.632	3.35E-05
IPO13	1.38E-10	-0.531956679	0.088	0.544	2.37E-06
1700016A09RIK	1.66E-13	-0.531561952	0.044	0.509	2.85E-09
GSTCD	2.51E-09	-0.53149878	0.051	0.404	4.31E-05
1700125H03RIK	1.81E-13	-0.531033014	0.051	0.526	3.10E-09
1700008B11RIK	2.99E-12	-0.530913191	0.109	0.649	5.14E-08
4933400A11RIK	2.62E-11	-0.530347356	0.029	0.404	4.50E-07
IFITM7	1.09E-06	-0.529183524	0.058	0.333	0.01868321
UBQLNL	1.47E-06	-0.528846356	0.292	0.789	0.02514731
TTLL10	9.64E-08	-0.524459968	0.328	0.86	0.00165455
ALDOART1	1.39E-08	-0.524234211	0.204	0.719	0.00023896
1700015O11RIK	6.05E-10	-0.522318777	0.015	0.316	1.04E-05
CCSAP	3.28E-07	-0.521917782	0.328	0.877	0.00562315
JAZF1	1.73E-08	-0.521891306	0.219	0.737	0.00029717
GM10120	4.09E-11	-0.520490245	0.015	0.351	7.02E-07
0610009L18RIK	2.30E-14	-0.519889055	0.146	0.807	3.95E-10
H2AL1M	1.48E-10	-0.517684274	0.015	0.333	2.54E-06
GM136	3.47E-08	-0.516824684	0.212	0.719	0.00059545
RNF41	1.25E-07	-0.515642317	0.095	0.456	0.00214962
CYSTM1	5.41E-07	-0.514530751	0.343	0.912	0.00928986
EIF4A2	2.18E-11	-0.513411286	0.095	0.579	3.73E-07
PDCL2	2.89E-07	-0.512992298	0.38	0.877	0.00495318
SPANXN4	2.91E-13	-0.512027071	0.044	0.509	5.00E-09

TEX26	6.46E-09	-0.511762404	0.066	0.439	0.00011089
4930428D20RIK	1.14E-13	-0.511248691	0.036	0.491	1.95E-09
GM13605	6.60E-09	-0.510489669	0.036	0.351	0.00011326
NACA	6.52E-12	-0.509072747	0.051	0.474	1.12E-07
1700095K22RIK	2.07E-08	-0.507550979	0.029	0.316	0.00035452
IZUMO1	5.22E-09	-0.507178707	0.022	0.316	8.95E-05
TNFAIP2	3.96E-08	-0.506820227	0.044	0.351	0.00068006
GM4535	6.47E-10	-0.504038635	0.015	0.316	1.11E-05
GLRX2	6.45E-09	-0.503144852	0.226	0.807	0.00011062
INSIG1	1.20E-06	-0.498766246	0.036	0.281	0.02051816
NDRG3	4.28E-12	-0.498658477	0.109	0.649	7.35E-08
1700016P03RIK	3.21E-11	-0.497951976	0.015	0.351	5.52E-07
KLK1B3	4.38E-11	-0.496794637	0.015	0.351	7.52E-07
MRRF	2.51E-09	-0.496619517	0.051	0.404	4.31E-05
1700001C02RIK	8.24E-07	-0.49421151	0.372	0.912	0.01413519
RPLP2	5.99E-11	-0.49145721	0.036	0.421	1.03E-06
CFAP126	6.26E-09	-0.491433493	0.131	0.596	0.00010748
FAM122C	1.59E-10	-0.48939012	0.073	0.509	2.73E-06
LIN7A	7.06E-08	-0.488930206	0.153	0.614	0.00121218
FAM227A	1.39E-08	-0.486502269	0.051	0.386	0.00023784
RNF148	4.37E-10	-0.486012043	0.088	0.526	7.49E-06
1700023F06RIK	7.98E-10	-0.485505721	0.102	0.544	1.37E-05
GM6960	6.40E-12	-0.484869582	0.015	0.368	1.10E-07
1700025F22RIK	9.29E-13	-0.481175082	0.036	0.474	1.59E-08
GLB1L3	5.09E-07	-0.478658066	0.058	0.351	0.00874107
ZFP474	1.02E-10	-0.477844186	0.095	0.561	1.75E-06
GM12462	1.30E-09	-0.476880321	0.007	0.281	2.23E-05
EFCAB10	8.54E-08	-0.476720091	0.036	0.316	0.00146541
4930513L16RIK	1.86E-14	-0.476479078	0.036	0.509	3.19E-10
IGF2BP3	4.89E-08	-0.475776674	0.255	0.789	0.00083906
FGF14	7.40E-10	-0.474496542	0.015	0.316	1.27E-05
PFKFB3	7.50E-14	-0.471859902	0.044	0.526	1.29E-09
ZBBX	4.22E-10	-0.471778183	0.19	0.772	7.23E-06
R3HDM1	3.53E-07	-0.471136675	0.102	0.456	0.00606228
PTPMT1	5.39E-07	-0.466862555	0.307	0.877	0.00925539
MAPK6	2.23E-11	-0.46648497	0.146	0.719	3.83E-07
RAB3IP	2.90E-12	-0.464605827	0.124	0.702	4.98E-08
CLK4	1.93E-08	-0.463100483	0.066	0.421	0.00033097
SCFD2	1.62E-10	-0.462853447	0.036	0.404	2.78E-06
BRPF3	1.08E-11	-0.461970168	0.036	0.439	1.86E-07

1700016C15RIK	1.54E-08	-0.461965954	0.19	0.702	0.00026353
1700018A23RIK	9.09E-10	-0.461426968	0.007	0.281	1.56E-05
GM31752	1.42E-08	-0.460988846	0.022	0.298	0.00024431
DCUN1D3	2.66E-10	-0.460459059	0.19	0.772	4.56E-06
LMNTD1	2.95E-08	-0.460341419	0.08	0.456	0.00050633
DNALI1	1.70E-09	-0.458938199	0.204	0.737	2.92E-05
MAN1A2	1.26E-07	-0.456888186	0.044	0.333	0.00215892
LEXM	5.47E-10	-0.456783949	0.197	0.754	9.39E-06
ITGAE	4.33E-10	-0.455467985	0.051	0.439	7.44E-06
SLC30A4	6.65E-10	-0.455083246	0.234	0.825	1.14E-05
GM16726	4.90E-13	-0.454537425	0.015	0.404	8.40E-09
SORBS3	1.66E-08	-0.453141944	0.109	0.526	0.0002846
ACSBG2	2.15E-08	-0.451657448	0.204	0.702	0.00036984
H1FX	5.13E-11	-0.450887807	0.088	0.561	8.81E-07
PFN5	4.11E-13	-0.450482229	0.051	0.526	7.05E-09
FKBPL	3.90E-10	-0.450426626	0.204	0.789	6.70E-06
KBTBD11	2.64E-10	-0.449709591	0.073	0.491	4.53E-06
ZFP451	2.46E-10	-0.449345428	0.036	0.404	4.22E-06
4930455C13RIK	2.88E-09	-0.448775386	0.015	0.298	4.94E-05
4930518J20RIK	7.85E-12	-0.445840718	0.095	0.614	1.35E-07
1700095B10RIK	7.05E-14	-0.445676462	0.058	0.561	1.21E-09
MAPK1IP1L	2.41E-07	-0.445603297	0.022	0.263	0.00413312
4930442L01RIK	2.10E-11	-0.445278879	0.117	0.632	3.60E-07
RNF24	4.48E-10	-0.444113848	0.102	0.561	7.69E-06
GM5941	4.37E-08	-0.443701786	0.124	0.526	0.00074983
TEX46	2.71E-12	-0.442062843	0.146	0.702	4.65E-08
FBXO39	2.29E-09	-0.440788521	0.117	0.561	3.93E-05
CHID1	1.55E-09	-0.440326729	0.058	0.439	2.67E-05
PRM1	1.54E-08	-0.440142356	1	1	0.00026509
GM15756	1.19E-09	-0.438203877	0.226	0.772	2.04E-05
1700020G17RIK	1.14E-10	-0.438065264	0.146	0.684	1.96E-06
EIF1AX	4.36E-07	-0.43583307	0.248	0.737	0.00747675
E330034G19RIK	8.39E-07	-0.432588309	0.029	0.263	0.01440231
RSBN1	1.04E-11	-0.431486063	0.015	0.368	1.79E-07
JUND	1.40E-11	-0.430163086	0.168	0.772	2.40E-07
LUZP1	1.26E-08	-0.428027833	0.204	0.754	0.00021669
TLE3	4.00E-09	-0.426087838	0.197	0.737	6.86E-05
1700013M08RIK	2.85E-08	-0.424179113	0.029	0.316	0.00048938
DNAJB4	1.69E-06	-0.42261485	0.285	0.789	0.02906323
4930413F20RIK	4.08E-09	-0.422594253	0.073	0.456	7.01E-05

1700072B07RIK	4.38E-11	-0.421315455	0.015	0.351	7.52E-07
GM16159	1.05E-06	-0.4181142	0.029	0.263	0.01797901
TMEM151A	9.30E-09	-0.417532169	0.036	0.351	0.00015967
GM28411	2.32E-09	-0.416255162	0.036	0.368	3.98E-05
LYZL4OS	1.38E-09	-0.413741495	0.022	0.333	2.37E-05
ERO1LB	4.12E-08	-0.410549517	0.058	0.386	0.00070738
1700063H06RIK	3.26E-10	-0.410292024	0.007	0.298	5.60E-06
ADCY10	3.20E-09	-0.409634872	0.131	0.596	5.48E-05
BC048507	2.35E-08	-0.409291577	0.292	0.877	0.00040369
SRPK1	1.94E-08	-0.409190048	0.182	0.684	0.0003336
MRPL54	7.54E-07	-0.408944141	0.263	0.754	0.01293771
DNAJC18	9.22E-09	-0.408617268	0.182	0.684	0.00015822
MAP2	2.30E-11	-0.408544304	0.109	0.632	3.95E-07
IQCF5	2.61E-08	-0.408530413	0.277	0.842	0.00044835
GM14857	3.50E-07	-0.40832082	0.088	0.421	0.00601075
4933417A18RIK	7.33E-08	-0.407790163	0.073	0.421	0.00125857
GM15104	6.20E-10	-0.407137773	0.161	0.684	1.06E-05
KCNIP2	1.69E-09	-0.405998438	0.029	0.351	2.91E-05
FANK1	2.68E-07	-0.404946825	0.219	0.719	0.00459834
BC061195	5.85E-11	-0.404706555	0.022	0.368	1.00E-06
LNPBK	3.53E-08	-0.402247885	0.146	0.596	0.00060629
CHD5	5.23E-07	-0.39977743	0.153	0.561	0.00896958
DNAAF3	3.47E-10	-0.398566735	0.051	0.439	5.95E-06
CCDC50	6.51E-07	-0.397344075	0.255	0.772	0.01117796
PPP2R5A	1.13E-07	-0.397109687	0.044	0.333	0.00194268
DDA1	2.15E-06	-0.396572763	0.292	0.807	0.03694127
LRRC46	1.07E-07	-0.395557647	0.328	0.895	0.00183378
AARS2	5.26E-10	-0.394907909	0.168	0.719	9.02E-06
SPPL2C	2.16E-06	-0.394877023	0.328	0.86	0.0370269
4930503L19RIK	4.66E-10	-0.394734438	0.058	0.456	8.00E-06
2010109A12RIK	3.03E-08	-0.394260891	0.073	0.421	0.0005204
ASNS	6.79E-07	-0.393576896	0.131	0.509	0.01165119
EFCAB6	1.70E-06	-0.393147581	0.255	0.719	0.02913937
4931422A03RIK	1.38E-09	-0.393103646	0.022	0.333	2.37E-05
CD96	2.32E-08	-0.389607218	0.029	0.316	0.00039875
1700120K04RIK	5.31E-09	-0.386887377	0.168	0.684	9.11E-05
ELL2	3.75E-10	-0.386157927	0.058	0.456	6.44E-06
4933402J07RIK	1.95E-08	-0.385374812	0.328	0.877	0.00033485
ULK4	7.81E-08	-0.385034839	0.102	0.491	0.00134102
BCO1	1.55E-09	-0.384970944	0.058	0.439	2.67E-05

POMT1	3.72E-07	-0.384663185	0.029	0.281	0.00638504
1700019L13RIK	9.59E-07	-0.383687237	0.234	0.719	0.01646605
TCEA2	3.63E-10	-0.383306922	0.175	0.737	6.22E-06
BRSK2	2.09E-06	-0.382429358	0.051	0.316	0.03581841
GM11149	7.10E-08	-0.382288114	0.022	0.281	0.00121803
4921536K21RIK	1.77E-07	-0.38221165	0.248	0.772	0.00303463
GM38132	9.27E-08	-0.38159628	0.029	0.298	0.00159119
GM44649	3.78E-08	-0.381295638	0.015	0.263	0.0006493
TBC1D14	5.87E-12	-0.381138237	0.08	0.579	1.01E-07
APOH	1.92E-10	-0.38013066	0.066	0.474	3.30E-06
AQP7	8.99E-09	-0.379435177	0.153	0.649	0.00015427
COP55	1.66E-12	-0.378137058	0.08	0.596	2.85E-08
SLAIN2	3.38E-09	-0.378099063	0.212	0.789	5.80E-05
4932414N04RIK	1.64E-06	-0.377992691	0.036	0.281	0.02807035
4930414N06RIK	4.35E-10	-0.377825493	0.109	0.579	7.47E-06
BCL2L11	5.18E-11	-0.376416056	0.095	0.579	8.89E-07
DNAJB14	2.36E-09	-0.375898334	0.204	0.754	4.05E-05
4930555F03RIK	4.81E-10	-0.375689057	0	0.263	8.26E-06
ST8SIA3OS	3.17E-10	-0.375570885	0.022	0.351	5.43E-06
TRIM45	1.85E-10	-0.375505981	0.044	0.421	3.17E-06
TMC5	1.19E-07	-0.375267087	0.036	0.316	0.0020386
FAM193A	1.83E-06	-0.374543704	0.124	0.491	0.03141506
SDC2	7.94E-14	-0.373011941	0.051	0.544	1.36E-09
GM7568	3.43E-08	-0.37111481	0.015	0.263	0.00058895
IPO4	5.29E-09	-0.370247981	0.139	0.614	9.07E-05
G6PC3	2.28E-09	-0.369726062	0.168	0.719	3.92E-05
4930548J01RIK	4.06E-09	-0.369580627	0.102	0.526	6.96E-05
FTO	4.56E-08	-0.369011976	0.088	0.456	0.00078243
GM16279	9.10E-11	-0.368558944	0.036	0.404	1.56E-06
AFG3L1	6.16E-07	-0.368239813	0.117	0.491	0.01057717
ACBD6	8.53E-07	-0.367908764	0.241	0.737	0.0146449
KLC3	2.40E-07	-0.367201865	0.095	0.456	0.0041188
YPEL1	4.02E-07	-0.366379623	0.299	0.895	0.00690112
IP6K1	1.96E-09	-0.366071408	0.175	0.702	3.36E-05
CCDC169	6.04E-13	-0.366052624	0.109	0.667	1.04E-08
B330016D10RIK	3.63E-12	-0.364217016	0.051	0.491	6.24E-08
GM29508	9.57E-09	-0.36278945	0.036	0.351	0.00016429
METTL26	2.32E-07	-0.362189897	0.088	0.439	0.00398051
LYPD4	3.30E-07	-0.359927848	0.19	0.649	0.00566647
RFFL	3.56E-07	-0.359773558	0.226	0.719	0.00610738

GM49048	2.63E-12	-0.358185904	0.073	0.561	4.51E-08
YOD1	3.66E-09	-0.357983843	0.19	0.737	6.28E-05
ACTRT1	1.88E-10	-0.356792479	0.036	0.404	3.23E-06
SCP2D1	1.02E-06	-0.356769145	0.248	0.737	0.01758372
CEP350	2.41E-10	-0.355474926	0.051	0.439	4.13E-06
TEX22	3.52E-09	-0.355178069	0.168	0.684	6.05E-05
1700022H01RIK	2.49E-12	-0.354446598	0.073	0.561	4.27E-08
4930432J09RIK	6.95E-08	-0.35355814	0.029	0.298	0.00119248
GPANK1	4.90E-08	-0.351908702	0.073	0.421	0.00084128
ADIG	1.02E-09	-0.349340618	0.095	0.544	1.76E-05
GM44419	3.54E-07	-0.34904306	0.051	0.333	0.00608412
TTLL13	3.52E-09	-0.348743255	0.175	0.684	6.05E-05
GM28496	2.82E-08	-0.348720219	0.015	0.263	0.00048415
FBXW10	5.38E-07	-0.347973934	0.131	0.509	0.00923874
1700003E24RIK	1.61E-12	-0.347962405	0.088	0.596	2.77E-08
1700025M24RIK	3.48E-09	-0.347954641	0.036	0.368	5.97E-05
GM14285	2.65E-11	-0.347021984	0.131	0.684	4.54E-07
1700017D01RIK	1.38E-09	-0.346733336	0.19	0.754	2.36E-05
GRIP1OS1	5.27E-07	-0.346363047	0.051	0.333	0.00905283
GM4202	3.23E-07	-0.345898733	0.029	0.281	0.00554856
ING1	1.52E-06	-0.345895792	0.102	0.439	0.02610795
ZSWIM7	1.01E-07	-0.34365301	0.036	0.316	0.00172916
ATP6AP1L	2.31E-09	-0.343504945	0.058	0.439	3.97E-05
1700029M20RIK	1.89E-06	-0.343291831	0.044	0.298	0.03236015
TRAPPC2L	7.07E-11	-0.343235508	0.146	0.684	1.21E-06
4930507D10RIK	5.37E-09	-0.340756308	0.029	0.333	9.21E-05
FBXO44	1.40E-09	-0.340715306	0.117	0.596	2.40E-05
GM15350	6.70E-08	-0.339827529	0.066	0.404	0.00115072
RNF151	4.27E-07	-0.337022529	0.314	0.842	0.00733057
4930404N11RIK	3.86E-11	-0.335423935	0.058	0.491	6.62E-07
CCDC93	3.06E-07	-0.335182105	0.036	0.298	0.00525904
PATJ	1.67E-11	-0.332908901	0.073	0.526	2.86E-07
PLEKHO2	7.60E-09	-0.330914912	0.131	0.596	0.00013037
SAXO1OS	9.76E-08	-0.328729879	0.058	0.368	0.00167463
ZFP91	6.18E-11	-0.326926407	0.095	0.579	1.06E-06
GM27211	7.57E-08	-0.32619488	0.066	0.404	0.00129848
OXCT1	1.53E-06	-0.32561499	0.051	0.316	0.02622985
GM16015	7.79E-11	-0.325163582	0.007	0.316	1.34E-06
A730035I17RIK	1.16E-09	-0.325062764	0.058	0.439	1.99E-05
GM34358	5.12E-09	-0.324159826	0.007	0.263	8.78E-05

SCLT1	6.29E-09	-0.323012673	0.146	0.632	0.00010795
GRAMD2	3.11E-11	-0.322917229	0.073	0.526	5.34E-07
TCP10A	1.77E-11	-0.322681953	0.051	0.474	3.04E-07
CEP128	1.28E-10	-0.322473675	0.088	0.561	2.20E-06
CDC14B	3.84E-09	-0.321274972	0.153	0.649	6.59E-05
GM10308	6.74E-09	-0.320736552	0.051	0.386	0.00011564
CAPRIN1	1.88E-06	-0.320360583	0.095	0.421	0.03219595
GM31166	2.68E-07	-0.3187495	0.066	0.386	0.00459754
TMEM60	1.28E-06	-0.318428527	0.117	0.474	0.02200901
GM5460	2.09E-09	-0.317438041	0.029	0.351	3.59E-05
GM30853	2.12E-07	-0.317304426	0.088	0.439	0.00364591
NTM	4.27E-12	-0.317077306	0.007	0.351	7.32E-08
1700001K23RIK	2.62E-13	-0.316050035	0.022	0.439	4.50E-09
SUDS3	1.77E-06	-0.314843634	0.212	0.649	0.03037421
TCEAL1	1.43E-06	-0.313594124	0.044	0.298	0.02459786
1700036G14RIK	8.01E-08	-0.313487773	0.022	0.281	0.00137456
1810044D09RIK	1.39E-08	-0.310571997	0.131	0.579	0.00023937
1700008N11RIK	1.58E-06	-0.310337117	0.044	0.298	0.02718679
SOX5OS3	2.09E-07	-0.309721667	0.058	0.368	0.00359198
MIPEP	1.00E-06	-0.309413835	0.255	0.719	0.01716165
COX8C	3.37E-10	-0.309213234	0.08	0.526	5.78E-06
1700007P06RIK	4.94E-07	-0.308480149	0.044	0.316	0.00848624
1700030J22RIK	2.06E-06	-0.308339437	0.277	0.754	0.03528865
CCDC181	1.00E-06	-0.307962134	0.263	0.772	0.01722642
MEX3B	6.70E-08	-0.307945918	0.066	0.404	0.00115072
4930572K03RIK	6.78E-07	-0.307663266	0.058	0.351	0.01163079
ERC1	2.44E-07	-0.306733355	0.029	0.281	0.00418139
SH2B3	8.87E-07	-0.306459984	0.029	0.263	0.01522615
MBD3L1	6.41E-11	-0.306364758	0.088	0.544	1.10E-06
MICAL2	1.63E-07	-0.30596476	0.153	0.579	0.00279527
SIAH2	2.67E-08	-0.305684047	0.226	0.754	0.00045835
1700031P21RIK	5.58E-08	-0.305277587	0.182	0.632	0.00095753
1700067K01RIK	2.63E-08	-0.305206732	0.102	0.509	0.00045099
1700024G13RIK	1.87E-10	-0.304170439	0.175	0.719	3.22E-06
TGOLN1	9.01E-08	-0.303615723	0.029	0.298	0.00154613
ZNHIT1	3.52E-10	-0.303466206	0.153	0.702	6.04E-06
SORT1	7.79E-11	-0.302625149	0.117	0.632	1.34E-06
MTX1	3.79E-08	-0.302534283	0.197	0.702	0.00064998
PLA2G2C	3.26E-11	-0.301653562	0.058	0.491	5.60E-07
ZNRD1AS	1.09E-07	-0.301594789	0.182	0.649	0.00186567

1700084F23RIK	5.40E-08	-0.3010003	0.022	0.281	0.00092639
ABHD16B	4.62E-09	-0.300225928	0.175	0.702	7.93E-05
4930519H02RIK	4.45E-08	-0.299795504	0.015	0.263	0.00076343
PLB1	4.19E-09	-0.299618785	0.066	0.439	7.20E-05
DGKH	6.90E-10	-0.298928239	0.044	0.404	1.18E-05
VWA3A	1.14E-09	-0.298537582	0.109	0.579	1.95E-05
GM18899	4.81E-10	-0.297536418	0	0.263	8.26E-06
TEX52	4.86E-08	-0.297151264	0.08	0.439	0.00083371
FEM1C	8.46E-08	-0.297133683	0.168	0.614	0.00145237
VHL	7.58E-08	-0.296869154	0.27	0.825	0.00130147
1700065J18RIK	2.97E-09	-0.295231717	0.015	0.298	5.10E-05
EIF3L	2.06E-08	-0.29293681	0.022	0.298	0.00035392
HAGLR	1.74E-06	-0.292816704	0.088	0.386	0.02990791
PRSS54	3.72E-08	-0.292080816	0.095	0.474	0.00063879
CEP164	7.62E-09	-0.291728847	0.036	0.351	0.00013073
ODF3B	4.51E-09	-0.29146994	0.161	0.667	7.75E-05
TINF2	6.76E-11	-0.29135421	0.036	0.421	1.16E-06
1700096J18RIK	7.07E-10	-0.291155445	0.161	0.702	1.21E-05
1700031F10RIK	5.42E-09	-0.290633821	0.19	0.702	9.30E-05
PMIS2	8.56E-08	-0.289095236	0.197	0.702	0.00146936
RANGAP1	1.08E-07	-0.28815523	0.292	0.86	0.0018547
NR4A1	3.95E-09	-0.287870796	0.044	0.386	6.78E-05
4930556L07RIK	1.31E-06	-0.286511815	0.029	0.263	0.02240288
GM49796	1.51E-09	-0.285833472	0.153	0.649	2.59E-05
CPEB3	3.61E-10	-0.285678883	0.197	0.772	6.20E-06
GM31786	1.46E-08	-0.285488938	0.051	0.386	0.00025075
1700080O16RIK	8.40E-10	-0.284873004	0.058	0.439	1.44E-05
IQGAP1	5.86E-11	-0.284798917	0.102	0.579	1.01E-06
GM45185	7.10E-08	-0.284511248	0.022	0.281	0.00121803
CAPZA3	2.42E-07	-0.284336271	0.307	0.877	0.00415732
DPH3	5.75E-08	-0.283640372	0.248	0.789	0.00098629
UBE4BOS3	8.30E-09	-0.281914823	0.036	0.351	0.00014245
GM6863	6.43E-08	-0.281664735	0.051	0.368	0.00110416
1700064M15RIK	1.82E-08	-0.281482545	0.095	0.491	0.0003129
PHC1	3.82E-07	-0.28140019	0.117	0.491	0.00654927
APP	2.82E-06	-0.280381974	0.058	0.333	0.04836802
RSF1OS1	1.09E-08	-0.279825524	0.051	0.386	0.00018733
PCYT1A	7.54E-08	-0.277710241	0.117	0.526	0.00129329
DUSP18	4.78E-08	-0.277673402	0.044	0.351	0.00082026
NRAS	6.91E-07	-0.275920251	0.051	0.333	0.01185863

TOB1	1.84E-06	-0.275832185	0.044	0.298	0.03156708
OCEL1	4.76E-07	-0.274638835	0.117	0.474	0.00817778
COQ10B	2.36E-06	-0.272644126	0.226	0.667	0.04050438
RBM25	1.34E-06	-0.272312182	0.029	0.263	0.0230245
GM550	1.24E-10	-0.27109728	0.139	0.667	2.12E-06
BANF2	1.44E-06	-0.271073544	0.066	0.351	0.02466447
SLC39A13	8.18E-11	-0.269949047	0.117	0.632	1.40E-06
FAM20A	8.85E-08	-0.269140707	0.073	0.421	0.00151859
GM5901	3.38E-09	-0.26862935	0.168	0.684	5.80E-05
CARHSP1	4.52E-09	-0.267595319	0.241	0.825	7.75E-05
UBE2G2	2.07E-07	-0.267321027	0.255	0.807	0.00355457
1700003I22RIK	7.45E-09	-0.267111716	0.029	0.333	0.00012791
GM614	5.23E-08	-0.266972208	0.109	0.526	0.0008984
WWP2	3.26E-08	-0.266721376	0.175	0.667	0.00055935
PRSS40	2.63E-14	-0.266237689	0.066	0.596	4.52E-10
RFX3	1.44E-06	-0.266043365	0.036	0.281	0.02464532
LY6G6C	4.43E-10	-0.265604807	0.08	0.509	7.60E-06
TMEM8	9.53E-08	-0.265261174	0.19	0.684	0.00163493
SYCE3	5.51E-08	-0.265176632	0.051	0.368	0.00094641
GRK4	8.49E-10	-0.264605868	0.066	0.474	1.46E-05
D130020L05RIK	3.81E-09	-0.264240595	0.131	0.596	6.53E-05
CAMK4	6.35E-10	-0.264022424	0.146	0.684	1.09E-05
OSGIN1	2.69E-08	-0.263555359	0.248	0.807	0.00046131
GM20389	7.08E-11	-0.262030886	0.051	0.456	1.22E-06
TRIM54	5.23E-09	-0.261648222	0.058	0.421	8.97E-05
MAK	6.56E-08	-0.261603814	0.088	0.456	0.0011255
FAM76A	2.00E-08	-0.260183777	0.197	0.737	0.00034323
BC050972	1.47E-07	-0.259020915	0.044	0.333	0.00252753
DUSP3	2.52E-07	-0.258580612	0.212	0.702	0.00432752
GGNBP2	9.64E-07	-0.258426017	0.175	0.614	0.01653828
LYRM7	1.01E-08	-0.25822573	0.044	0.368	0.00017379
1700028I16RIK	6.16E-07	-0.257292719	0.058	0.351	0.01057798
GM27002	1.81E-08	-0.257278087	0.058	0.404	0.00031134
GSK3B	8.52E-09	-0.256997408	0.212	0.772	0.00014624
CALR3	1.06E-07	-0.256853585	0.212	0.719	0.00181337
UPK3BL	1.16E-07	-0.25589592	0.036	0.316	0.00198354
GM13872	4.24E-08	-0.254247421	0.102	0.491	0.00072797
4930578I06RIK	4.88E-09	-0.253975434	0.131	0.614	8.38E-05
1700003P14RIK	1.55E-10	-0.253661948	0.073	0.509	2.66E-06
RABEPK	5.12E-08	-0.253527585	0.212	0.737	0.00087842

ATG7	1.02E-09	-0.252759626	0.036	0.386	1.75E-05
D7ERTD443E	2.04E-09	-0.252610534	0.109	0.561	3.51E-05
KANSL1	1.62E-07	-0.251979849	0.051	0.351	0.00277425
TTC23	1.77E-08	-0.2516635	0.109	0.526	0.00030406
GM3219	4.59E-08	-0.25125502	0.015	0.263	0.00078849
GM11213	3.65E-07	-0.250733233	0.219	0.719	0.00627038
1700019P21RIK	1.18E-08	-0.250658043	0.051	0.386	0.00020288
SRGAP1	9.85E-09	-0.250617111	0.036	0.351	0.00016903
EEF1G	2.65E-06	-0.250278025	0.248	0.702	0.04556677
SERTAD2	7.14E-07	0.26110247	0.102	0.456	0.0122507
CETN4	2.11E-07	0.265964925	0.146	0.596	0.00362055
TM9SF2	1.60E-06	0.284567306	0.161	0.579	0.02748626
NRGN	5.99E-09	0.287177395	0.066	0.439	0.00010278
UCK2	2.41E-06	0.288517835	0.109	0.456	0.0413697
OTUD3	1.80E-06	0.307111987	0.109	0.456	0.03091074
RAN	1.25E-06	0.315636828	0.117	0.491	0.02137904
PABPC2	8.01E-08	0.321124565	0.197	0.719	0.00137539
CCDC188	1.43E-07	0.331808935	0.117	0.526	0.00245622
FAM178B	4.41E-07	0.357596041	0.131	0.544	0.00757416
UBAP2	9.88E-07	0.370038299	0.102	0.456	0.01695462
ARPC2	1.07E-06	0.387488446	0.124	0.509	0.01829185
SMPD5	1.02E-08	0.470372801	0.088	0.491	0.0001745
SSMEM1	1.55E-06	0.486898312	0.088	0.421	0.02663915
HMGCS2	1.60E-06	2.307150569	0.321	0	0.02744054
IGFBP7	2.82E-07	2.418011832	0.358	0	0.00484715
CYP17A1	8.07E-07	2.491821102	0.336	0	0.01384982
AGT	5.13E-09	2.786795953	0.511	0.07	8.80E-05
FABP3	2.50E-09	2.963088718	0.482	0.035	4.29E-05
CST3	1.06E-10	3.226066154	0.547	0.053	1.82E-06
ALDH1A1	1.25E-09	3.238343524	0.54	0.088	2.15E-05
LCN2	1.02E-11	3.280335497	0.599	0.07	1.76E-07
APOE	1.82E-13	3.280636046	0.803	0.614	3.13E-09
MT-ND2	7.48E-13	3.330111949	0.613	0.035	1.28E-08
CLU	1.95E-11	3.408417043	0.628	0.14	3.35E-07
FTH1	2.30E-11	3.464033747	0.715	0.386	3.95E-07
GSTM2	1.79E-11	3.541171007	0.584	0.07	3.07E-07
MT-ND1	1.73E-19	4.352649516	0.81	0.07	2.96E-15
MT-ND4	1.47E-25	4.59850674	0.971	0.246	2.51E-21
PTGDS	8.32E-22	4.614221739	0.861	0.053	1.43E-17
MT-CYTB	2.45E-26	4.864468217	0.978	0.158	4.20E-22

GSTM1	2.88E-24	5.123533933	0.92	0.088	4.95E-20
HBB-BS	2.37E-09	5.140257062	0.467	0.018	4.06E-05

Lista 8 de genes diferencialmente expresados en el cluster de espermátidas redondas tardías

Gen	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
KIF17	1.51E-12	-2.13675285	0.062	0.714	2.58E-08
IQCF4	7.28E-12	-2.026530641	0.188	0.905	1.25E-07
SPEM1	6.71E-11	-1.975034318	0.469	0.952	1.15E-06
LELP1	5.29E-11	-1.962429582	0.281	0.929	9.09E-07
CRAT	3.09E-13	-1.882618998	0.062	0.786	5.31E-09
CCDC7A	1.31E-11	-1.875329993	0.047	0.69	2.25E-07
TSSK3	2.44E-11	-1.85698989	0.203	0.929	4.18E-07
SMKR-PS	3.33E-10	-1.844985386	0.094	0.69	5.71E-06
FAM243	2.52E-10	-1.832661618	0.141	0.81	4.32E-06
SMAP1	2.02E-10	-1.810825212	0.094	0.69	3.47E-06
CHL1	8.45E-11	-1.805524286	0.266	0.905	1.45E-06
RNF138	7.74E-12	-1.80163147	0.438	1	1.33E-07
UBE2K	7.87E-10	-1.79000092	0.312	0.905	1.35E-05
CRISP2	9.33E-11	-1.780599433	0.578	1	1.60E-06
UBQLNL	3.88E-10	-1.77937231	0.188	0.833	6.65E-06
FAM220A	1.64E-12	-1.766219965	0.047	0.738	2.81E-08
CCDC70	4.90E-08	-1.763503204	0.062	0.548	0.0008414
SPAG17	2.67E-11	-1.750075402	0.016	0.595	4.58E-07
SMCP	1.37E-11	-1.743119899	0.781	1	2.35E-07
SMIM24	1.08E-10	-1.733824714	0.359	0.952	1.85E-06
BPGM	4.22E-08	-1.723199751	0.031	0.476	0.00072362
BPIFA3	2.99E-09	-1.709817439	0.203	0.81	5.13E-05
SORD	3.94E-10	-1.701764566	0.422	0.976	6.77E-06
MEA1	5.77E-11	-1.693944657	0.203	0.905	9.91E-07
DNAJB14	8.44E-11	-1.692417871	0.141	0.833	1.45E-06
LUZP1	1.01E-08	-1.683026435	0.156	0.714	0.0001736
OAZ3	3.29E-12	-1.67953436	0.812	1	5.64E-08
1700016H13RIK	1.19E-10	-1.672474407	0.312	0.952	2.04E-06
SLC30A4	3.09E-10	-1.671125824	0.062	0.667	5.31E-06
BB014433	6.85E-10	-1.661056453	0.234	0.929	1.18E-05
SCLT1	1.50E-07	-1.649863808	0.078	0.524	0.00257787
MS4A13	5.90E-10	-1.639334692	0.062	0.643	1.01E-05
CDIPTOS	4.28E-10	-1.628491489	0.469	0.952	7.34E-06
AARS2	8.47E-09	-1.623087499	0.062	0.571	0.00014545

SPEM2	7.90E-10	-1.618061665	0.328	0.976	1.36E-05
ASNSD1	3.21E-09	-1.613361539	0.094	0.667	5.51E-05
4930471G03RIK	8.70E-10	-1.605794858	0.25	0.905	1.49E-05
H2AL2A	5.82E-09	-1.596026075	0.188	0.81	1.00E-04
SPZ1	1.46E-09	-1.592248124	0.391	0.976	2.50E-05
1700030C14RIK	1.75E-09	-1.575296217	0.031	0.548	3.01E-05
SPATC1	2.47E-10	-1.570915073	0.156	0.857	4.25E-06
HSPB9	6.96E-10	-1.544353326	0.312	0.976	1.20E-05
NAT8F4	6.78E-08	-1.508795802	0.031	0.452	0.0011645
1700001L05RIK	3.55E-08	-1.508042462	0.156	0.738	0.00060999
LRRC28	4.48E-09	-1.505793131	0.203	0.857	7.69E-05
HMOX2	5.70E-09	-1.503234209	0.328	0.976	9.79E-05
FSCN3	1.10E-08	-1.502648734	0.203	0.833	0.0001889
PPP2R2B	4.02E-09	-1.501862679	0.125	0.738	6.90E-05
SYCE2	4.33E-09	-1.498582483	0.312	0.976	7.43E-05
CDRT4	1.26E-09	-1.487143392	0.328	0.952	2.16E-05
CHPT1	1.14E-08	-1.484734818	0.172	0.762	0.00019607
ST6GALNAC2	5.37E-08	-1.483470929	0.484	0.976	0.00092112
4933411K16RIK	2.48E-09	-1.474467969	0.391	0.976	4.26E-05
1700009N14RIK	1.15E-08	-1.471558224	0.391	0.952	0.00019815
SPATA3	3.00E-09	-1.466910576	0.484	0.976	5.16E-05
WBSCR25	5.97E-09	-1.463913384	0.219	0.929	0.00010248
1700027A15RIK	1.42E-09	-1.462671002	0.438	0.929	2.44E-05
ZDHHHC25	1.13E-09	-1.460519844	0.094	0.69	1.94E-05
GM7008	4.88E-08	-1.459030788	0.047	0.5	0.00083714
4933415F23RIK	8.26E-09	-1.458218822	0.172	0.786	0.00014168
CCDC33	2.69E-10	-1.455990865	0.047	0.643	4.61E-06
RABEPK	1.73E-09	-1.446824626	0.047	0.595	2.97E-05
GSG1	2.96E-09	-1.431327621	0.688	0.952	5.09E-05
4930571K23RIK	1.72E-07	-1.428554541	0.344	0.905	0.00295311
TEX48	1.96E-09	-1.425652826	0.219	0.905	3.36E-05
1700092M07RIK	1.08E-08	-1.424856118	0.125	0.714	0.00018471
GM45441	2.79E-07	-1.42123151	0.047	0.476	0.00478221
FXR1	3.47E-09	-1.413421669	0.234	0.881	5.96E-05
CABYR	1.25E-09	-1.405216923	0.094	0.714	2.14E-05
SPATA20	2.58E-08	-1.40497825	0.281	0.905	0.00044298
DNAJB4	7.68E-10	-1.402718541	0.125	0.762	1.32E-05
GM9795	1.95E-08	-1.393626217	0.094	0.643	0.0003351
GM4366	8.04E-07	-1.391216206	0.094	0.524	0.01380756
ODF4	1.83E-09	-1.387145003	0.094	0.69	3.14E-05

PPM1J	1.31E-07	-1.384975865	0.109	0.619	0.00224523
ACTE1	2.16E-08	-1.381746891	0.266	0.881	0.00037086
PAQR9	3.70E-11	-1.379016363	0.062	0.69	6.34E-07
LPP	7.41E-09	-1.372773314	0.094	0.643	0.0001271
AZIN2	2.23E-08	-1.365421096	0.219	0.857	0.00038335
PRKAR2A	3.90E-08	-1.363079833	0.266	0.881	0.0006689
IQCF3	5.27E-09	-1.362255735	0.453	0.976	9.05E-05
AKAP12	1.35E-07	-1.358649895	0.344	0.976	0.00231519
ACSBG2	7.36E-11	-1.355728951	0.109	0.81	1.26E-06
4921536K21RIK	3.54E-10	-1.35368316	0.094	0.738	6.07E-06
CCDC136	1.07E-07	-1.347957361	0.312	0.952	0.00183194
ZFYVE1	3.93E-10	-1.347308514	0.156	0.833	6.74E-06
GPAT4	6.18E-09	-1.345626934	0.297	0.929	0.00010601
4930449C09RIK	1.29E-09	-1.34548585	0.109	0.738	2.22E-05
GM5617	1.71E-08	-1.339343303	0.578	0.976	0.00029283
AVEN	1.07E-09	-1.335256762	0.109	0.714	1.84E-05
TEX46	2.41E-07	-1.333950432	0.047	0.476	0.00414375
AMZ2	1.30E-08	-1.33087699	0.234	0.905	0.00022272
PNPLA8	7.78E-08	-1.325544223	0.031	0.476	0.00133503
DYDC2	6.64E-10	-1.323487981	0.125	0.786	1.14E-05
GM16279	4.63E-09	-1.320536393	0.047	0.571	7.95E-05
2810408A11RIK	9.52E-08	-1.3200254	0.281	0.905	0.00163455
1700009J07RIK	3.33E-09	-1.312725421	0.219	0.929	5.72E-05
NT5C1B	7.25E-08	-1.303725325	0.312	0.929	0.0012449
ATL3	3.33E-08	-1.30126821	0.266	0.929	0.00057087
ZCCHC13	2.45E-08	-1.300088419	0.094	0.643	0.00042045
TESCL	4.09E-08	-1.299953629	0.078	0.595	0.00070263
1700001C19RIK	6.21E-07	-1.29372649	0.391	0.905	0.0106586
ADCY10	1.54E-07	-1.291767975	0.062	0.524	0.00263679
LLCFC1	1.55E-09	-1.286779423	0.172	0.857	2.67E-05
NBR1	4.30E-08	-1.285246161	0.25	0.905	0.00073726
LRRC18	9.88E-09	-1.284073558	0.312	0.952	0.00016957
1700012A03RIK	7.06E-07	-1.282214984	0.438	0.929	0.01211193
FAM71F2	6.75E-08	-1.281616413	0.469	0.976	0.00115777
KCMF1	7.82E-08	-1.279437246	0.125	0.643	0.0013416
AQP11	2.07E-09	-1.273957458	0.328	0.952	3.55E-05
TPGS2	2.40E-09	-1.271130973	0.141	0.762	4.12E-05
GM4419	3.29E-09	-1.269729363	0.109	0.714	5.64E-05
LEMD1	1.91E-08	-1.269577915	0.047	0.548	0.00032723
HABP4	1.20E-07	-1.25938429	0.312	0.905	0.0020639

PRKCD	6.96E-09	-1.257413094	0.141	0.738	0.0001195
ENTR1	7.76E-08	-1.257198219	0.234	0.833	0.0013327
PRM2	4.24E-09	-1.25481256	0.969	1	7.27E-05
ACTL11	6.62E-08	-1.252958068	0.156	0.738	0.00113592
1700017D01RIK	1.72E-06	-1.250750813	0.047	0.452	0.02943512
4930570D08RIK	4.44E-08	-1.250208752	0.031	0.476	0.00076185
SPINK2	4.92E-07	-1.248961402	0.031	0.429	0.00845079
CLPB	1.39E-08	-1.247919643	0.344	0.952	0.0002389
GM10840	1.77E-07	-1.245523653	0.078	0.548	0.00304467
GDE1	1.34E-08	-1.24419752	0.125	0.69	0.0002295
LRRC51	1.85E-07	-1.240993384	0.375	0.976	0.00317412
CAR2	1.32E-07	-1.238713461	0.297	0.905	0.0022604
FAM193A	1.69E-07	-1.221599067	0.062	0.524	0.00289292
VASP	4.97E-08	-1.221002739	0.312	0.929	0.00085299
OSER1	2.85E-07	-1.219108285	0.031	0.429	0.00488528
LRRC46	1.60E-09	-1.215590783	0.156	0.81	2.75E-05
DBIL5	1.42E-08	-1.2144359	0.703	1	0.00024307
TMEM120A	1.03E-09	-1.21277412	0.094	0.69	1.76E-05
YPEL1	2.13E-09	-1.209088881	0.047	0.595	3.65E-05
EIF4E2	2.72E-08	-1.207413262	0.062	0.571	0.00046603
EIF4G1	5.32E-09	-1.204679105	0.078	0.643	9.13E-05
GM4332	8.32E-07	-1.20017759	0.156	0.667	0.01427884
GPI1	1.35E-08	-1.198803223	0.203	0.905	0.00023252
PDZD8	3.55E-09	-1.198389955	0.172	0.833	6.10E-05
PPP1R36	1.74E-08	-1.198136185	0.141	0.738	0.00029856
SGMS1	5.35E-08	-1.197304689	0.172	0.762	0.0009184
5031439G07RIK	1.30E-07	-1.185609953	0.188	0.738	0.00222491
UBQLN3	2.45E-07	-1.178943861	0.203	0.786	0.00420716
HK1	4.46E-07	-1.177442081	0.266	0.881	0.00764747
1700034I23RIK	1.37E-07	-1.177102302	0.203	0.833	0.00234865
GAPDHS	1.27E-07	-1.177065076	0.797	0.976	0.00217771
RMND1	2.53E-07	-1.176717863	0.047	0.476	0.00434683
UBE2N-PS1	1.25E-07	-1.169648273	0.109	0.619	0.00215079
PPP1R11	1.45E-08	-1.166022998	0.422	0.976	0.00024851
HYPM	2.21E-08	-1.157596331	0.203	0.833	0.00038005
CUL3	7.66E-09	-1.156194627	0.172	0.81	0.00013144
ODF2	8.50E-08	-1.155743209	0.656	1	0.00145963
4930453N24RIK	6.02E-07	-1.155526716	0.359	0.905	0.010328
1700001K19RIK	1.72E-06	-1.153364299	0.375	0.929	0.02949648
C1QTNF4	4.69E-07	-1.150078183	0.297	0.881	0.00804877

IFT172	1.30E-07	-1.145565337	0.25	0.881	0.00222967
KNSTRN	3.64E-07	-1.142159259	0.188	0.714	0.00624694
4933400A11RIK	3.21E-07	-1.139758784	0	0.357	0.00551648
BC048671	1.73E-10	-1.139027085	0.125	0.833	2.96E-06
DCUN1D1	6.91E-08	-1.138597196	0.188	0.81	0.00118661
FABP12	1.70E-06	-1.137572796	0.031	0.405	0.02914127
PGK 2.00	2.32E-06	-1.136964078	0.453	0.952	0.03987064
TUSC2	1.88E-06	-1.131851172	0.047	0.429	0.03230352
ISCA1	8.89E-08	-1.131808343	0.266	0.905	0.00152647
RGS22	6.85E-07	-1.131625408	0.078	0.524	0.01176436
MARCH2	5.14E-07	-1.130361417	0.062	0.5	0.0088155
AI507597	3.12E-07	-1.12872546	0.359	0.976	0.00536021
RNASEH2A	1.23E-08	-1.12655807	0.234	0.929	0.00021187
PLAAT5	2.41E-07	-1.121935202	0.531	1	0.00412932
ARL 9.00	2.72E-09	-1.120441898	0.109	0.69	4.67E-05
GM30025	2.47E-06	-1.11979588	0	0.31	0.04247734
NSUN4	1.47E-08	-1.11966697	0.156	0.786	0.00025307
VPS13A	2.47E-06	-1.118488394	0	0.31	0.04247734
FSCB	2.13E-07	-1.109555012	0.156	0.738	0.00365436
EYA4	1.37E-07	-1.106510758	0.094	0.595	0.0023583
LRRC57	4.32E-07	-1.105914438	0.391	0.952	0.00741932
PRR30	1.93E-07	-1.104672188	0.312	0.976	0.00331638
GM9999	5.80E-07	-1.103188592	0.516	0.976	0.00996299
AGPAT2	1.18E-09	-1.101692039	0.188	0.881	2.02E-05
HIPK1	1.27E-07	-1.098323928	0.156	0.714	0.00217125
ACSL1	7.94E-07	-1.094666554	0.281	0.881	0.01362554
TTC39D	7.95E-08	-1.091062076	0.141	0.69	0.00136519
EIF4E	1.16E-07	-1.086317108	0.25	0.881	0.00199094
1700019D03RIK	1.50E-06	-1.085740183	0.281	0.857	0.02576333
BCL2L14	5.29E-09	-1.081355106	0.266	1	9.08E-05
UBXN11	1.77E-07	-1.080447487	0.203	0.81	0.00303368
REEP6	1.45E-06	-1.079821598	0.531	1	0.02481318
SPATA18	9.04E-07	-1.070587176	0.344	0.881	0.01550918
TTC24	1.18E-07	-1.069340639	0.203	0.786	0.00202019
TBC1D20	2.49E-06	-1.068550737	0.328	0.905	0.04278279
DNAJB8	1.06E-07	-1.060991076	0.391	0.929	0.00182093
TUBB4B	3.03E-07	-1.055914339	0.172	0.714	0.00520469
1700001O22RIK	1.97E-06	-1.054413581	0.469	0.929	0.03387777
LEXM	6.81E-07	-1.046832286	0.047	0.452	0.01169088
ANKEF1	2.29E-08	-1.039879839	0.234	0.881	0.00039286

1700024G13RIK	1.99E-07	-1.038881907	0.047	0.476	0.00341931
GGN	6.24E-08	-1.035688568	0.047	0.524	0.00107129
TTC7	2.99E-07	-1.025118681	0.125	0.643	0.00512911
ISG20L2	1.81E-06	-1.023901576	0.25	0.833	0.03104157
SLC25A37	1.58E-07	-1.021174169	0.078	0.571	0.00270415
PAFAH1B1	4.08E-07	-1.019403115	0.172	0.69	0.00700699
GSTM5	1.11E-07	-1.019183181	0.703	0.976	0.00190263
ODF1	1.50E-07	-1.007563877	0.797	1	0.00256852
METTL22	8.99E-07	-1.004516034	0	0.333	0.01543337
MROH2B	1.15E-07	-1.000939113	0.125	0.69	0.00196872
FEM1C	6.44E-07	-0.992147005	0.125	0.643	0.01105844
1700020G17RIK	7.84E-08	-0.990587316	0.109	0.643	0.00134558
GUK1	5.37E-07	-0.989143539	0.062	0.5	0.00922272
COIL	8.35E-07	-0.984497524	0.156	0.69	0.01432425
TEX47	3.21E-07	-0.984050367	0	0.357	0.00551648
ELOF1	3.44E-09	-0.981191942	0.266	0.952	5.90E-05
ST3GAL6	3.30E-07	-0.977696818	0.016	0.405	0.00566502
1700029B22RIK	9.25E-10	-0.976001682	0.125	0.762	1.59E-05
FAM229B	1.69E-06	-0.974566117	0.391	0.976	0.02898523
B4GALT2	5.99E-07	-0.971392071	0.031	0.429	0.01028766
STX8	1.33E-06	-0.968672429	0.031	0.405	0.02288529
FAM187B	2.64E-06	-0.955904895	0.234	0.786	0.04524887
ITPR3OS	4.85E-09	-0.955817596	0.188	0.857	8.33E-05
SPPL2C	3.29E-09	-0.955034937	0.109	0.714	5.64E-05
NUDT18	3.21E-10	-0.954300085	0.094	0.738	5.50E-06
AGPAT3	1.01E-06	-0.953104305	0.328	0.952	0.0173214
HSPA4L	4.24E-08	-0.951605282	0.281	0.929	0.0007276
MLLT11	1.67E-06	-0.951505792	0.344	0.881	0.02864612
NUP98	1.86E-07	-0.950647391	0.094	0.619	0.0031966
CLPX	1.52E-08	-0.95051839	0.141	0.714	0.00026094
LRRC1	9.68E-07	-0.949121803	0.078	0.524	0.01662161
CEP85L	4.65E-07	-0.942554558	0.172	0.714	0.0079726
RNF19A	1.84E-07	-0.938860986	0.172	0.738	0.00315676
KLHL10	2.10E-06	-0.933683582	0.219	0.81	0.03610576
1700013F07RIK	2.37E-07	-0.929282976	0.109	0.619	0.00407189
MORN2	7.40E-07	-0.928091223	0.281	0.881	0.01270018
RPL41	8.64E-07	-0.925372329	0.359	0.929	0.01483457
PLEKHO2	1.95E-07	-0.924993799	0.094	0.595	0.00334067
1700120K04RIK	1.60E-08	-0.921915912	0.141	0.738	0.0002739
1700031P21RIK	4.97E-07	-0.918815311	0.094	0.571	0.00852887

CCT6B	2.87E-07	-0.917529623	0.094	0.595	0.00491917
ABHD8	6.81E-07	-0.916304409	0.047	0.452	0.01169088
HOOK1	1.30E-07	-0.904182354	0.203	0.81	0.00222862
TMEM56	2.77E-07	-0.904114804	0.344	0.929	0.00475255
TMEM267	2.85E-09	-0.902153016	0.078	0.643	4.89E-05
MORN3	4.79E-07	-0.88077463	0.266	0.881	0.00821755
FAM161A	3.16E-09	-0.876099786	0.078	0.667	5.42E-05
PDZK1	2.62E-07	-0.87356534	0.172	0.738	0.00449314
CCDC189	3.82E-07	-0.872798633	0.125	0.643	0.00655215
RAB28	2.37E-08	-0.857812102	0.109	0.714	0.00040674
XRRA1	3.10E-08	-0.854587739	0.156	0.81	0.00053211
TLE3	3.10E-07	-0.851862098	0.125	0.667	0.0053224
RBAKDN	8.77E-08	-0.85019879	0.188	0.81	0.00150486
1700028J19RIK	1.73E-07	-0.838479337	0.047	0.5	0.00296394
OTUD3	7.84E-07	-0.831700583	0.016	0.381	0.0134633
PRKCQ	1.37E-06	-0.829711978	0.125	0.619	0.02354897
LRRC74A	5.54E-08	-0.827928424	0.109	0.667	0.0009506
GM550	7.36E-07	-0.823524348	0.062	0.5	0.0126257
PDXDC1	1.07E-07	-0.815064901	0.156	0.762	0.00184441
PPM1G	9.52E-07	-0.801720203	0.141	0.69	0.0163344
HSDL2	2.22E-06	-0.79537141	0.156	0.643	0.0380679
PROCA1	9.66E-08	-0.785115963	0.203	0.833	0.00165793
POLB	7.26E-07	-0.784168464	0.125	0.643	0.01246087
RIOK3	3.55E-07	-0.779244595	0.156	0.69	0.00609835
OXCT2A	1.74E-06	-0.772841928	0.266	0.857	0.02981744
4930518J20RIK	2.16E-06	-0.771486884	0.031	0.405	0.03702397
UPF3A	6.38E-07	-0.768362272	0.094	0.595	0.01095098
TES3-PS	8.95E-08	-0.762296972	0.125	0.667	0.00153614
1700034G24RIK	1.35E-07	-0.752847375	0.031	0.476	0.00231673
RRP1	1.51E-06	-0.752206588	0.234	0.762	0.02584731
CGNL1	2.16E-06	-0.729883596	0.062	0.476	0.03715483
IQCM	2.15E-06	-0.727412608	0.078	0.5	0.03683228
DPEP3	2.91E-06	-0.726791951	0.016	0.357	0.04993105
THEG	8.24E-08	-0.722277241	0.141	0.738	0.00141495
GHITM	2.30E-06	-0.719665237	0.266	0.881	0.03947218
SPATA7	4.82E-08	-0.710883032	0.188	0.81	0.00082809
DNAJC21	1.70E-08	-0.703792159	0.094	0.667	0.00029236
ADAM3	9.31E-07	-0.703454484	0.156	0.714	0.01598414
ODC1	1.64E-06	-0.702324368	0.047	0.452	0.02812844
SKP2	9.96E-07	-0.693014134	0.125	0.643	0.01708938

MFAP3L	1.72E-06	-0.689838892	0.172	0.738	0.0295869
PGAP2	9.89E-07	-0.665614431	0.141	0.69	0.01697221
M1AP	1.25E-06	-0.665232204	0.078	0.524	0.02147815
RIMKLB	2.06E-06	-0.655864114	0.031	0.405	0.03529932
ZBBX	8.48E-08	-0.655524882	0.078	0.595	0.00145468
NRD1	4.21E-07	-0.643478643	0.234	0.857	0.00722494
ATAD1	4.38E-07	-0.631405862	0.094	0.595	0.00751693
2810408I11RIK	2.16E-06	-0.614288749	0.078	0.524	0.03711185
SLAIN2	1.36E-07	-0.610172013	0.047	0.5	0.00233344
LY6K	2.25E-06	-0.605409129	0.078	0.524	0.03868782
GM5767	7.32E-07	-0.581671463	0.141	0.643	0.01256687
VWA3B	7.73E-07	-0.571383004	0.156	0.69	0.01326864
NPTXR	2.91E-06	-0.568464343	0.016	0.357	0.04993105
CEP128	2.30E-06	-0.551197728	0.094	0.548	0.03943238
BMI1	3.72E-08	-0.546890797	0.156	0.762	0.00063796
FKBPL	1.88E-06	-0.521784761	0.094	0.548	0.03218124
TCFL5	2.17E-08	-0.475184333	0.078	0.619	0.00037167
MTX1	1.83E-06	-0.449759931	0.078	0.524	0.03140276
TEX13A	4.73E-07	-0.449746608	0.141	0.69	0.00812085
BRDT	1.07E-06	-0.411505579	0.031	0.429	0.01840622
ATP1A4	2.72E-06	-0.352680104	0.188	0.738	0.04671911
LYPLA1	7.33E-09	-0.344413453	0.172	0.857	0.0001258
GM7808	1.07E-06	-0.330885983	0.016	0.381	0.01834332
PTGDS	5.68E-07	2.871059072	0.562	0.071	0.00974779
GSTM1	1.59E-08	3.117883147	0.703	0.19	0.00027243
MT-ND1	5.33E-08	3.461368606	0.641	0.119	0.00091548
MT-CYTB	1.78E-12	4.032006936	0.828	0.167	3.06E-08
CLU	3.80E-08	4.101356467	0.609	0.071	0.00065134
MT-ND4	1.41E-11	4.118311155	0.828	0.262	2.42E-07



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00147

Matrícula: 2163802562

CTCF como regulador de múltiples mecanismos estructurales y moleculares durante la espermatogénesis.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 3 del mes de abril del año 2023 en la Unidad Ixtapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ
DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA
DRA. ROSARIO ORTIZ HERNANDEZ
DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: CARLOS ULISES TORRES FLORES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.





CARLOS ULISES TORRES FLORES
ALUMNO

REVISÓ




MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTE



DR. LUIS ENRIQUE GÓMEZ QUIROZ

VOCAL



DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

VOCAL



DRA. ROSARIO ORTIZ HERNÁNDEZ

SECRETARIO



DR. IVÁN URIEL BAHENA OCAMPO