

ANEUPLOÏDIA RADIOINDUÏDA

Memòria presentada per
Immaculada Ponsa Arjona

Per optar al grau de
Doctora en Biologia Cel·lular

Tesi realitzada sota la direcció de
Dra. Rosa Miró Ametller
Dra. Anna Genescà Garrigosa

A la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

Dra. Rosa Miró Ametller

Dra. Anna Genescà Garrigosa

Immaculada Ponsa Arjona

Bellaterra, desembre de 2007

als meus pares

a les meves germanes

als meus *peques*

a tots els que heu estat al meu costat,

moltíssimes gràcies!!!

Sumari

SUMARI	I
1. INTRODUCCIÓ	1
Aneuploïdia	3
Divisió cel·lular	4
Mitosi	6
Punts de control del cicle cel·lular	10
Punt de control de la fase G1.....	11
Punt de control de la transició G2-M.....	12
Punt de control mitòtic	13
Punt de control del DNA danyat	17
Meiosi.....	19
Origen de l'aneuploïdia	31
Efectes de la radiació ionitzant	35
Resposta al dany al DNA.....	38
Mecanismes de resposta als DSBs.....	39
Models cel·lulars per l'estudi de l'aneugènia	42
Model somàtic	42
Limfòcits de la sang perifèrica i de la melsa.....	42
Anàlisi dels limfòcits.....	44
Model germinal.....	46
Espermatogènesi	48
2. OBJECTIUS	57
3. MATERIALS I MÈTODES	61
Mostres biològiques	63
Cèl·lules humanes	63
Obtenció de les mostres	63
Irradiació de la sang.....	63
CULTIU DE LIMFÒCITS BINUCLEATS	64
Reactius i equipament	64
Protocol.....	65
HIBRIDACIÓ DE LIMFÒCITS BINUCLEATS	66

Reactius i equipament	66
Solucions	67
Protocol	68
Cèl·lules de ratolí	70
Obtenció de les mostres	70
Irradiació dels ratolins	71
Reactius i equipament	71
Solucions	71
Protocol	71
CULTIU D'ESPLENÒCITS	73
Reactius i equipament	73
Medis	74
Protocol	74
OBTENCIÓ D'ESPERMATOZOIDES DE L'EPIDÍDIM.....	76
Reactius i equipament	76
Protocol	77
Obtenció de DNA de PACs i BACs: minipreparació	77
Reactius i solucions	78
Protocol	79
Marcatge de les sondes.....	80
Marcatge indirecte	81
Marcatge de sondes de DNA per Nick Translation kit de GIBCO.....	81
Marcatge de sondes de DNA per Nick Translation amb kits de Roche	84
Filtració de les sondes	85
Precipitació de la sonda	86
Marcatge directe.....	86
Marcatge directe de la sonda de DNA amb un kit de Vysis.....	86
Filtració de les sondes	88
Precipitació de la sonda	89
HIBRIDACIÓ D'ESPLENÒCITS BINUCLEATS	90
Reactius i equipament	91
Solucions	91
Protocol	92
Criteris de recompte.....	95
HIBRIDACIÓ SEQÜENCIAL DE TELÒMERS AMB SONDES DE PNA_s PER SEQÜÈNCIES TELOMÈRIQUES I SONDES DE DNA DELS CROMOSOMES 8 I 14 ..	96

Hibridació dels telòmers amb sondes de PNAs	96
Solucions	96
Protocol	97
Hibridació amb les sondes dels cromosomes 8 i 14.....	98
Protocol	98
HIBRIDACIÓ D'ESPERMATOZOIDES DE RATOLÍ	100
Reactius i equipament	100
Solucions	101
Protocol	102
Criteris de recompte.....	103
4.RESULTATS	105
Capítol I: Inducció d'aneuploïdia en limfòcits humans irradiats <i>in vitro</i>	107
Capítol II: Inducció i persistència d'aneuploïdia en limfòcits de ratolí irradiats <i>in vivo</i>	123
Capítol III: Inducció d'aneuploïdia primària o secundària?: Estudi de cromosomes mitòtics de cèl·lules somàtiques irradiades <i>in vivo</i>	141
Capítol IV: Inducció d'aneuploïdia en diferents estadis de l'espermatogènesi de ratolí	157
5.DISCUSSIÓ	173
Aparició i persistència de l'aneuploïdia radioinduída	175
Cèl·lules germinals. Persistència i radiosensibilitat.....	181
Defectes genètics que es poden transmetre a la descendència.....	184
6.CONCLUSIONS	189
7.BIBLIOGRAFIA	193
ANNEX.....	213

1.Introducció

ANEUPLOÏDIA

L'aneuploïdia és la condició on el nombre de cromosomes d'una cèl·lula o organisme difereix d'un múltiple exacte del nombre haploide. És comú en nombroses condicions patològiques com poden ser els avortaments espontanis, els defectes de naixement i el càncer. Els tipus d'aneuploïdia més comuns són les monosomies i les trisomies, i són la base d'un cert nombre de síndromes genètiques humanes (Straus, 1981). En vista de l'impacte de l'aneuploïdia sobre la salut humana, i del possible paper etiològic dels agents mediambientals, és important que es desenvolupin mètodes per detectar el potencial dels agents genotòxics per provocar tals canvis.

Les causes de fallada reproductiva són diverses i no es coneixen del tot (Hook, 1985; Slotter *et al.*, 2004). Les anomalies cromosòmiques són un factor important (Chandley, 1991; Wyrobek, 1993), amb aproximadament un 1% dels naixements amb anomalies numèriques o estructurals. Aproximadament la meitat dels avortaments espontanis i una fracció important dels defectes de naixement deguts a problemes de desenvolupament i morfològics estan associats a anomalies cromosòmiques *de novo* (Hassold, 1998). Les anomalies cromosòmiques poden originar-se durant la gametogènesi de qualsevol dels dos progenitors. També poden originar-se després de la fecundació, quan és molt probable que resultin en una varietat de graus de mosaïcisme, dependent del moment del desenvolupament en el que s'hagi produït. Anàlisis moleculars de l'origen parental de les anomalies cromosòmiques durant el desenvolupament o després del naixement indiquen que la contribució relativa a varis tipus d'anomalies cromosòmiques varia entre les diferents categories de defectes. La trisomia autosòmica sembla ser predominantment d'origen matern (per ex., trisomia 21, 18, 16, 13), mentre que les aneuploïdies dels cromosomes sexuals (per ex., 45,X, 47,XXY, 47,XYY, 47,XXX) tenen una important contribució paterna (Hassold i Hunt, 2001). A més a més, moltes de les mutacions puntuals i reorganitzacions cromosòmiques estructurals germinals *de novo* sembla que sorgeixen durant l'espermatogènesi (Chandley, 1991).

El guany i pèrdua de cromosomes és un fenomen molt habitual en cèl·lules malignes (Mitelman *et al.*, 1994). L'aneuploïdia desestabilitza el

nombre de cromosomes i és la primera causa de la inestabilitat cromosòmica en cèl·lules neoplàsiques (Duesberg *et al.*, 2004). La inestabilitat cromosòmica (CIN) (Lengauer *et al.*, 1998) és la taxa amb la qual el fenomen de guanys i pèrdues de cromosomes, així com les pèrdues d'heterozigositat, tenen lloc en una cèl·lula al llarg del temps. Per tant, el comportament estàtic de l'aneuploïdia en una cèl·lula no ens aportarà informació de la inestabilitat cromosòmica. Per una banda, es creu que l'aneuploïdia està causada per mutacions de gens específics que controlen els processos de la segregació cromosòmica, però per altra banda, també se suggereix que l'aneuploïdia és completament independent de mutacions genètiques (Duesberg i Li, 2003).

Divisió cel·lular

El cicle cel·lular comença quan es formen dues noves cèl·lules filles, per la divisió d'una única cèl·lula mare, i finalitza quan una d'aquestes dues cèl·lules es divideix de nou en unes altres dues cèl·lules filles.

La divisió cel·lular és el procés pel qual els cromosomes i, per tant, les molècules de DNA que els constitueixen, segreguen de forma correcta a les cèl·lules filles després d'haver elaborat prèviament còpies perfectes de sí mateixes. Aquest procés s'ha de dirigir amb molta cura, de manera que les cèl·lules filles rebin un joc complet de cromosomes. Hi ha dos tipus de divisions cel·lulars: 1) la mitosi, en la que el producte resultant són dues cèl·lules filles idèntiques a la cèl·lula mare; la majoria de cèl·lules de l'organisme es divideixen per mitosi. 2) La meiosi, en la que el producte resultant són quatre cèl·lules filles amb la meitat de cromosomes que la cèl·lula mare; té lloc en unes cèl·lules de la línia germinal per donar els gàmetes masculins i femenins, els espermatozoides i els oòcits respectivament (figura 1.1).

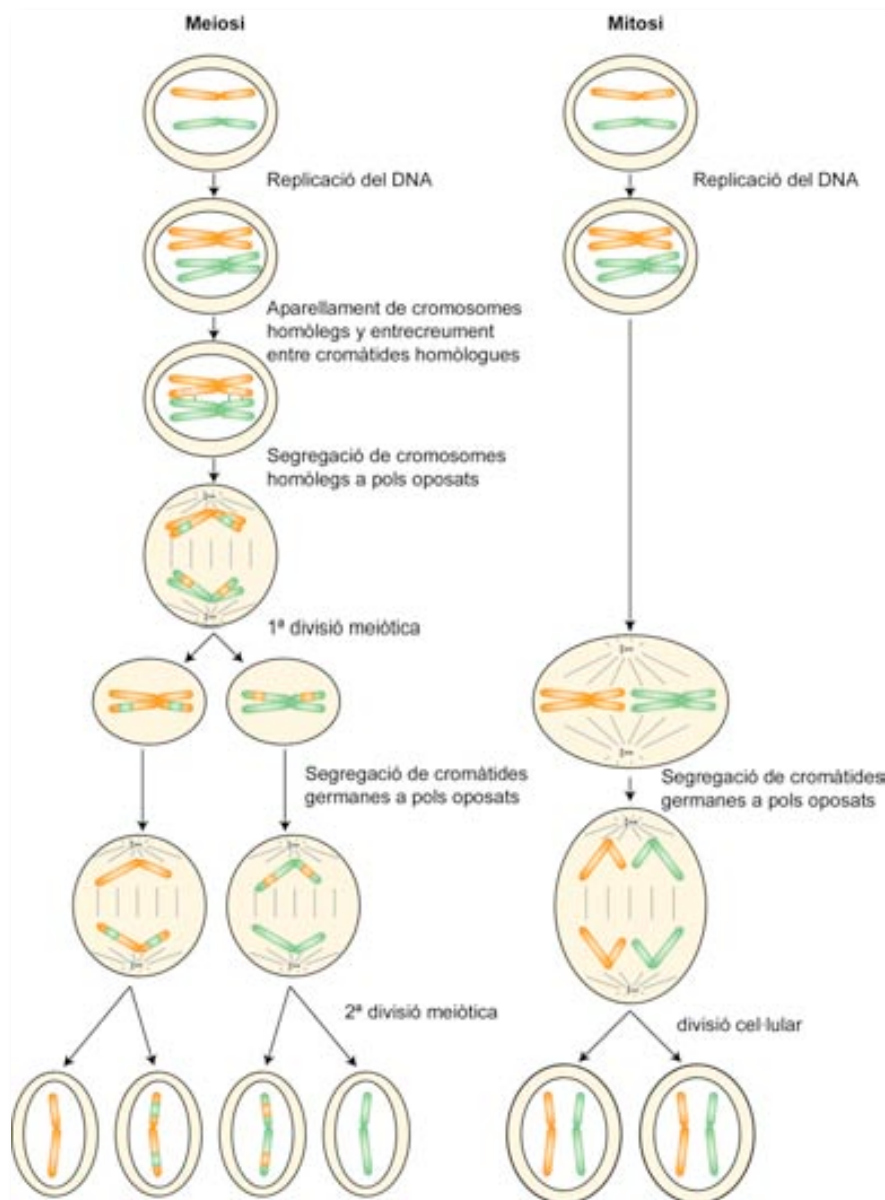


Figura 1.1. Comparació de la meiosi i la mitosi.

Les cèl·lules poden estar en divisió (fase M) o en interfase (fase G1, S i G2). La mitosi només representa una petita part del total del cicle cel·lular; en una cèl·lula normal de mamífer, la mitosi dura menys d'una hora. Les cèl·lules es troben la major part del temps a la fase de creixement entre divisions, la interfase. La majoria de components cel·lulars se sintetitzen contínuament durant la interfase, de tal manera que la massa cel·lular augmenta gradualment a mesura que s'acosta la divisió. Dins de la interfase distingim la fase G1 (gap) que segueix a la fase M; després ve la fase S (síntesi) on té lloc la replicació del DNA, al principi de la qual se sintetitzen les histones i després es replica el DNA; i seguidament tenim la fase G2, que és la fase prèvia a la fase M. Les cèl·lules que normalment no

es divideixen i queden en un estadi G1 permanent que, per distingir-ho de la G1 transitòria, s'anomena G0.

Mitosi

A mesura que es forma un individu a partir d'un embrió, en el trànsit de fetus a lactant i adult, es requereixen moltes divisions cel·lulars per tal de generar un gran nombre de cèl·lules. A més, moltes cèl·lules tenen un període de vida limitat, de tal manera que en l'adult hi ha una necessitat contínua de generar noves cèl·lules. Totes aquestes divisions tenen lloc per mitosi. Aquesta última és el procés normal de divisió cel·lular, des de la segmentació del zigot fins a la mort de l'individu.

La mitosi és un tipus de divisió cel·lular en la que seguit d'una ronda de replicació del DNA, les cromàtides germanes (molècules de DNA germanes) se separen a pols oposats de la cèl·lula per donar dues cèl·lules filles idèntiques a la cèl·lula mare. Aquesta segregació s'aconsegueix gràcies a que els microtúbuls s'uneixen a les cromàtides via una estructura especialitzada anomenada cinetocor, que es localitza al centròmer dels cromosomes, i les arrosseguen cap a pols oposats.

La fase M del cicle cel·lular consisteix en les diverses etapes de la divisió nuclear (profase, prometafase, metafase, anafase i telofase de la mitosi) i la divisió del citoplasma (citocinesi) que se solapa amb les últimes etapes de la mitosi.

Profase

Una vegada acabada la replicació del DNA, la cèl·lula surt de la fase S i entra a la fase G2, en la que es realitzen les últimes preparacions per l'inici de la mitosi. Cap al final de la fase G2, els cromosomes comencen a condensar-se, passant de la cromatina relaxada, extremadament difusa, a les estructures extensament plegades i compactes que són típiques de la mitosi. La condensació dels cromosomes és un fenomen molt important perquè les fibres de la cromatina són tan llargues i estan tant entortolligades a la interfase, que si es mantinguessin en aquesta forma descompactada, s'enredarien inevitablement durant la distribució del DNA cromosòmic en la divisió cel·lular. Encara que la transició entre la fase G2 i la profase no està molt ben definida, es considera que una cèl·lula està en

profase quan els cromosomes individuals s'han condensat fins el punt de ser visibles com objectes independents en un microscopi òptic. Donat que el DNA cromosòmic s'ha replicat durant la fase S, cada cromosoma a la profase està format per dues cromàtides germanes, fortament unides una amb l'altra mitjançant un complex proteic, conegut com cohesines.

Les cohesines són un complex proteic molt conservat des dels llevats fins als humans, i està format per un heterodímer de subunitats del manteniment estructural dels cromosomes (SMC, *structural maintenance of chromosomes*), la SMC1 i la SMC3, la subunitat RAD21 (també coneguda com SCC1) i la SA1 i SA2 (o STAG1 i STAG2) (figura 1.2). Aquest complex s'uneix a la cromatina durant la fase G1 i estableix cohesió al mateix temps que té lloc la replicació. La unió física entre les cromàtides germanes es manté a G2 i desapareix a la mitosi. La majoria de cohesines es dissocien de la cromatina durant la profase en un procés regulat per les quinases Aurora B i Polo, mentre que una petita part localitzada preferentment a l'heterocromatina pericentromèrica es manté en els cromosomes condensats fins l'anafase, gràcies a la protecció de les cohesines d'aquesta regió per part la sugosina i la fosfatasa 2A (PP2A). Les cohesines són essencials per evitar la separació prematura de les cromàtides germanes, i són eliminades mitjançant el trencament per la separasa després de l'activació per l'APC/C (revisat per Losada i Hirano, ((2005; Nasmyth i Haering, 2005).

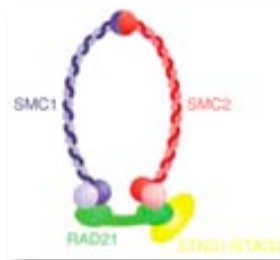


Figura 1.2. Estructura en forma d'anell d'una cohesina mitòtica.

Mentrestant, ha entrat en acció un altre element important. Aquest és el centrosoma, una zona petita de material dens que es localitza al costat del nucli. El centrosoma és el centre organitzador de microtúbuls més important per l'assemblatge d'aquests. Es duplica abans de la mitosi (habitualment durant la fase S) i al començament de la profase els dos

centrosomes se separen i comencen a dirigir-se cap a extrems oposats. A mesura que es mouen, cada centrosoma actua com un centre de nucleació per l'assemblatge dels microtúbuls, i la regió que es troba entre dos centrosomes comença a omplir-se de microtúbuls en creixement que formaran el fus mitòtic, l'estructura que distribuirà més tard els cromosomes en les cèl·lules filles. Durant aquest procés, els microtúbuls del citoesquelet es despolimeritzen, i les seves subunitats de tubulina s'incorporen al fus mitòtic en creixement. Al mateix temps, es forma en les immediacions de cada centrosoma un conjunt dens de microtúbuls radials denominat àster.

Al centrosoma de les cèl·lules animals, es troben immerses un parell d'estructures petites i cilíndriques, formades per microtúbuls, que s'anomenen centríols, i que normalment s'orienten formant un angle recte una respecte l'altra. Els centríols no són essencials pel desenvolupament de la mitosi ja que no són presents en alguns tipus cel·lulars, com en els vegetals superiors. No obstant, participen en la formació de cilis i flagels.

Encara que els centrosomes estan implicats en la nucleació del fus mitòtic en la majoria de cèl·lules animals, les cèl·lules dels vegetals superiors, així com cèl·lules meiótiques de molts animals, formen fusos sense la intervenció dels centrosomes. És més, en determinats experiments en els que s'han destruït els centrosomes sotmetent-los a microradiació làser, s'ha comprovat, que les cèl·lules que normalment posseeixen centrosomes, poden formar fusos mitjançant un mecanisme independent del centrosoma. En aquests casos, es pensa que són els propis cromosomes mitòtics els que promouen l'assemblatge i l'estabilització dels microtúbuls. Alguns estudis suggereixen que els centrosomes faciliten l'orientació del fus dins de la cèl·lula, que a la seva vegada determina la posició del pla de segmentació que finalment la dividirà.

Paral·lelament, algunes proteïnes del punt de control de la mitosi, com la BUB1 i BUBR1, s'uneixen als cinetocors.

Prometafase

L'inici de la prometafase el marca la fragmentació de l'embolcall nuclear. A mesura que els centrosomes completen el seu viatge cap a llocs oposats del nucli, la ruptura de l'embolcall nuclear permet als microtúbuls

entrar a la zona del nucli i contactar amb els cromosomes, que, en aquesta etapa, encara estan formats per dues cromàtides germanes. Els microtúbuls del fus s'uneixen a les dues cromàtides pel centròmer, una constricció en cada cromàtide, format per una seqüència repetida de DNA, denominada seqüència CEN. Enlloc d'unir-se directament a les seqüències CEN, els microtúbuls del fus s'uneixen a una estructura proteica associada al centròmer anomenada cinetocor. Les proteïnes del cinetocor comencen a associar-se al DNA poc després de que es repliqui durant la fase S, i es van afegint seqüencialment, fins formar el cinetocor madur. Cada cromosoma disposa al final de dos cinetocors situats en posicions oposades, cada un d'ells associat amb una de les cromàtides. Durant la prometafase, els microtúbuls del fus s'uneixen als cinetocors, unint els cromosomes al fus. Els microtúbuls exerceixen, posteriorment, una força responsable del desplaçament gradual dels cromosomes cap al centre de la cèl·lula.

Tot i que la composició dels microtúbuls del fus és pràcticament idèntica, es poden classificar en tres tipus principals atenent a les estructures amb les que interaccionen els seus extrems. Aquells que estan units als cinetocors dels cromosomes es denominen microtúbuls del cinetocor; els que interaccionen amb els microtúbuls del pol oposat de la cèl·lula, s'anomenen microtúbuls polars; i els més petits, que formen l'àster en cada pol es coneixen com a microtúbuls de l'àster. Alguns dels microtúbuls de l'àster semblen interaccionar amb proteïnes de la membrana plasmàtica.

Metafase

Es diu que la cèl·lula està a metafase, quan els cromosomes, que es troben en el seu màxim grau de condensació, s'alineen a la placa metafàsica, que és el pla equidistant entre els dos pols del fus mitòtic. La cèl·lula fa una pausa a la metafase, d'uns 20 minuts dels 60 que dura aproximadament la mitosi.

Els cromosomes semblen estar relativament quiets durant la metafase, però aquesta aparença és enganyosa. De fet, les dues cromàtides germanes de cada cromosoma ja estan sent arrossegades cap a pols oposats. Sembla que estiguin quiets perquè les forces que actuen sobre ells són de la mateixa magnitud i sentit oposat.

Anafase

Habitualment, és la fase més curta de la mitosi i dura uns pocs minuts. Al començament de l'anafase, les dues cromàtides filles de cada cromosoma se separen abruptament i comencen a moure's cap a pols oposats del fus, a una velocitat aproximada d'1 $\mu\text{m}/\text{min}$.

L'anafase es caracteritza per dos tipus de moviments, denominats anafase A i anafase B. A l'anafase A, els cromosomes, amb el centròmer per davant, són empesos cap als pols del fus a mesura que els microtúbuls del cinetocor es fan progressivament més curts. A l'anafase B, els mateixos pols se separen un de l'altre a mesura que els microtúbuls polars s'allarguen. Dependent del tipus cel·lular, l'anafase A i B poden tenir lloc simultàniament, o l'anafase B després de l'anafase A.

Telofase

Al començament de la telofase, les cromàtides filles ja han arribat als pols del fus. En aquest punt, es descondensen i tornen a adoptar l'aparença homogènia de les fibres esteses de la cromatina de la interfase. Al mateix temps, el nuclèol es desenvolupa en els organitzadors nucleolars del DNA, el fus es desacobla i reapareix l'embolcall nuclear, al voltant dels dos grups de cromosomes fills, completant-se així el procés mitòtic. Durant aquest període, la cèl·lula acostuma a experimentar la citocinesi, que divideix la cèl·lula en dues cèl·lules filles.

Punts de control del cicle cel·lular

La seqüència d'esdeveniments del cicle cel·lular està regulada per un sistema de control que vigila cadascun dels passos que realitza la cèl·lula per completar el cicle, de manera que, si no es compleixen les condicions per passar a la següent etapa, el cicle s'atura. Existeixen tres transicions principals: 1) de G1 a S, o inici de la proliferació (també anomenat punt de restricció); 2) de G2 a M, o inici de la mitosi; i 3) de metafase a l'anafase, o inici de la segregació cromosòmica.

Punt de control de la fase G1

La fase G1 és la més variable entre tots els tipus cel·lulars, i les cèl·lules de mamífers que han deixat de dividir-se, queden aturades en aquesta fase. El pas de la fase G1 a la fase S s'anomena punt de restricció. La capacitat de traspasar el punt de restricció ve determinat per varis factors, com són la mida de la cèl·lula, la disponibilitat de nutrients i la presència de factors de creixement, que indiquin la necessitat de proliferació cel·lular. Les cèl·lules que han passat amb èxit aquest punt de restricció, entren a la fase S, mentre que les que no el passen, entren a G0 i romanen allà durant períodes variables, esperant un senyal que els permeti tornar a entrar a G1 i passar el punt de restricció.

Aquests senyals exerceixen els seus efectes activant la CDK-ciclina (CDK, *cyclin dependent kinase*) de G1, l'activitat de la qual fa que la cèl·lula traspassi el punt de restricció mitjançant la fosforilació de diverses proteïnes diana. Una de les dianes més importants és la proteïna RB, una molècula que controla l'expressió de gens el producte dels quals és necessari per traspasar el punt de restricció i entrar a la fase S.

En el seu estat normal, l'RB es troba desfosforilada, i s'uneix al factor de transcripció E2F (figura 1.3). Aquesta unió impedeix que l'E2F activi la transcripció de gens que codifiquen proteïnes necessàries per la replicació del DNA, que constitueixen un requisit previ al pas de la cèl·lula a través del punt de restricció i l'entrada a la fase S. En aquelles cèl·lules que han estat estimulades amb factors de creixement, s'activa la ruta RAS, que comporta la producció i activació d'un complex CDK-ciclina que catalitza la fosforilació d'RB. L'RB fosforilada ja no pot unir-se a l'E2F, permetent així que l'E2F activi la transcripció gènica i s'iniciï la fase S. Durant la següent fase M, la proteïna es desfosforila i pot tornar a inhibir a l'E2F.

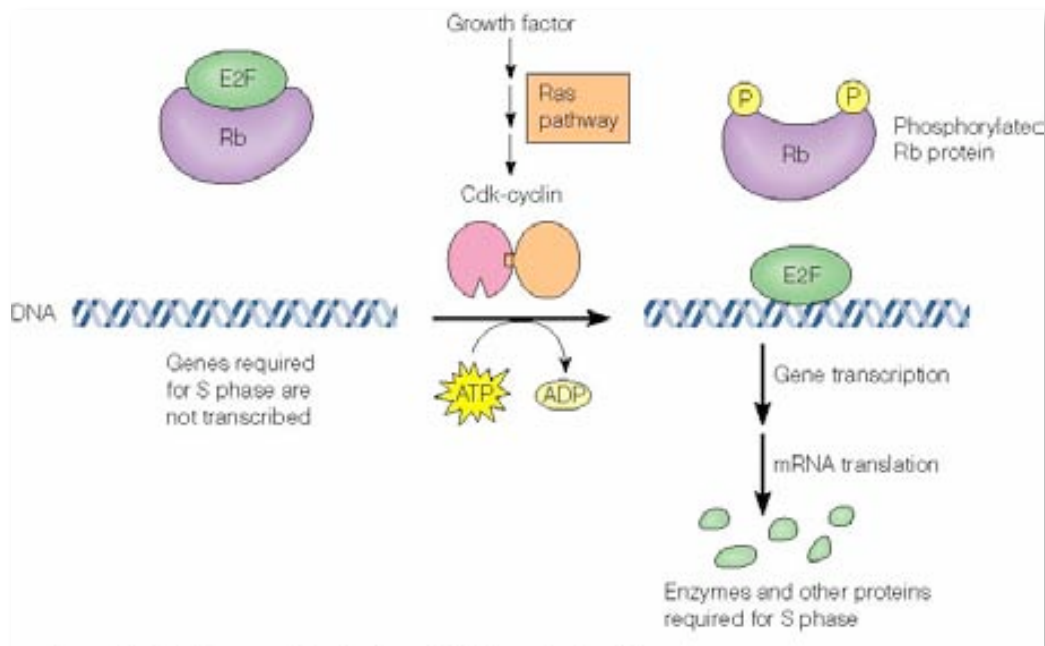


Figura 1.3. Funció de la proteïna RB en el control del cicle cel·lular (extreta de Becker *et al.* (2007)).

Punt de control de la transició G2-M

Aquest punt de control està relacionat amb el compromís d'entrar a la fase M. El factor que permet la transició de la fase G2 a l'M és l'MPF (*maturation-promoting factor* o *mitosis-promoting factor*), i està format per dues subunitats: la CDK1 i la ciclina B. L'activitat de l'MPF ve regulada per canvis en la concentració de la ciclina B al llarg del cicle cel·lular. La concentració de la ciclina B va augmentant gradualment durant G1, S i G2; al final de la fase G2 arriba a una llindar crític, que li permet activar la CDK1 i desencadenar, per tant, l'inici de la mitosi (figura 1.4). A la meitat de la mitosi, les molècules de ciclina B són destruïdes ràpidament. El descens de l'activitat de la CDK1 resultant, evita que tingui lloc una altra mitosi fins que la concentració de la ciclina B torni a augmentar durant el següent cicle cel·lular.

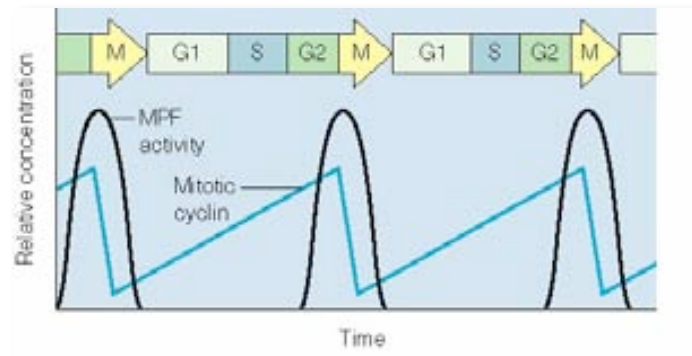


Figura 1.4. Variació en la concentració de la ciclina mitòtica i de l'activitat de l'MPF durant el cicle cel·lular (extreta de Becker *et al.* (2007)).

A més a més de la ciclina B, l'activació de la CDK1 també requereix la fosforilació i desfosforilació de la pròpia CDK1. La unió de la ciclina B a la CDK1 produeix un complex ciclina B-CDK1 que és inactiu. Per desencadenar la mitosi, cal que s'incorpori un grup fosfat en un determinat aminoàcid de la CDK1.

La CDK1-ciclina B provoca l'entrada a la mitosi, i hi participa fosforilant components dels processos primerencs com són la condensació dels cromosomes, la formació del fus mitòtic i la desorganització de l'embolcall nuclear.

El sistema de control de la replicació del DNA, controla l'estat de la replicació del mateix, per assegurar que la seva síntesi sigui completa, abans de permetre que la cèl·lula surti de G2 i comenci la mitosi. Si la replicació no és completa, es bloqueja l'activació de la CDK1-ciclina B, i s'atura el cicle cel·lular a final de G2 fins que s'hagi completat la replicació del DNA.

Punt de control mitòtic

També s'anomena punt de control del fus o punt de control de la transició de metafase a anafase.

L'objectiu és segregar els cromosomes en dues cèl·lules filles i sortir de la mitosi. Abans que la cèl·lula traspassi aquest punt de transició i comenci l'anafase, és important que tots els cromosomes es trobin units al fus. Si les dues cromàtides que conformen cada cromosoma no estan unides adequadament a pols oposats del fus, el cicle cel·lular s'aturarà momentàniament per permetre que es produeixi aquesta unió. En absència

d'aquest mecanisme no existeixen garanties de que cada cèl·lula filla rebi un joc complet de cromosomes.

La progressió mitòtica i la segregació de les cromàtides germanes estan controlades pel complex promotor de l'anafase/ciclosoma (APC/C, *anaphase-promoting complex/cyclosome*), una lligasa d'ubiquïtina E3. L'activitat de l'APC/C requereix un factor específic, el CDC20 (*cell-division-cycle 20 homologue*), per tal de reconèixer i interaccionar amb els substrats mitòtics. L'APC/C degrada la ciclina B1 i la segurina (també identificada com a *pituitary tumour transforming gene 1, PTTG1* (Pei i Melmed, 1997)). (figura 1.5). La degradació de la segurina comporta l'activació de la separasa, la qual trencarà la cohesina que manté unides les cromàtides germanes. La degradació de la ciclina B1, causa la inactivació de la CDK1 i s'inicia la sortida de la mitosi.

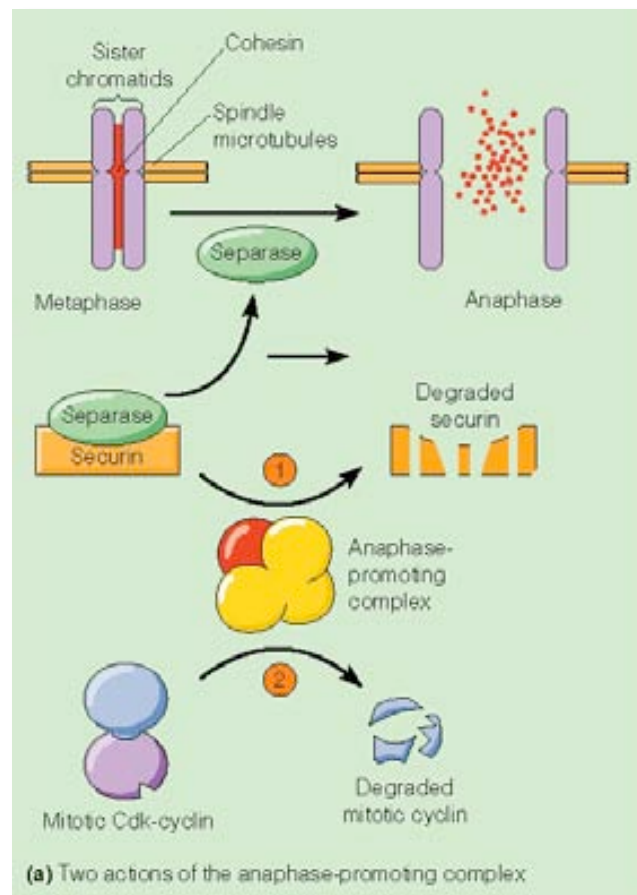


Figura 1.5. Accions del complex promotor de l'anafase (extreta de Becker *et al.* (2007)).

Aquests esdeveniments proteolítics estan controlats pel punt de control mitòtic, el principal punt de control del cicle cel·lular a la mitosi. Aquest punt de control evita l'avançament prematur cap a anafase i, en

vertebrats, està activat en tot els cicles cel·lulars immediatament després de l'entrada a la mitosi o a la meiosi. Els generadors de senyals d'aquest punt de control són els cinetocors no units. Això recluta els components del punt de control mitòtic i converteix i allibera catalíticament algun d'aquests components en forma (o formes) que inhibeixen el reconeixement, dependent de la CDC20, de la ciclina B1 i la segurina per part de l'APC/C, evitant el pas cap a anafase (Cleveland *et al.*, 2003).

Els components del punt de control mitòtic en vertebrats són: MAD 1-2 (*mitotic arrest deficient 1-2*), BUB3 (*budding unhibited by benzimidazole 3*), MSP1 (*monopolar spindle 1*), la quinasa BUBR1, el complex proteic ZW10-ROD-zwilch, la proteïna motora dels microtúbuls CENPE (*centromere protein E*) i la MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Minshull *et al.*, 1994; Li i Benezra, 1996; Jin *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 1999; Abrieu *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2000; Abrieu *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2003). Alguns dels components del punt de control (incloent MAD2, BUBR1, BUB3, MPS1) són ràpidament atrapats per i alliberats dels cinetocors no units (Howell *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2004) que catalíticament produeixen i alliberen l'inhibidor d'anafase. La composició exacte de l'inhibidor, o inhibidors, derivat del cinetocor encara no ha estat establerta. Hi ha evidències que indiquen que podria haver una conformació alternativa del MAD2 (Fang *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 2004; De Antoni *et al.*, 2005) o de la BUBR1 (Tang *et al.*, 2001; Fang, 2002), ambdós s'uneixen directament al CDC20. El model actual del punt de control mitòtic dels vertebrats es presenta a la figura 1.6. Després del trencament de l'embolcall nuclear, les proteïnes del punt de control són reclutades a la superfície del cinetocor exterior de tots els cromosomes que no estiguin units. La unió directa de la proteïna motora dels microtúbuls unida al cinetocor, CENPE, a la BUBR1 activa l'activitat quinasa de la BUBR1 (figura 1.6a) (Mao *et al.*, 2003). L'activitat quinasa de la BUBR1 és necessària pel reclutament de l'heterodímer estable MAD1-MAD2, el qual, en combinació amb altres components essencials del punt de control, recluten i modifiquen la MAD2 en la seva conformació activa (Chan *et al.*, 1999; Mao *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2004). La MAD2 activada i/o la BUBR1, possiblement formant un complex amb la BUB3, s'associa estretament amb la CDC20, evitant que s'activi l'APC/C i així inhibint la ubiquïtinització de la segurina i la ciclina B1

(figura 1.6a) (Fang *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 1998; Kallio *et al.*, 1998; Sudakin *et al.*, 2001).

Es necessiten molts més components per produir el senyal inhibidor. L'eliminació de l'activitat quinasa de BUB1 o MSP1 afebleix o elimina el senyal del punt de control mitòtic o evita el reclutament d'altres proteïnes del punt de control per part del cinetocor (Abrieu *et al.*, 2001; Chen, 2004). Hi ha d'altres contribucions, probablement a través de la participació indirecta, de la xaperonina CCT, la MAPK, la fosfatasa GLC7/PP1, i proteïnes cromosòmiques "passatgeres" com la quinasa Aurora B i la survivina (Minshull *et al.*, 1994; Sassoon *et al.*, 1999; Camasses *et al.*, 2003; Ditchfield *et al.*, 2003; Lens *et al.*, 2003). El paper de la quinasa Aurora B és d'interès particular perquè la seva funció unifica visions oposades sobre el què detecta el punt de control – la falta d'unió o la falta de tensió. La tensió entre els centròmers germans s'aconsegueix normalment per la força de les unions bipolars que tiben els cinetocors germans en direcció contrària, les quals són contrarestades per la cohesió centromèrica. L'activitat quinasa de l'Aurora B desfà les unions dels microtúbuls incorrectes que no generen tensió entre els centròmers germans (Tanaka *et al.*, 2002; Ditchfield *et al.*, 2003; Hauf *et al.*, 2003; Lampson i Kapoor, 2005). Això crea cinetocors no units que poden generar la inhibició del punt de control mitòtic (Ditchfield *et al.*, 2003). La captura de microtúbuls – que és mediada, com a mínim en part, per la CENPE (Putkey *et al.*, 2002; Weaver *et al.*, 2003) – és l'esdeveniment de transducció de senyal més important ja que silencia la producció del complex inhibidor (figura 1.6b) (Mao *et al.*, 2003). El reciclatge intrínsec del complex inhibidor (probablement ajudat per el p31^{comet}/CMT2, el qual s'uneix a les molècules MAD2 actives impedit la seva unió a la CDC20 (Habu *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2004)) es basa en el reconeixement de la segurina i la ciclina B1 per part de la CDC20-APC/C (figura 1.6c).

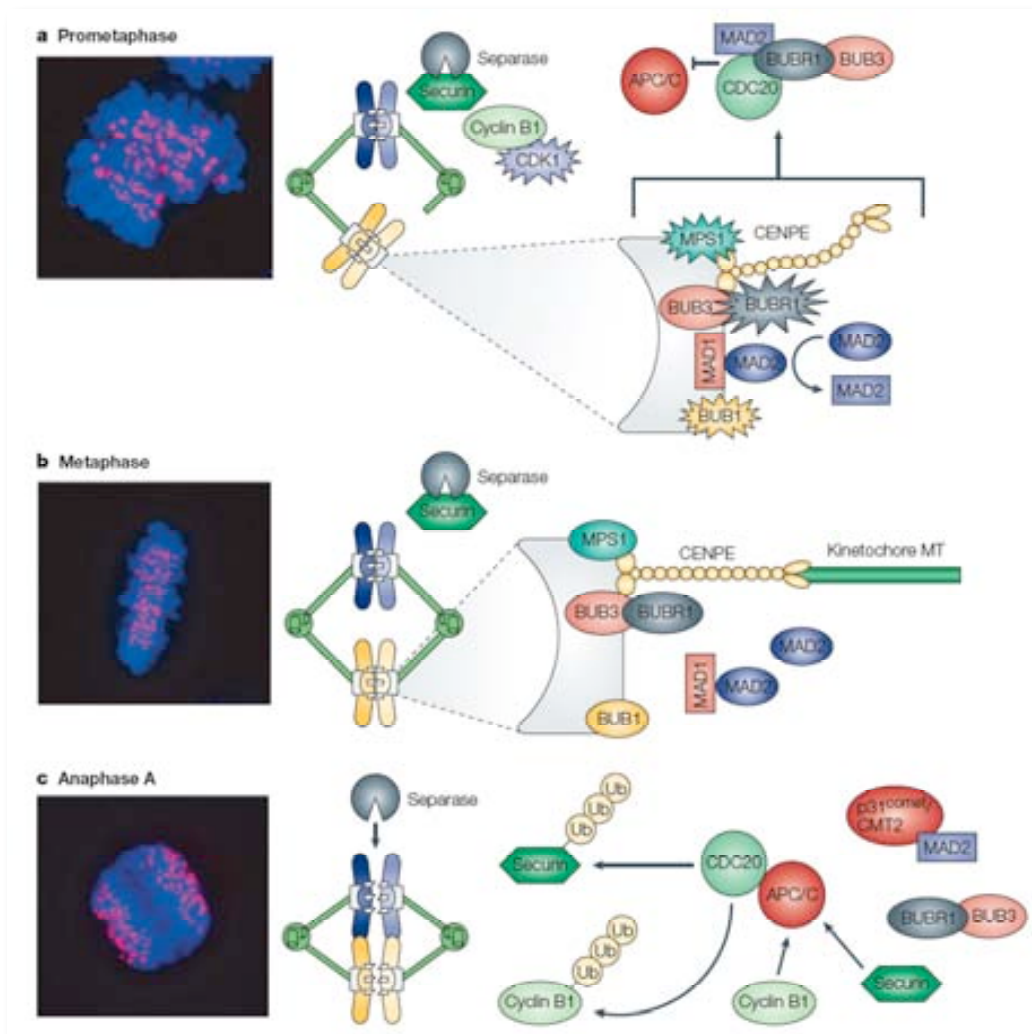


Figura 1.6. Punt de control mitòtic: senyalització i silenciament. a) activació del punt de control a prometafase per la no unió de microtúbuls a algun cinetocor, b) un cop cada cinetocor està unit als microtúbuls i es genera tensió entre els cinetocors de les cromàtides germanes, se silencia el punt de control a metafase, c) llavors la degradació de la securina permetrà que la separasa degradi les cohesines, i la degradació de la ciclina B1 permetrà l'entrada a l'anafase. A les imatges de l'esquerra el DNA està tenyit amb DAPI i en vermell estan marcats els cinetocors (extreta de Kops *et al.* (2005)).

Punt de control del DNA danyat

Aquest mecanisme impedeix que les cèl·lules amb el DNA danyat progressin en el cicle a no ser que es repari primer el dany. En aquest cas, existeixen múltiples punts de control del DNA danyat que revisen l'existència d'alteracions i que aturen el cicle en les fases G1 tardana, S o G2, gràcies a la inhibició de complexos CDK-ciclina diferents. La proteïna p53 té un paper molt important en aquestes rutes de control. Quan les cèl·lules es troben amb agents que produeixen un dany important al DNA, aquest provoca l'activació de la proteïna quinasa ATM, la qual fosforila a p53 entre d'altres moltes proteïnes diana (figura 1.7). La fosforilació de la

p53 impedeix la seva interacció amb MDM2, una proteïna que d'una altra manera marcaria a p53 per la seva destrucció, afegint ubiquïtina (de la mateixa manera que el complex promotor de l'anafase marca a proteïnes per la seva degradació provocant la seva unió a ubiquïtina). La fosforilació de p53, mediada per ATM, la protegeix de la seva degradació, permetent que augmenti la p53 en presència de DNA danyat.

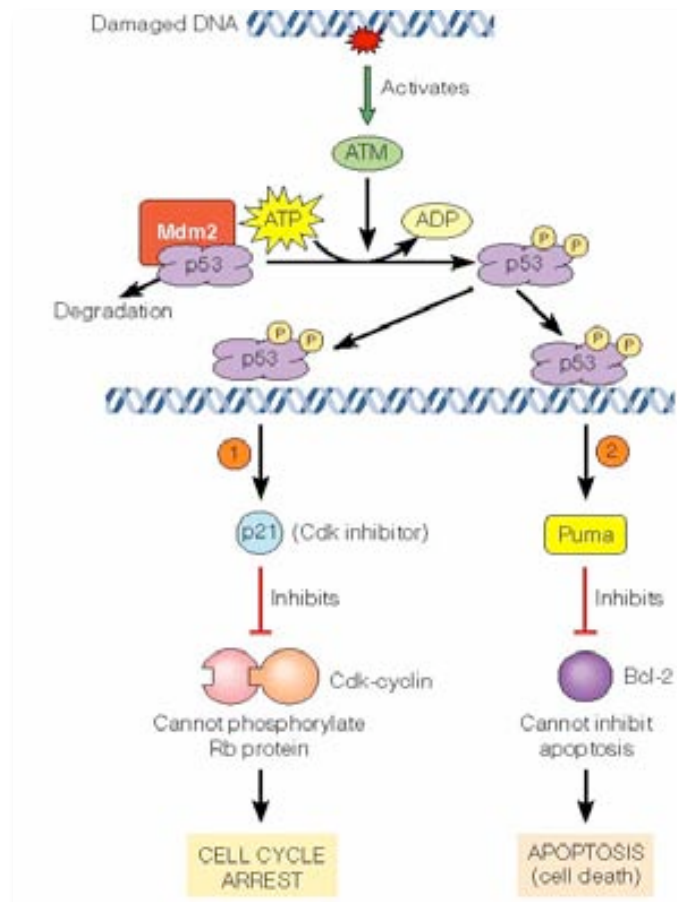


Figura 1.7. Paper de la proteïna p53 en la resposta al dany al DNA. Activació de dos processos, 1) l'aturada del cicle cel·lular i 2) la mort cel·lular programada (extreta de Becker *et al.* (2007)).

L'acumulació de p53 activa dos processos alhora: la detenció del cicle cel·lular i la mort cel·lular programada (figura 1.7). Ambdues respostes es basen en la capacitat de p53 d'unir-se al DNA i d'actuar com un factor de transcripció que estimula la transcripció de gens específics. Un dels gens clau activats per p53 és el gen que codifica a p21, una proteïna que atura la progressió del cicle cel·lular en múltiples punts inhibint l'activitat de diverses CDK-ciclins diferents. La p53 fosforilada també estimula la producció

d'enzims implicats en la reparació del DNA. Però si el dany no pot ser reparat amb èxit, la p53 activa llavors un grup de gens que codifiquen per proteïnes implicades en desencadenar la mort cel·lular per apoptosi mitjançant la repressió del gen BCL-2, o l'activació dels gens BAD, BAX i BAK i del receptor del lligand Fas (un receptor que a l'unir-se al lligand Fas de la superfície cel·lular causa apoptosi). Una proteïna clau en aquesta ruta, anomenada PUMA ("modulador de l'apoptosi regulada a l'alça per p53"), promou l'apoptosi unint-se i inactivant a un inhibidor comú de l'apoptosi, el BCL-2.

En els fibroblasts humans i en moltes altres cèl·lules somàtiques que no tenen telomerasa, els telòmers s'escurcen en cada divisió, i aquest dany activa la p53, que atura el cicle cel·lular.

La majoria de proteïnes dels punts de control estan conservades estructuralment i funcionalment al llarg de l'evolució. Les proteïnes del punt de control del dany al DNA poden participar en un o més punts de control que responen al dany al DNA de la fase G1/S, la fase S i la fase G2/M. Algunes d'aquestes proteïnes també són necessàries pel punt de control de la replicació de la fase S que coordina el final de la fase S amb l'inici de la mitosi.

Meiosi

La meiosi és un tipus de divisió especialitzada en la que el nombre de cromosomes es redueix a la meitat, i té lloc en el procés de formació dels gàmetes. La reducció del nombre de cromosomes s'aconsegueix amb una ronda de replicació del DNA seguida de dues rondes de segregació cromosòmica sense que hi hagi una ronda de replicació de DNA entremig. Per la primera divisió nuclear, els cromosomes homòlegs s'han de trobar entre ells i aparellar-se per tal que pugui tenir lloc la divisió reduccional. Després de l'aparellament dels cromosomes, té lloc la recombinació i la sinapsi, el què permet tant l'intercanvi genètic com la unió física dels dos cromosomes homòlegs fins a la metafase de la primera divisió cel·lular. Tots aquests esdeveniments tenen lloc a la profase meiòtica i fa que es puguin diferenciar cinc estadis: leptotè, zigotè, paquitè, diplotè i diacinesi.

Regulació de la transició de la fase G1-S meiótica

La decisió d'entrar al cicle cel·lular meiótic ocorre en resposta a unes indicacions que varien enormement entre els diferents organismes. En organismes multicel·lulars, unes indicacions extrínseques de les cèl·lules del voltant controlen la diferenciació de les cèl·lules mare de la línia germinal que entraran al cicle cel·lular meiótic. Els mecanismes moleculars que regulen aquest procés de diferenciació són desconeguts (Hubner *et al.*, 2003; Toyooka *et al.*, 2003; Geijsen *et al.*, 2004). La decisió d'entrar al cicle cel·lular meiótic es pren a la fase G1 i aquesta afecta a la manera com es controla la transició G1-S.

Fase S premeiótica

La replicació premeiótica del DNA s'assembla a la fase S premitòtica en molts aspectes. S'utilitzen els mateixos orígens de replicació i la mateixa maquinària de replicació i les forques de replicació progressen a una taxa similar. Tot i així, hi ha diferències com per exemple la durada, ja que la fase S premeiótica és substancialment més llarga que la fase S premitòtica en tots els organismes analitzats fins ara, com també la utilització de factors addicionals durant la fase S premeiótica, i la presència de la proteïna SPO11. Aquest enzim provoca trencaments de la doble cadena (DSBs, *double strand breaks*) de DNA després de la replicació, però aparentment ja s'associa a la cromatina durant la fase S premeiótica.

Tant a la mitosi com a la meiosi, per una correcta replicació del DNA cal l'establiment de cohesió entre les cromàtides germanes. Aquesta cohesió s'aconsegueix mitjançant un complex proteic, anomenat cohesina que té una estructura en forma d'anell que encercla a les dues cromàtides germanes (Gruber *et al.*, 2003) (figura 1.8). La composició d'aquest complex varia lleugerament de la mitosi i la meiosi. A la mitosi està format per les proteïnes SMC1, SMC3, RAD21, STAG1 i STAG2, mentre que a la meiosi per SMC1 β , SMC3, REC8 i STAG3, tot i que també estan presents la RAD21 i l'STAG2 mitòtiques (Eijpe *et al.*, 2000a; Eijpe *et al.*, 2000b; Prieto *et al.*, 2001; Prieto *et al.*, 2002; Eijpe *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2004)

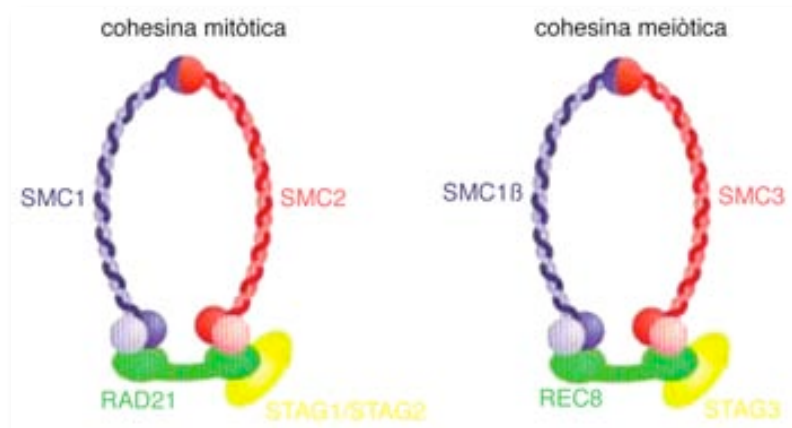


Figura 1.8. Estructura de les cohesines. A l'esquerra un esquema d'una cohesina mitòtica i a la dreta un d'una cohesina meiótica.

Profase

La profase meiótica està definida per un estat de baixa activitat de la CDK meiótica. Durant aquest estat del cicle cel·lular, es generen lligams entre les parelles d'homòlegs per assegurar el seu coalineament al fus de la meiosi I quan es prepari per la segregació durant la metafase I. Pels cromosomes de molts organismes, tot i que no de tots, aquest lligam s'aconsegueix com a mínim amb un quiasma, que es genera com a resultat de la recombinació meiótica entre els cromosomes homòlegs.

A l'inici de la profase meiótica cada cromosoma busca el seu homòleg. Durant aquesta recerca, els telòmers de tots els cromosomes es concentren en un punt del nucli, formant una estructura anomenada "bouquet" que és visible a l'estadi de leptotè (revisat per Scherthan (2001)). Aquesta disposició facilita l'apropament dels cromosomes i, per tant, la comparació de la seqüència de DNA per buscar homologies. En llevats, *Arabidopsis thaliana*, ratolins i humans l'aparellament té lloc amb l'aparició de trencaments de la doble cadena de DNA (revisat a Gerton i Hawley, (2005)). Un cop aparellats, s'iniciarà la recombinació per reparar els DSBs i al seu voltant s'estructurarà el complex sinapteinemal (revisat per Heyting (1996)) que és una estructura proteica que mantindrà units els cromosomes homòlegs fins que acabi la recombinació a paquitè.

A leptotè, a cada cromosoma es forma un eix proteic, anomenat element axial, on s'hi unirà la cromatina de cada cromàtide germana en forma de llaços. L'element axial de leptotè acabarà sent l'element lateral del complex sinapteinemal (SC), quan a partir de zigotè es comenci a formar

aquest, amb l'aparició d'uns filaments transversals que connectaran els elements axials dels dos cromosomes homòlegs, tipus cremallera. Els principals components del SC són les proteïnes SYCP1, SYCP2 i SYCP3 (Meuwissen *et al.*, 1992; Lammers *et al.*, 1994; Offenbergh *et al.*, 1998). La SYCP2 i la SYCP3 són components dels elements axials o laterals mentre que la SYCP1 és part dels filaments transversals i només està present a les regions dels cromosomes que estan en sinapsi. A paquitè el SC està completament format. En espermatòcits, els cromosomes X i Y només poden aparellar-se a les petites regions pseudoautosòmiques, i per tant, només trobarem SYCP1 en aquestes regions i en la resta de cromosoma veurem uns eixos proteics més prim.

Els DSBs apareixen abans que comenci la sinapsi dels cromosomes homòlegs (Borde *et al.*, 2000; Cervantes *et al.*, 2000; Mahadevaiah *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2001). En *Sacharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* i en mamífers, una forma especialitzada de la histona H2A, l'H2AX es fosforila en els llocs que hi ha hagut DSBs (Rogakou *et al.*, 1998; Rogakou *et al.*, 1999), i llavors rep el nom d'histona γ -H2AX. Aquesta fosforilació ve mediada per proteïnes que detecten dany al DNA (per exemple: ATM, ATR, ATX i DNA-PK), i facilita l'acumulació de proteïnes de reparació del DNA. Utilitzant anticossos per aquesta proteïna en espermatòcits de ratolí s'ha vist que els DSBs apareixen a leptotè, just després de la fase S (Mahadevaiah *et al.*, 2001). Però la γ -H2AX no només presenta un patró dependent d'SPO11, sinó que també es localitza en el parell XY a paquitè, on intervé en processos de condensació cromosòmica i inactivació transcripcional (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004). El nombre de DSBs excedeix el nombre d'entrecreuaments; en el ratolí 300-400 DSBs acabaran resultant en 20-30 entrecreuaments (Moens *et al.*, 1997).

La recombinació meiòtica s'aconsegueix amb la introducció de DSBs d'una manera controlada per part de la SPO11 (Bergerat *et al.*, 1997; Keeney *et al.*, 1997). Per reparar aquests DSBs un complex proteic format per RAD50/MRE11/NBS amb activitat exonucleasa 5'→3' deixarà extrems 3' lliures de cadena senzilla (ssDNA). Després s'hi uniran RAD51/DMC1 per buscar homologia en una cromàtide homòloga (Hunter i Kleckner, 2001), i llavors la RAD51/DMC1 serà reemplaçada per la RPA. En aquests punts també s'hi uneix l'helicasa BLM. Finalment intervindrà una polimerasa i una

l·ligasa i s'hauran format dues unions de Holliday, on s'hi unirà l'heterodímer proteic MSH4-MSH5 (Snowden *et al.*, 2004), que és essencial perquè en estadis posteriors el sistema de reparació de malaparellaments (MMR, *mismatch repair*) actuï correctament (Cohen i Pollard, 2001). En funció de com es resolguin aquestes unions es poden donar dos productes de recombinació diferents: amb entrecreuament, en el que té lloc un intercanvi recíproc entre cromàtides homòlogues, o sense entrecreuaments, en el que no hi ha hagut un intercanvi recíproc. Només els entrecreuaments comportaran la unió de les parelles d'homòlegs i és on hi haurà participat l'heterodímer MLH1-MLH3, també pertanyent al sistema de MMR. Mutacions a l'*Spo11* de ratolins comporta un bloqueig primerenc de la meiosi tant en mascles com en femelles (Romanienko i Camerini-Otero, 2000).

La recombinació causa un dany sever al DNA. Per tant, és essencial que la segregació cromosòmica de la meiosi I no avanci fins que tot el dany al DNA s'hagi reparat. Un o més mecanismes de supervivència assegurin que així sigui (Roeder i Bailis, 2000). El punt de control de recombinació, o de paquitè, és un d'aquests mecanismes de supervivència. S'activa al mateix temps, o just després, de la formació dels DSBs i atura l'entrada a metafase I fins que els DSBs s'hagin reparat. Aquest punt de control està molt ben caracteritzat en llevats (Murakami i Nurse, 2000; Roeder i Bailis, 2000) i és probable que existeixi en d'altres organismes, ja que espermatòcits i oòcits de ratolí que són deficients pel factor de recombinació DMC1, i llavors no poden reparar els DSBs, queden aturats a la profase (Pittman *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998). El punt de control de la recombinació evita l'entrada a metafase I inhibint l'activació de la CDK meiòtica.

Un cop s'han resolt les dobles unions de Holliday i s'han creat els entrecreuaments a finals de paquitè, el SC ja es pot desassemblar, els homòlegs es desinapsen, i es visualitzen els quiasmes, que són els punts on ha tingut lloc la recombinació recíproca. Aquest estadi, anomenat diplotè, és en el que els oòcits queden aturats per primera vegada. Després els cromosomes es van condensant a mesura que s'acosta la metafase I, i aquest estadi es coneix com a diacinesi. I a metafase I els bivalents (parelles de cromosomes homòlegs recombinats) s'alineen a la placa metafàsica.

Durant la profase I de la meiosi, es necessiten les cohesines per la formació del complex sinaptonemal i perquè tingui lloc la recombinació entre els cromosomes homòlegs enlloc d'entre les cromàtides germanes (Schwacha i Kleckner, 1997). Tot i que les cohesines són trencades i retirades dels braços dels cromosomes per la separasa a la metafase I, la sugosina protegeix les cohesines centromèriques fins a l'anafase II (Wang i Dai, 2005). Això assegura una correcta segregació dels cromosomes homòlegs a l'anafase I i de les cromàtides germanes a l'anafase II en cèl·lules filles separades.

Meiosi I: un esdeveniment de segregació únic

La meiosi I és un esdeveniment de segregació cromosòmica únic perquè se segrega la parella d'homòlegs, enlloc de les cromàtides germanes, com ocorre a la mitosi i a la meiosi II. Perquè aquesta segregació especialitzada tingui lloc i deixi les eines de segregació de les cromàtides germanes durant la meiosi II al seu lloc, la maquinària de segregació cromosòmica mitòtica s'ha de modificar de tres maneres (figura 1.9). Primer, les parelles d'homòlegs s'han de lligar, normalment amb quiasmes, per assegurar l'alineament al fus de la meiosi I. Segon, part de la cohesió entre les cromàtides germanes s'ha de mantenir passada la meiosi I per evitar la dissociació prematura i assegurar la seva correcta unió al fus de la meiosi II. Tercer, les cromàtides germanes s'han d'unir als microtúbuls que provenen del mateix pol del fus a la meiosi I, però de pols oposats a la meiosi II.

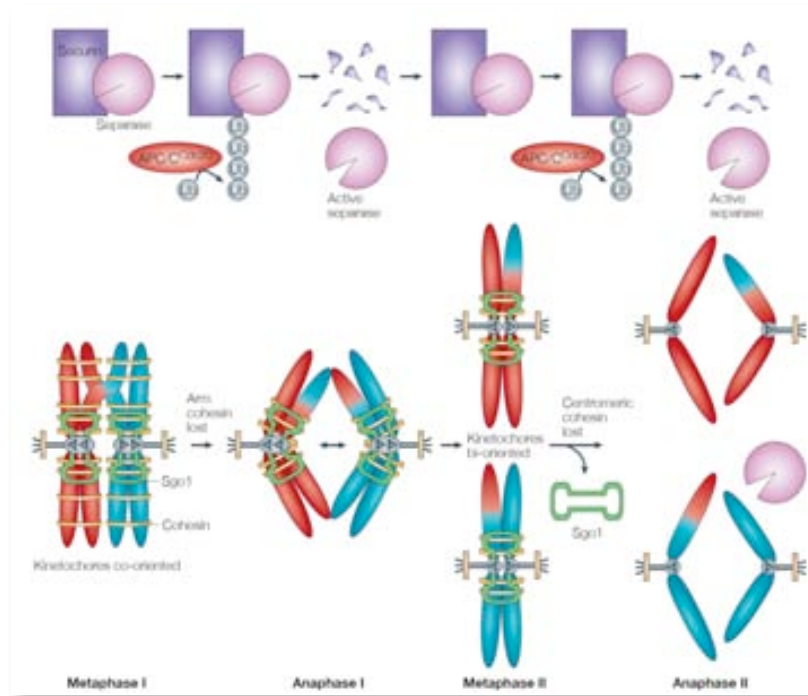


Figura 1.9. Model de segregació cromosòmica a la meiosi. Tres factors contribueixen a la segregació dels homòlegs a la meiosi I. Primer, els homòlegs (de color vermell i blau) presenten com a mínim un quiasme que els manté units. Segon, els cinetocors s'uneixen a microtúbuls que provenen del mateix pol (coorientació, indicat per la direcció de les fletxes en els cinetocors germans). I tercer, les cromàtides germanes es mantenen unides pels anells de cohesines (en groc). A la transició metafase I-anafase I, la separasa (en rosa) degradarà les cohesines dels braços, però no les de les regions pericentromèriques que estan protegides per la SGO1 (en verd). A la metafase II s'eliminarà la SGO1 i es podran eliminar les cohesines centromèriques permetent la segregació de les cromàtides germanes a l'anafase II. (Extreta de Marston i Amon (2004)).

Els quiasmes es generen com a resultat de la recombinació recíproca entre les parelles d'homòlegs, i els mantenen units. Això permet als bivalents alinear-se correctament al fus de la meiosi I. La cohesió de les cromàtides germanes en els braços dels cromosomes, distals als quiasmes, estabilitza les interaccions entre homòlegs que s'han mediat via els quiasmes. La pèrdua de la cohesió en els braços dels cromosomes és l'esdeveniment que es necessita per permetre la segregació d'un respecte l'altre durant la meiosi I (figura 1.9).

Com s'ha mencionat anteriorment, les cromàtides germanes, que s'han generat durant la fase S, es mantenen unides mitjançant les cohesines. Durant el cicle mitòtic i també el meiòtic, les cohesines s'uneixen al DNA durant la replicació per funcionar com a factors de cohesió (Uhlmann i Nasmyth, 1998; Watanabe *et al.*, 2001). Durant la mitosi, el trencament

d'una de les subunitats de les cohesines, la RAD21, per part d'una proteasa coneguda com a separasa inicia la segregació cromosòmica a la mitosi.

Durant la meiosi, l'existència de dues rondes consecutives de segregació cromosòmica requereix que la cohesió entre les cromàtides germanes es perdi de manera esglaonada. La pèrdua de la cohesió en els braços dels cromosomes a la meiosi I elimina el lligam entre les parelles d'homòlegs i permet que se separin a pols oposats del fus de la meiosi I. No obstant, la cohesió entre les cromàtides germanes es manté a les regions del voltant del centròmer per assegurar que no se separin abans de l'anafase II i promogui la unió correcta de les cromàtides germanes al fus de la meiosi II. La pèrdua esglaonada de la cohesió fa necessaris alguns canvis en el mateix complex de les cohesines i en la manera que és regulat.

Una modificació conservada del complex meiòtic de cohesines és la substitució de la subunitat RAD21 per una variant específica de meiosi, la REC8. S'ha vist que la REC8 desapareix dels braços dels cromosomes durant la meiosi I, i que és retinguda al voltant dels centròmers fins a la meiosi II en llevats (Klein *et al.*, 1999; Watanabe i Nurse, 1999), ratolins (Lee *et al.*, 2003) i rates (Eijpe *et al.*, 2003).

Hi ha una proteïna, la sugosina o SGO1 (Katis *et al.*, 2004; Kitajima *et al.*, 2004; Marston *et al.*, 2004), que es localitza a la regió centromèrica impedit la degradació de la REC8 per part de la separasa en aquesta zona a la meiosi I i que hi hagi una separació prematura de les cromàtides germanes. La protecció de la REC8 per part de la sugosina no es limita a la regió del centròmer, sinó que també està present a les zones adjacents (Kitajima *et al.*, 2004).

Meiosi I: coorientació dels cinetocors

Durant la mitosi, les cromàtides germanes s'uneixen als microtúbuls de pols oposats i són segregades una respecte l'altra abans de la divisió cel·lular. A la mitosi i la meiosi II, els cinetocors de les cromàtides germanes (cinetocors germans) s'han d'unir als microtúbuls de pols oposats – una situació que es coneix com a biorientació o unió amfitèlica (figura 1.10a). Tanmateix, a la meiosi I els cinetocors germans s'uneixen exclusivament als microtúbuls provinents del mateix pol per tal d'assegurar la seva cosegregació (figures 1.9 i 1.10b). Això s'anomena unió monopolar, i es diu

que els cinetocors germans estan coorientats o que tenen una unió sintètica. Els mecanismes moleculars per aquesta important modificació en la unió dels cinetocors es comencen a conèixer. S'han identificat diferents proteïnes implicades en promoure la coorientació durant la meiosi I en llevats, les quals formen un complex anomenat monopolina, que és necessari per la monoorientació de les cromàtides germanes (Toth *et al.*, 2000; Rabitsch *et al.*, 2003); i també en ratolins apareix un anell que envolta els cinetocors de les cromàtides germanes, format per MCAK i Aurora-B, i els manté junts fins a la metafase II (Parra *et al.*, 2006).

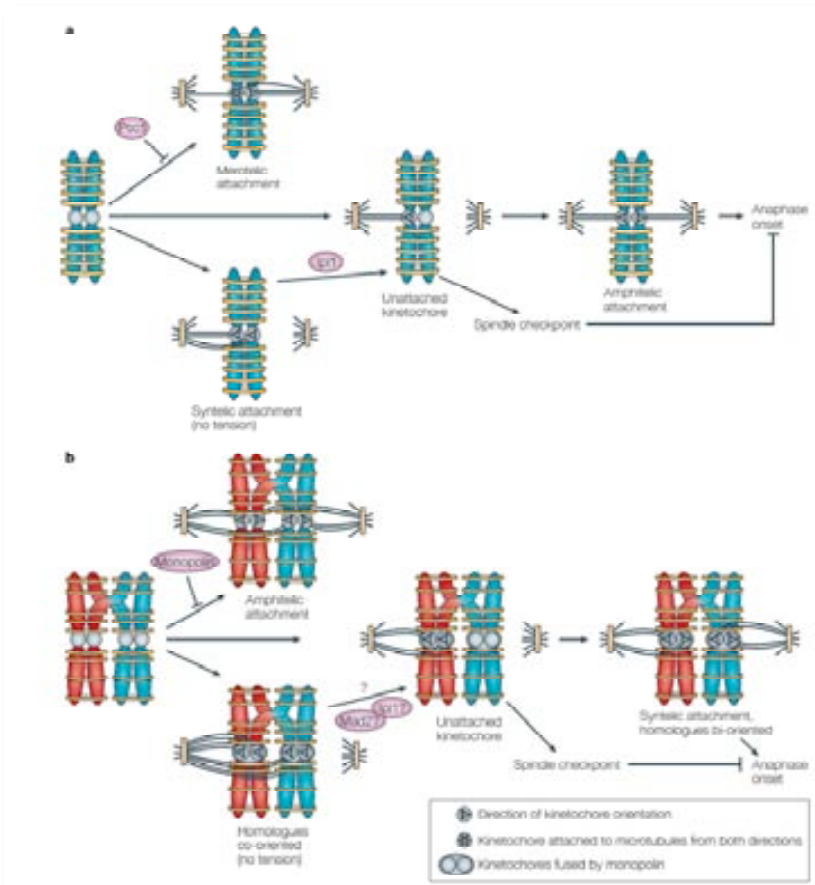


Figura 1.10. Orientació dels cinetocors a la mitosi i la meiosi. a) A la mitosi i la meiosi II, la Pcs1 de llevats de fissió evita la unió merotètica (la unió de microtúbuls procedents del dos pols en un mateix cinetocor) dels cinetocors als microtúbuls del fus. Els cinetocors no units activen el punt de control del fus impedit la progressió cap a anafase. Els unions sintètiques (o monopolars) són desestabilitzades per la quinasa Aurora B Ipl1, almenys en llevats. Només les unions amfitètiques (o bipolars) permetran l'inici de l'anafase. b) A la meiosi I els cinetocors germans s'han de coorientar i els dels homòlegs biorientar. En llevats, la monopolina evita les unions amfitètiques dels cinetocors germans. El punt de control del fus també està actiu a la meiosi I i presumiblement s'activa en resposta a cinetocors no units. Si hi ha una coorientació dels homòlegs, hi ha un mecanisme que detectaria la falta de tensió entre els quiasmes i desestabilitzaria les unions dels microtúbuls en un dels homòlegs (interrogant). A la meiosi I els homòlegs han d'estar biorientats perquè s'iniciï l'anafase. (Extreta de Marston i Amon (2004)).

Durant la mitosi, l'inici de l'anafase no comença fins que totes les parelles de cromàtides germanes estan unides al fus mitòtic d'una manera bipolar; és a dir, estan biorientats (figura 1.10a). Dos factors contribueixen a l'establiment de la unió bipolar. Primer, el punt de control del fus detecta la presència de cinetocors no units i endarrereix la progressió del cicle cel·lular fins que tots els cinetocors estiguin units (Gardner i Burke, 2000). El punt de control del fus també funciona durant la meiosi I, com a mínim en llevats, i és probable que detecti defectes d'unió (Shonn *et al.*, 2000; Shonn *et al.*, 2003). El segon factor que contribueix a la unió bipolar a la mitosi és la quinasa Aurora B, que detecta si els cinetocors estan biorientats (notant la tensió als cinetocors que és exercida per la força de tracció dels microtúbuls)(Biggins i Murray, 2001; Dewar *et al.*, 2004). Si els cinetocors no estan biorientats, i per tant, la tensió en els cinetocors és absent, llavors la quinasa Aurora B desenganxa aquestes unions errònies entre els microtúbuls i els cinetocors. Després, els cinetocors que no estan units són detectats pel punt de control del fus i s'inhibeix l'inici de l'anafase.

Al contrari de la mitosi, a la meiosi I té lloc la coorientació dels cinetocors (figura 1.10b). Els cinetocors germans s'han de coorientar perquè els cromosomes homòlegs puguin segregar lluny un de l'altre. En llevats de fissió, probablement el complex de la monopolina evita la biorientació dels cinetocors, potser fusionant els cinetocors germans enllaçant els llocs d'unió dels microtúbuls dels cinetocors germans. En d'altres espècies hi estarien implicades altres proteïnes o modificacions de les ja presents als centròmers. Els lligams, com els quiasmes, entre homòlegs podrien crear tensió als cinetocors. Els bivalents que s'uneixen a microtúbuls que provenen del mateix pol serien detectats degut a l'absència de tensió als cinetocors, i aquestes unions es desfarien – potser amb un mecanisme mediat per l'Ip11 (homòloga de l'Aurora B). Els cinetocors no units podrien activar el punt de control del fus i aturarien el cicle a metafase I.

La transició meiosi I-meiosi II

A la mitosi, la replicació del DNA durant la fase S i la segregació dels cromosomes a la fase M s'alternen per mantenir la ploïdia de les cèl·lules filles. Aquesta alternança de les fases S i M a la mitosi s'aconsegueix a

través de fluctuacions de l'activitat de la CDK mitòtica. Una curiositat particular del cicle meiòtic és l'absència de la fase de replicació del DNA entre la meiosi I i la meiosi II. A la transició de la meiosi I-meiosi II, s'han d'establir unes condicions que desencadenin el desassemblatge del fus meiòtic (baixa activitat de la CDK) i evitin la formació dels complexos prereplicatius (alta activitat CDK).

Meiosis II

A l'especialitzada segregació cromosòmica de la meiosi I li segueix la meiosi II. La segregació a la meiosi II s'assembla a la mitosi. Els cinetocors germans es biorienten, presumiblement per la desaparició del complex de monopolina als centròmers (Toth *et al.*, 2000; Rabitsch *et al.*, 2003). El complex de cohesines centromèriques, que s'ha escapat de la degradació a la meiosi I, resisteix les forces de tracció del fus de la meiosi II abans que s'iniciï l'anafase II i d'aquesta manera s'evita la separació prematura de les cromàtides germanes. A l'inici de l'anafase II, la separasa torna a activar-se i, com que ja no hi ha protecció al centròmer, trenca la REC8 restant, comportant la separació de les cromàtides germanes a pols oposats.

Comportament del centrosoma a la meiosi

S'ha de diferenciar en funció si la meiosi té lloc per la formació de gàmetes masculins o femenins (revisat a Manandhar *et al.* (2005)).

A la gametogènesi masculina, els espermatòcits primaris i els secundaris, que són les cèl·lules que pateixen la primera i segona divisions meiòtiques respectivament, presenten els centrosomes estructural i funcionalment intactes. Els fusos meiòtics dels mascles de la majoria d'espècies animals mostren dos centríols a cada pol. Les cèl·lules resultants de la segona divisió meiòtica són les espermatòcits, les quals després d'un procés de diferenciació donaran els espermatozoides, i són aquestes en les que té lloc el fenomen anomenat reducció del centrosoma, que és la gradual inactivació i parcial o total degeneració del centrosoma. En ratolins i rates s'ha descrit la degeneració total, mentre que en mamífers no rosegadors la degeneració és parcial. Els espermatozoides humans mostren el centríol proximal intacte i el centríol distal amb una pèrdua d'un 50% del triplets de microtúbuls.

Un fet remarcable de la reducció del centrosoma durant l'oogènesi animal és la pèrdua dels centríols. Les oogònies i els oòcits fetals presenten centríols normals fins a l'estadi de paquitè, però els perden en els estadis posteriors. Durant l'estadi del trencament de la vesícula germinal (GVBD, *germinal vesicle breakdown*) en els oòcits de ratolí, apareixen múltiples centres organitzadors de microtúbuls (MTOCs, *microtubule organizing centers*), que gradualment es reuneixen per formar els pols del fus meiótic. No s'observen centríols en els MTOCs perinuclears o als pols del fus dels oòcits de ratolí i d'altres espècies com els conills, vaques, garotes, granotes i humans. Degut a l'absència de centríols el material del centrosoma no s'agrega en un lloc concret. L'oòcit pre-GVBD presenta dos grans agregats multivesiculars (MVA, *multivesicular aggregates*) que contenen γ -tubulina. A l'inici de la maduració, els MVA es fragmenten, i es transformen en petits MTOCs, i són traslladats a la vesícula germinal. En els estadis de divisió dels oòcits, els extrems proximals dels microtúbuls del fus meiótic s'agrupen en múltiples pilots al voltant dels pols. Per tant, els pols del fus semblen anells o estructures planes, i els fusos tenen forma de bóta.

Així doncs, en els zigots dels mamífers no rosegadors, els centríols de l'espermatozoide organitzaran un MTOC dominant reclutant les proteïnes del centrosoma que es trobaven disperses pel citoplasma de l'oòcit. I en els embrions de ratolí els centríols apareixeran durant l'estadi de blastòcit per síntesi de novo mitjançant un mecanisme que encara no es coneix.

Punts de control

Els punts de control del cicle cel·lular presents a la meiosi són equivalents als de la mitosi, afegint-hi el punt de control de paquitè. Els meiócits que presenten defectes en la recombinació i/o en la sinapsi dels cromosomes homòlegs queden aturats a l'estadi de paquitè de la profase I (Roeder, 1997; Ghabrial i Schupbach, 1999; Ashley *et al.*, 2004; Bhalla i Dernburg, 2005).

Es coneix que el punt de control de paquitè monitoritza dos aspectes del metabolisme dels cromosomes meiótics en *Saccharomyces cerevisiae* i *Caenorhabditis elegans*: 1) la reparació dels DSBs i 2) la sinapsi cromosòmica (Bhalla i Dernburg, 2005; Wu i Burgess, 2006). En ratolins, tant els espermatòcits com els oòcits que presenten mutacions que alteren

la reparació dels DSB (com per ex. *Dmc1*, *Msh5*, i *Atm*) són eliminats eficientment a paquitè, però els espermatòcits són més sensibles a la reparació dels DSBs independents de la sinapsi que els oòcits (Hunt i Hassold, 2002; Yuan *et al.*, 2002; Di Giacomo *et al.*, 2005). No obstant, com que en ratolí es necessita la recombinació perquè hi hagi sinapsi (mutacions en gens que participen en la recombinació com el *Dmc1* causen una asinapsi extensiva (Pittman *et al.*, 1998)), no se sap si hi ha un punt de control de paquitè diferent que respon a defectes a la recombinació meiótica, i si és el cas, si seria idèntic a l'utilitzat en les cèl·lules somàtiques. Els mecanismes putatius que controlen el punt de control de paquitè encara no es coneixen en mamífers, ja que encara no s'han identificat mutacions que l'aboleixin (Li i Schimenti, 2007).

Els espermatòcits de ratolí que presenten cromosomes que no han fet la sinapsi experimenten apoptosi a paquitè o metafase I (Mahadevaiah *et al.*, 2000; Eaker *et al.*, 2001).

El control de l'alineament dels cromosomes a metafase (Taylor *et al.*, 1998) atura el cicle mitòtic i el cicle meiótic dels mascles si la unió mecànica de les parelles de cinetocors als dos pols oposats dirigit per les fibres del fus no és complet.

Origen de l'aneuploidia

L'aneuploidia ocorre quan un cromosoma replicat deixa de segregat correctament entre les dues cèl·lules filles. Hi ha dos processos que donen lloc a aneuploidia en cèl·lules somàtiques, la no disjunció de cromosomes durant anafase, i la pèrdua anafàsica. En el primer procés, una cèl·lula filla esdevé trisòmica i l'altra monosòmica, mentre en el segon procés el cromosoma perdut pot formar un micronucli (MN), o es pot incorporar, de manera aleatòria, a qualsevol dels nuclis fills. Els micronuclis no sorgeixen solament de cromosomes sencers que s'endarrereixen a la mitosi a causa d'un cinetocor fet malbé o a un fus mitòtic defectuós (Almassy *et al.*, 1987; Degrossi i Tanzarella, 1988; Eastmond i Tucker, 1989; Fenech i Morley, 1989; Cornforth i Goodwin, 1991), sinó que també es poden originar a partir de fragments acèntrics que fracassen a l'hora de ser incorporats als nuclis fills durant la divisió cel·lular a causa de la manca d'un cinetocor (Heddle i Carrano, 1977; Almassy *et al.*, 1987; Littlefield *et al.*, 1989;

Cornforth i Goodwin, 1991), o des de reorganitzacions cromosòmiques complexes que troben dificultats mecàniques durant anafase (Hall i Wells, 1988; Cornforth i Goodwin, 1991).

L'aneuploidia es pot originar com a resultat de divisions mitòtiques anòmales que creen cèl·lules que entren a la següent mitosi amb un fus multipolar (figura 1.11a). Aquestes mitosis aberrants poden ser causades per una poliploidització, la qual s'origina via defectes previs de la citocinesi, fusions de cèl·lules o per processos d'endoreduplicació (Storchova i Pellman, 2004). També pot ser causada per defectes en la duplicació, maduració i segregació dels centrosomes (Nigg, 2002). En tots aquests casos, les divisions amb un fus mitòtic multipolar que segueixen aquests esdeveniments probablement produiran cèl·lules filles aneuploides.

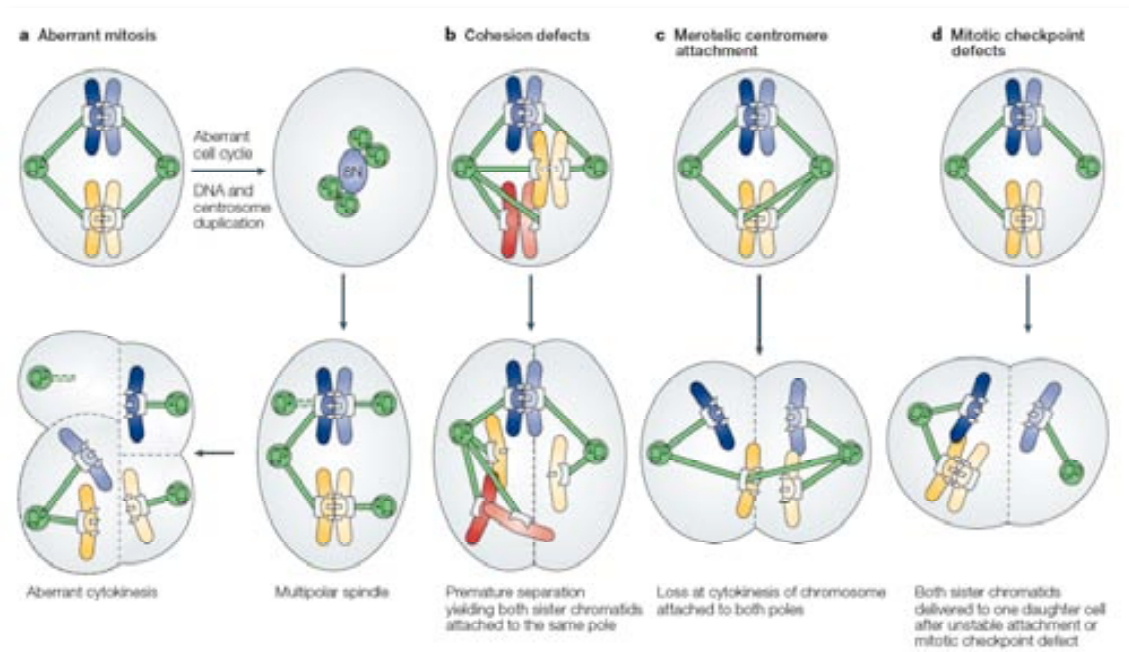


Figura 1.11. Possibles mecanismes que originen aneuploidia. a) Les mitosis aberrants poden causar pèrdua de cromosomes. Els fusos multipolars i la malsegregació cromosòmica poden ser el resultat de que hi hagi massa centrosomes, degut a que no hagi tingut lloc la citocinesi, resultant amb una poliploidització o errors de la duplicació dels centrosomes. b) Defectes en la cohesió poden comportar pèrdua de cromosomes. La separació prematura de la cohesió entre les cromàtides germanes pot donar segregacions aberrants amb les dues còpies distribuïdes a la mateixa cèl·lula filla. Una cohesió persistent entre cromàtides a l'anafase pot acabar amb el mateix resultat. c) La unió de microtúbuls provinents dels dos pols (unió merotèlica) pot causar una pèrdua cromosòmica. d) Defectes del punt de control mitòtic pot causar pèrdua de cromosomes. La captura inestable de microtúbuls pot originar una malsegregació cromosòmica. Una senyalització afeblida del punt de control mitòtic per un o més microtúbuls no units no genera un senyal d'aturar l'anafase suficientment elevat per impedir l'inici de l'anafase en la presència de cromosomes no units. (Extreta de Kops *et al.* (2005)).

Els defectes de la cohesió dels cromosomes també poden contribuir a l'aneuploïdia (figura 1.11b). La resolució de la cohesió de les cromàtides germanes a l'inici de l'anafase depèn de la separasa. La inactivació dels homòlegs de la separasa o la segurina en llevats resulta en pèrdua anafàsica (Uzawa *et al.*, 1990; McGrew *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1996). I encara més important, cèl·lules tumorals humanes en les que es va eliminar la segurina mitjançant recombinació homòloga, mostren nivells elevats d'instabilitat cromosòmica numèrica (CIN) (Jallepalli *et al.*, 2001) i (paradoxalment) cèl·lules que sobreexpressen segurina de forma estable desenvolupen tumors en ratolins nus (Pei i Melmed, 1997; Zhang *et al.*, 1999).

L'aneuploïdia també pot sorgir per una unió incorrecta dels cromosomes als microtúbuls del fus (figura 1.11c,d). Les unions merotèliques, en les que un cinetocor està simultàniament unit a microtúbuls que provenen dels dos pols, pot ser una causa important d'aneuploïdia (Cimini *et al.*, 2001). S'ha observat un increment en aquest tipus d'unions després de la inhibició dels mecanismes de correcció de l'error de la unió, que inclou la quinasa Aurora B, la borealina, la survivina i la proteïna interna del centròmer (INCENP, *inner centromere protein*) (Gassmann *et al.*, 2004). Les unions inestables que produeixen l'activació crònica d'aquest punt de control poden provocar la mort cel·lular a través d'una via que no està completament definida però que, en alguns casos, inclou un avançament cap a la interfase sense citocinesi i posterior apoptosi (Taylor i McKeon, 1997; Shin *et al.*, 2003).

L'aneuploïdia també pot originar-se per una incorrecta segregació produïda per defectes que afebleixen suficientment la senyalització del punt de control mitòtic de manera que l'anafase s'inicia abans que tots els cromosomes hagin establert les unions amb el fus de forma correcta (figura 1.11d).

Fenech (2002) i Leach *et al.* (2004) van descriure que el patró específic cromosòmic de l'aneuploïdia adquirida d'una cèl·lula somàtica està associat a diferents factors incloent el contingut heterocromàtic dels cromosomes, la llargada específica dels telòmers de cada cromosoma, i causes específiques de teixit no identificades fins al moment.

Durant la divisió meiòtica de les cèl·lules germinals també poden tenir lloc errors en la segregació dels cromosomes. En general es parla de no disjunció, però hi participen més mecanismes (figura 1.12). La impossibilitat de resoldre els quiasmes que hi ha entre els cromosomes homòlegs a l'anafase I comporta una no disjunció vertadera, de manera que els dos homòlegs segreguen junts. A més a més, la resolució prematura dels quiasmes, o la impossibilitat d'establir quiasmes entre una parella d'homòlegs, pot resultar en la segregació independent dels homòlegs a la meiosi I, que comportarà un error si els dos segreguen cap al mateix pol del fus de la meiosi I. Finalment, un error a la meiosi I també pot implicar la segregació de les cromàtides, enlloc dels cromosomes homòlegs. Per exemple, la separació prematura de les cromàtides germanes a la primera divisió meiòtica pot resultar amb la segregació de tot el cromosoma, i una cromàtide a cada pol. Per altra banda, els errors de la segona divisió meiòtica resulten de la no separació de les cromàtides germanes.

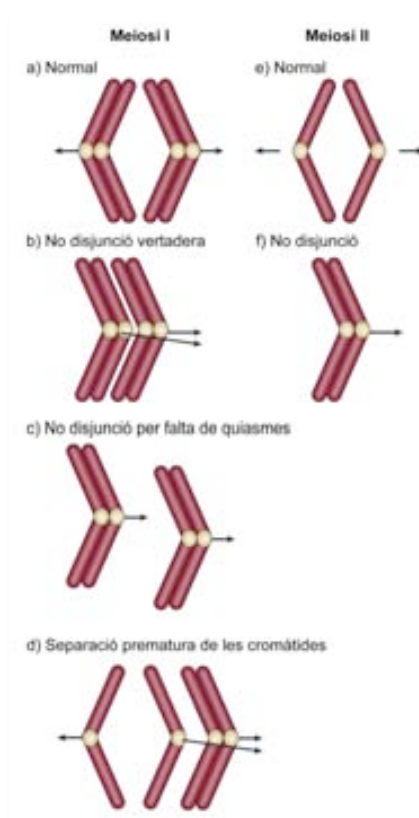


Figura 1.12. Mecanismes que originen no disjunció a la meiosi. A la meiosi I: a) segregació de cromosomes homòlegs; b) no disjunció vertadera dels cromosomes homòlegs, en el que els homòlegs viatgen junts cap al mateix pol; c) no disjunció per falta de quiasmes, en el que els homòlegs que no han pogut aparellar-se o recombinar viatgen independentment cap al mateix pol; d) separació prematura de les cromàtides germanes, en el que les cromàtides – enlloc dels cromosomes – segreguen un de l'altre. A la meiosi II: e) segregació de cromàtides germanes; f) segregació conjunta de cromàtides germanes per impossibilitat de separar-les (adaptada de Hassold i Hunt (2001)).

EFFECTES DE LA RADIACIÓ IONITZANT

La radiació ionitzant és una transferència d'energia en la forma de partícules a gran velocitat (partícules alfa, neutrons, protons, etc.) i/o ones electromagnètiques (raigs X i raigs gamma). Aquesta transferència ha de tenir energia suficient per desplaçar un electró de l'òrbita d'un àtom creant una ionització.

La magnitud dosimètrica fonamental és la dosi absorbida (D), i té com a unitat el Gray (Gy). Un Gray equival a un Joule d'energia de radiació absorbit per un kg de massa. La relació entre l'efecte biològic i la dosi depèn de la naturalesa de la radiació. Per tant, al caràcter quantitatiu de la magnitud de la dosi absorbida se li ha d'afegir un paràmetre qualitatiu. Aquest es denomina transferència lineal d'energia (LET), que representa la densitat d'energia absorbida pel medi per unitat de longitud de la trajectòria ionitzant produïda per la radiació, i generalment s'expressa en keV/ μm . Els raigs X i gamma són radiacions de baixa LET, interaccionen poc amb la matèria i deixen poques ionitzacions en el seu recorregut. Les radiacions corpusculars (partícules alfa, electrons, neutrons, etc.) tenen una massa i/o càrrega apreciables. Aquest tipus de radiacions perden energia ràpidament i produeixen moltes ionitzacions en una distància molt curta. Per tot això, les radiacions corpusculars són radiacions d'alta LET. Les radiacions d'alta LET són més perjudicials per als organismes vius.

El cos humà està compost per un 80% d'aigua, un 15% de proteïnes, un 2% de lípids, un 1% de carbohidrats, un 1% de DNA i un 1% d'altres molècules. Els àtoms que preferentment s'ionitzaran són els que es troben en més proporció i per tant, seran l'oxigen i l'hidrogen, és a dir, els que formen l'aigua. El DNA només representa un 1% de tota la massa cel·lular, i per tant, no és molt susceptible a un efecte directe de la radiació ionitzant. Ara bé, si aquesta molècula es danya, ja sigui directe o indirectament, i si aquest dany no es repara o ho fa malament, pot modificar el destí de la cèl·lula, i per això sovint es parla que és la molècula diana, però seria millor parlar de la molècula crítica.

Els efectes genotòxics d'un mutagen potencial depenen de la/es diana/es cel·lular/s. Alguns agents químics necessiten ser metabolitzats abans d'adquirir la capacitat mutagènica. Els mutàgens poden induir canvis al genoma incidint directament sobre el DNA i/o indirectament, afectant a

proteïnes implicades en el manteniment de la integritat genòmica (per ex.: tubulines, enzims de reparació del DNA, proteïnes implicades en el control del cicle cel·lular) (Kirsch-Volders *et al.*, 2003)(figura 1.13).

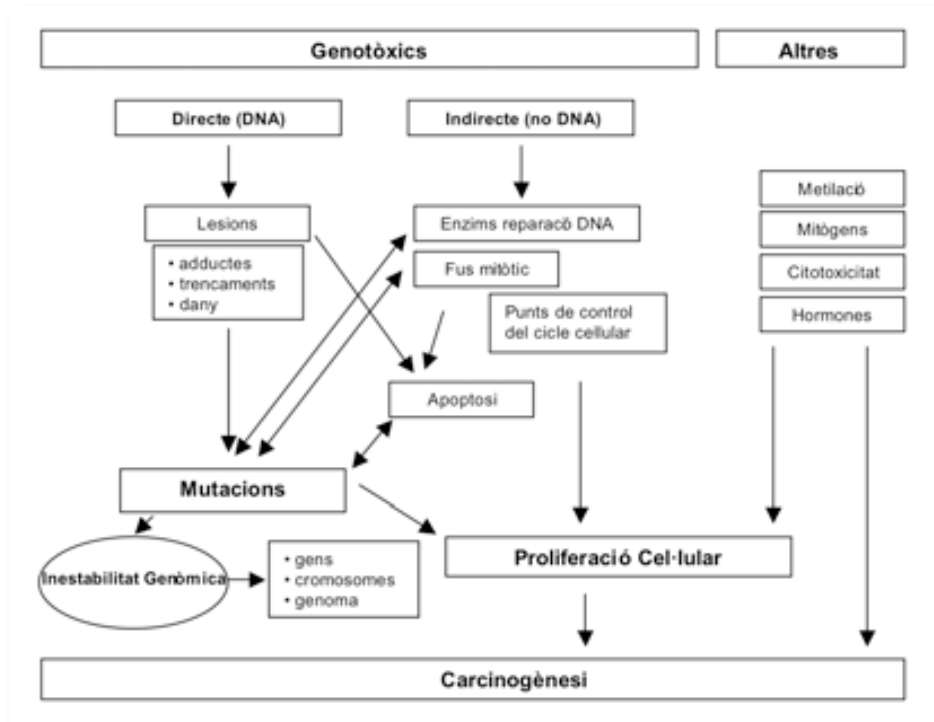


Figura 1.13. Mecanismes d'acció dels agents genotòxics que interaccionen i que no interaccionen amb el DNA. Els mutàgens poden induir efectes genotòxics i càncer incidint directe o indirectament en el DNA, unint-se a proteïnes implicades en el manteniment de la integritat genòmica. Els compostos no genotòxics també són capaços d'induir càncer incrementant la taxa de proliferació (per exemple, els mitògens), canviant l'estat de metilació del DNA o desencadenant citotoxicitat. La proliferació cel·lular pot ser un efecte primari del carcinogen o un efecte secundari degut a la toxicitat cel·lular. L'apoptosi pot ser induïda per varis tipus d'agents genotòxics. Una eliminació excessiva de cèl·lules per apoptosi pot induir una proliferació cel·lular per compensar i restaurar l'homeòstasi. La carcinogènesi és, per tant, el resultat d'un equilibri entre mutacions, canvis epigenètics, proliferació cel·lular i mort cel·lular (adaptada de Mateuca *et al.* (2006)).

Quan la radiació ionitzant afecta directament el DNA dona lloc a trencaments de cadena senzilla (SSBs, *single-strand breaks*) i de cadena doble (DSBs, *double-strand breaks*)(figura 1.14). Els efectes indirectes de la radiació ionitzant sobre el DNA ocorren després que un fotó interactuï amb una molècula d'aigua comportant la hidròlisi i produint radicals lliures que subsequentment atacaran el DNA i les proteïnes (Nias, 1998; Dowd i Tilson, 1999).

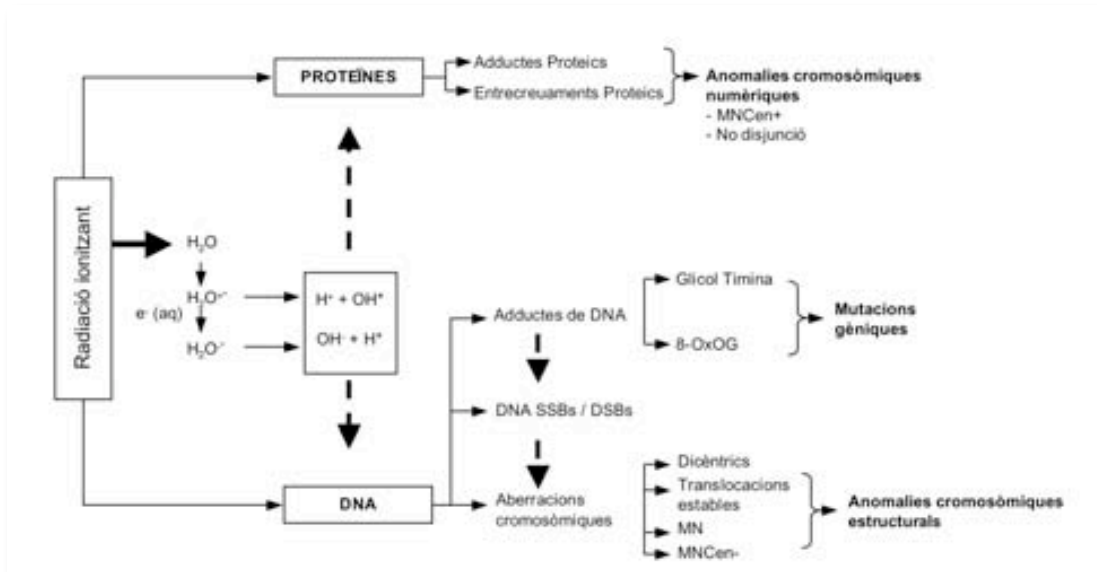


Figura 1.14. Efectes de la radiació ionitzant. Les radiacions ionitzants actuen directament sobre el DNA produint adductes de DNA, trencaments de la cadena de DNA i anomalies cromosòmiques. L'acció directa sobre les proteïnes comporta la formació de adductes proteïcs i entrecruaments que, si no es reparen, donaran lloc a anomalies cromosòmiques numèriques. La radiòlisi de l' H_2O per la radiació ionitzant (efecte mutagènic indirecte) resulta amb l'ejecció d'un electró (e^-) i la formació d'una molècula d'aigua ionitzada (H_2O^+). La captura d' e^- per molècules de DNA polaritzants produeix un potent electró hidratat reactiu (e^- (aq)). L'electró hidratat causa la formació d'ions carregats negativament (H_2O^-). L' H_2O^+ i l' H_2O^- són inestables i ambdós es poden dissociar per generar un ió estable i un radical lliure. Els MNCen+ són micronuclis centròmer positiu resultants de la pèrdua anafàsica, els MNCen- són micronuclis que contenen fragments acèntrics de cromosoma o de cromàtide (adaptada de Mateuca *et al.* (2006)).

Les conseqüències de la interacció dels mutàgens i les dianes poden comportar diferents danys del DNA (adductes de DNA, llocs àlcali-làbil, trencaments de cadena) i mutacions anant des de canvis d'un únic nucleòtid (mutacions gèniques) a estructurals o canvis del nombre de cromosomes (taula 1.1). El destí de la cèl·lula està finalment determinat per si les diverses lesions inferides al genoma són reparades o no; en aquest últim cas la cèl·lula serà eliminada per apoptosi (Decordier *et al.*, 2002).

Taula 1.1. Alteracions cromosòmiques i al DNA (adaptada de Wyrobek *et al.* (2005))

Aneuploïdia	Lesions premutacionals
cromosomes sexuals	adductes de DNA
autosomes	adductes de proteïnes
Anomalies estructurals	trencaments de cadena senzilla i
duplicacions/deleccions	de la doble cadena
reorganitzacions	Repeticions de nucleòtids
trencaments de cromosoma	Mutacions gèniques
Modificacions epigenètiques	
Impressió genètica	

La radiació ionitzant pot induir dany a les cèl·lules germinals. Aquest dany, tot i que no tingui conseqüències directes a l'individu exposat, pot afectar a la seva fertilitat i a la seva descendència. Les radiacions ionitzants indueixen apoptosi de les cèl·lules germinals, concretament als espermatogonis que es divideixen activament, els quals són els més susceptibles, seguit dels espermatòcits, dels espermatogonis cèl·lules mare, i les altament resistents espermatides (Meistrich *et al.*, 1978; Hasegawa *et al.*, 1997; Hasegawa *et al.*, 1998). La quantitat i tipus de dany que l'espermatozoide transmet en el procés de fecundació és una conseqüència directa de l'especial biologia de l'espermatogènesi i de la capacitat de reparació del zigot en mamífers. Concretament, l'última part de l'espermatogènesi (fase d'espermàtide allargada i espermatozoides) és deficient en la reparació del DNA i les lesions que s'indueixen en aquest període persisteixen fins a la fecundació.

Resposta al dany al DNA

Els DSBs es poden formar en resposta a agents exògens o endògens que danyen el DNA. La radiació ionitzant produeix uns DSBs únics d'una elevada complexitat, implicant múltiples agrupacions de danys que són introduïts directament per la deposició de l'energia i indirectament per la generació d'espècies reactives de l'oxigen. Per exemple poden aparèixer a prop del DSBs, bases danyades, trencaments de cadena senzilla i/o de l'esquelet de sucre-fosfat. Aquestes agrupacions no s'observen en els DSBs introduïts per les espècies reactives de l'oxigen generades metabòlicament, com tampoc en altres mecanismes en els que els DSBs es creen de forma programada (a la recombinació V(D)J i a la meiosi). També poden aparèixer

DSBs quan els telòmers esdevenen massa curts. Dependent de com i on s'hagi originat els DSB el mecanisme de reparació que s'utilitzarà variarà.

Mecanismes de resposta als DSBs

La via de resposta al dany del DNA comporta processos de reparació del DNA i mecanismes de transducció de senyals que alerten a la cèl·lula de la presència de dany al DNA i coordina la resposta adequada. Els processos de transducció de senyals activats pels DSBs depenen les quinases relacionades amb la fosfatidilinositol 3-quinasa (PIKKs) – *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) i *ataxia telangiectasia and RAD3-related* (ATR); i les principals vies de reparació dels DSBs inclouen la unió no homòloga dels extrems de DNA (NHEJ, *non-homologous end-joining*) i la recombinació homòloga (HR, *homologous recombination*) (taula 1.2). Els processos de senyalització i de reparació estan relacionats i en cert punt regulats entre ells (figura 1.15).

Taula 1.2. Vies de resposta als DSBs (adaptada d'O'Driscoll i Jeggo (2006))

Procés	Components principals
Nucli de la NHEJ	KU70, KU80, DNA-PKcs, XRCC4, LIG4
NHEJ dependent d'ATM	Proteïnes del nucli de la NHEJ, Artemis, H2AK, ATM, TP53BP1, MRE11, NBS1
HR	RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3, BRCA1, BRCA2, RAD54, RPA
Senyalització via ATM	ATM, H2AX, NBS1, MRE11, RAD50, TP53BP1, MDC1, CHEK2, TP53, Artemis, BRCA1, SMC1
Senyalització via ATR	ATR, ATRIP, RPA, NBS1, TP53BP1, RAD17, RAD9, RAD1, HUS1, complex MCM i MRN, BRCA1, TOPBP1, CHEK1, Claspin, TP53, FANCD2

ATM, ataxia telangiectasia mutated; ATR, ataxia telangiectasia and RAD3-related; ATRIP, ATR-interacting protein; BRCA, breast cancer, early onset proteins; CHEK, checkpoint proteins; DSB, double strand break; FANCD2, Fanconi anemia complementation group D2; HR, homologous recombination; H2AX, H2A histone member X; LIG4, DNA ligase IV; MCM, mini chromosome maintenance; MDC1, mediator of DNA damage checkpoint 1; MRN, MRE11-RAD50-NBS1 complex; NBS1, Nijmegen breakage syndrome 1; NHEJ, non-homologous end-joining; RPA, replication protein A; SMC1, structural maintenance of chromosome 1; TOPBP1, topoisomerase (DNA) II binding protein 1; TP53, tumour protein 53; TP53BP1, tumour protein 53 binding protein 1.

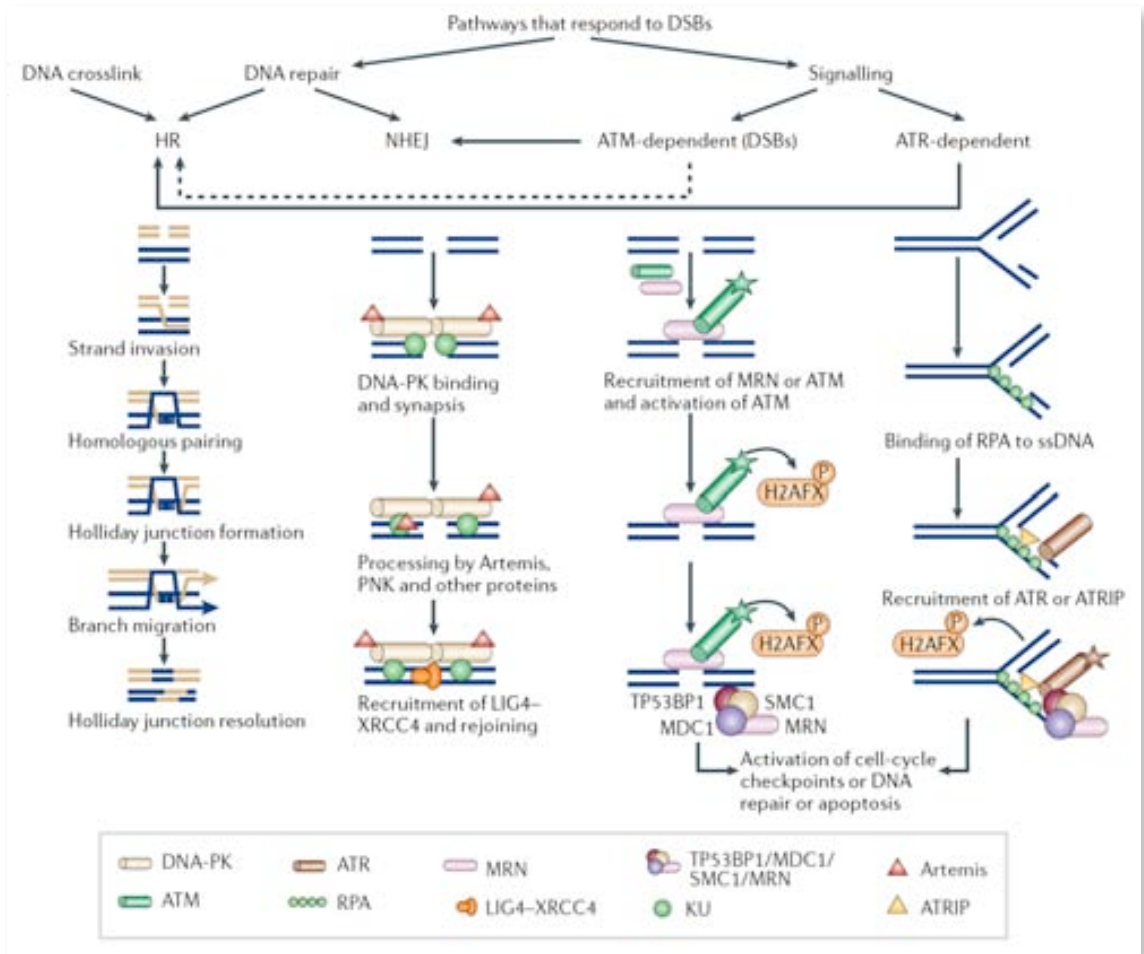


Figura 1.15. Vies de resposta als trencaments de la doble cadena: reparació i senyalització; i relació dels dos processos. En el text es detallen els diferents passos (adaptada d'O'Driscoll i Jeggo (2006)).

Transducció del senyal en resposta al DSB induït

La principal PIKK que respon als DSBs és l'ATM, una proteïna que és defectuosa a la malaltia hereditària atàxia telangiectàsia (AT). La via de transducció del senyal comprèn proteïnes necessàries per la detecció del dany, per la mediació i transducció de senyal, i proteïnes efectores d'una determinada resposta, com l'aturada del cicle cel·lular i l'apoptosi. El complex MRN (MRE11-RAD50-NBS1) és el sensor principal i recluta l'ATM als DSBs. Un altre pas inicial és la fosforilació de la histona H2AX (γ -H2AX), aproximadament en una regió d'una megabase, per part de l'ATM o la DNA-PK. La γ -H2AX recluta proteïnes mediadores com la TP53BP1 (*tumour protein 53 binding protein 1*), la MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint 1*), la BRCA1 (*breast cancer 1, early onset*) i el complex MRN al lloc del DSB. L'acumulació d'aquestes proteïnes potencia l'aturada en del cicle cel·lular en el punt de control, però no és essencial perquè tingui lloc.

L'ATM regula l'aturada de tres punts de control després de la irradiació: G1-S, S i G2-M.

L'ATR és activada per regions de cadena senzilla que es generen com a resultat del bloqueig de la forca de replicació o durant la reparació de grans lesions. Els substrats que són fosforilats per l'ATR se solapen amb els de l'ATM, i per tant, l'ATR condueix a aturades del cicle cel·lular similars a l'ATM. L'activació de l'ATR després de la irradiació pot ser important per establir les forques de replicació que han quedat encallades o per activar la recombinació homòloga.

Vies de reparació dels DSBs

Les proteïnes necessàries per la NHEJ inclouen l'heterodímer KU, la unitat catalítica la proteïna quinasa dependent de DNA (DNA-PKcs), la XRCC4 i la DNA lligasa 4 (LIG4). La NHEJ funciona en tot el cicle cel·lular i és el mecanisme predominant per la reparació dels DSBs a la fase G1.

La HR repara els DSBs utilitzant una seqüència homòloga com a motlle, el què li proporciona una gran fidelitat. Un pas inicial en la HR implica la generació d'una regió de DNA de cadena senzilla, que el segueix la invasió de la cadena que utilitzarà com a motlle, creant una unió de Holliday. La síntesi de DNA utilitzant la cadena de la cormàtide germana com a motlle és seguida per la migració de les unions de Holliday i finalment la seva resolució. La RAD51 és clau en la HR, unint-se als extrems de cadena senzilla i promovent la invasió de la cadena, i és la BRCA2 la que facilita la unió de la RAD51 al DNA. La BRCA1 també participa en la HR, possiblement fent una funció reguladora. Hi ha altres proteïnes implicades en la recombinació homòloga llistades a la taula 1.2. El paper principal de la HR és la reparació dels DSBs que resulten del bloqueig de la forca de replicació. Així doncs, la principal funció de la HR seria la reparació dels DSBs a la forca de replicació, mentre que la NHEJ principalment repararia els DSBs que s'han generat a qualsevol altra part del DNA.

MODELS CEL·LULARS PER L'ESTUDI DE L'ANEUGÈNIA

Model somàtic

Limfòcits de la sang perifèrica i de la melsa

Els limfòcits són un tipus de leucòcits. Distingim dos tipus de limfòcits segons l'activitat funcional que presenten *in vivo* i *in vitro*, els antígens de la seva superfície cel·lular i l'òrgan que els produeix. Els limfòcits B són originats en la medul·la òssia dels mamífers i sense passar pel tim. Tenen un paper preponderant en la immunitat humoral, de manera que després d'ésser estimulats per determinats antígens, augmenten de volum i molts d'ells es transformen en cèl·lules plasmàtiques productores d'immunoglobulines o d'anticossos que lliuren a la sang. Els limfòcits T són originats en el tim i se'n coneixen algunes subpoblacions: els limfòcits col·laboradors, que estimulen la formació de limfòcits B productors d'anticossos; els limfòcits citotòxics o destructors, que lisen les cèl·lules estranyes a l'organisme i són la causa del rebuig dels òrgans trasplantats; i els limfòcits supressors, que inhibeixen la formació de limfòcits B productors d'anticossos.

Els limfòcits presents a la sang estan en estat quiescent, aturats a G₀, i quan s'exposen a una proteïna estranya comencen a dividir-se com part de la resposta immunològica.

La melsa és un òrgan exclusivament de vertebrats. En mamífers, la melsa està localitzada a la cavitat abdominal entre el fons de l'estómac i el diafragma. Està considerat un òrgan limfoide perifèric secundari i, tot i que és un magatzem de cèl·lules vermelles, la seva aparició evolutiva és posterior a la dels eritròcits. Tot i les diferències del sistema immunitari entre vertebrats, la seva arquitectura histològica bàsica i el paper de filtrar les partícules antigèniques, o cèl·lules velles o anòmales de la sang, s'ha conservat al llarg de l'evolució des del peixos, passant per amfibis, rèptils, aus i mamífers.

Funció de la melsa

És un òrgan limfoide secundari, té un paper en l'eliminació de cèl·lules velles i malmeses, i és un gran filtre de la sang. Aquestes tres funcions tenen la seva base i integració en l'estructura anatòmica de la melsa (figura 1.16). En el ratolí, la càpsula fibrosa i la branca trabecular des

de la seva part interna formen una xarxa reticular semblant a una esponja. L'artèria esplènica és un gran vas que entra a la melsa i es divideix en branques cada vegada més petites acabant finalment en arterioles de la polpa blanca i en grans sinusoides de la polpa vermella. Les arterioles de la polpa blanca, envoltades per una capa de limfòcits (*periarteriolar lymphoid sheath*, PALS), formen illes de limfòcits T i B altament organitzades, envoltades pels sinusoides de sang de circulació lenta. Aquí, diferents tipus de macròfags capturen i fagociten cèl·lules velles i danyades, partícules i microorganismes transportades per la sang. En els sins, la lentitud del flux de la sang i l'estret pas entre les cèl·lules endotelials afavoreix l'acció dels macròfags que reconeixen, capturen i destrueixen les cèl·lules danyades (model del ratolí a la figura 1.16) (Brendolan *et al.*, 2007).

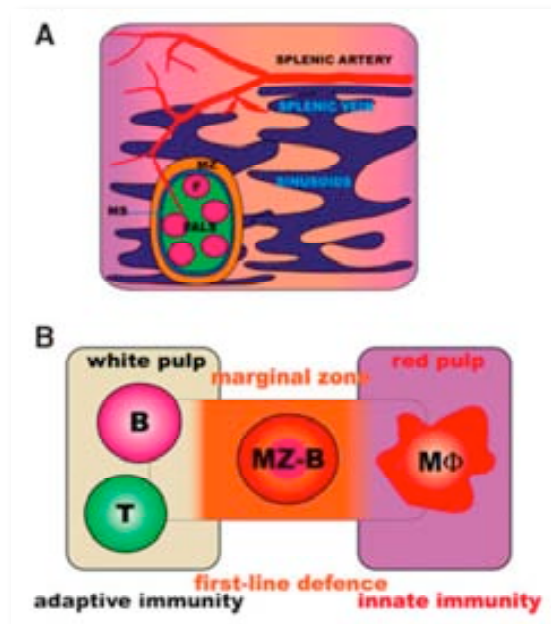


Figura 1.16. Estructura anatòmica bàsica de la melsa de ratolí i un model que representa el paper de la melsa en la resposta immunitària. A) esquema de l'estructura bàsica de la melsa. MZ: zona marginal; F: fol·licle; PALS: capa limfoide periarteriolar (*periarteriolar lymphoid sheath*); MS: sinus marginal. B) Les cèl·lules B de la zona marginal actuen com a lligam natural entre el sistema immunitari innat i l'adaptatiu. (Extreta de Brendolan *et al.* (2007)).

La polpa vermella és una àrea molt important perquè és la responsable de l'eliminació de les plaquetes velles i/o danyades, eritròcits vells i cèl·lules apoptòtiques. L'eliminació dels eritròcits vells està associada al reciclatge del ferro, el qual després de la digestió de l'hemoglobina, és

alliberat o emmagatzemat pels macròfags esplènics (Mebius i Kraal, 2005). La neteja de les cèl·lules apoptòtiques circulants resulta amb la generació de cèl·lules T reguladores i anticossos, jugant un paper molt important en el manteniment de la tolerància perifèrica i la modulació del sistema immunitari (Mahnke *et al.*, 2003; Morelli *et al.*, 2003). Durant les infeccions sistèmiques, els macròfags de la melsa netegen els bacteris de la sang i d'aquesta manera protegeixen l'organisme d'una sèpsia; també contribueixen a l'activació de les cèl·lules B i T que es troben a la polpa blanca. La col·laboració entre la resposta immunitària innata exercida pels macròfags i les respostes més sofisticades del sistema immunitari adaptatiu tenen lloc en el sinus marginal. Aquestes àrees plenes de sang, que contenen diferents tipus de macròfags residents i cèl·lules dendrítiques, engloben els fol·licles de cèl·lules B i les àrees de cèl·lules T i estan envoltades per l'única població de cèl·lules B de la zona marginal. En el ratolí, les cèl·lules B de la zona marginal és una població de cèl·lules altament reactives especialitzades en la reacció contra patògens independent de les cèl·lules T (Mahnke *et al.*, 2003). El trànsit entre la zona marginal i la polpa blanca està regulada per la interacció de diverses quimiocines i molècules d'adhesió.

Una altra funció de la melsa és actuar com un reservori de plaquetes; en humans conté aproximadament una tercera part de les plaquetes del cos. S'estan eliminant contínuament de la circulació i són emmagatzemades o són destruïdes pels limfòcits a la melsa.

La fàcil obtenció de limfòcits a partir d'aquest òrgan el fa adequat per valorar els efectes genotòxics en estudis *in vivo* en animals.

Anàlisi dels limfòcits

Al 1985 es va desenvolupar una tècnica que permetia analitzar el producte resultant d'una divisió nuclear sense que tingués lloc la divisió del citoplasma, coneguda amb el nom d'assaig de micronuclis amb bloqueig de la citocinesi (CBMN, *cytokinesis-block micronucleus*) (Fenech i Morley, 1985a). Amb aquesta tècnica es pot veure l'aparició de micronuclis (MN), els quals s'originen a partir de fragments cromosòmics o de cromosomes sencers que queden enrere a l'anafase durant la divisió nuclear (figura

1.17) (Heddle, 1973; Schmid, 1975; Fenech i Morley, 1985a, b, 1986; Fenech, 2000b).

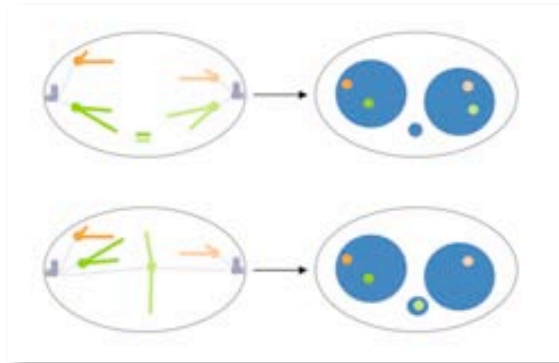


Figura 1.17. Cèl·lula binucleada amb un micronucli que conté un fragment acèntric (a dalt) i una cèl·lula binucleada amb una cromàtide dins d'un micronucli (a baix).

L'assaig de CBMN és el mètode preferit per mesurar la inducció de MN en cèl·lules humanes en cultiu i/o d'altres mamífers perquè l'anàlisi es restringeix a les cèl·lules binucleades que s'han dividit només una vegada, després de l'exposició a l'agent potencialment genotòxic (Fenech i Morley, 1985a, b, 1986; Fenech, 2000b). A l'assaig de CBMN, les cèl·lules que s'han dividit una vegada es reconeixen per la seva aparença binucleada després del bloqueig de la citocinesi amb la citocalasina B (Cyt B), un inhibidor de l'assemblatge de l'anell de microfilaments necessari per la finalització de la citocinesi (Carter, 1967; Fenech i Morley, 1985a, b, 1986; Fenech, 2000b). La restricció del recompte de MN en cèl·lules binucleades (BN) evita els factors de confusió causats per una cinètica de la divisió cel·lular subòptima o alterada, la qual és la més variable en els protocols de l'assaig de MN que no diferencia les cèl·lules que no s'han dividit, i per tant no poden expressar MN, de les que es divideixen i sí que poden (Fenech i Morley, 1986; Fenech, 1997, 2000a). Degut a la seva fiabilitat i a la bona reproduïbilitat, l'assaig de CBMN ha esdevingut un test citogenètic estàndard en la toxicologia genètica en cèl·lules humanes i de mamífers.

Aquest assaig també permet l'anàlisi de ponts nucleoplasmàtics (NPBs, *nucleoplasmic bridges*) que connecten els dos nuclis principals. Aquests ponts donen una mesura de les reorganitzacions cromosòmiques. Els NPBs apareixen quan a l'anafase els centròmers dels cromosomes reorganitzats, com dicèntrics i anells, són tibats a pols oposats de la cèl·lula. Rarament es poden observar ponts anafàsics de dicèntrics abans

que es torni a formar la membrana nuclear, perquè les cèl·lules passen de l'anafase a la telofase de manera ràpida, completant la citocinesi, que finalment resulta amb un trencament del pont quan les cèl·lules filles se separen (Hoffelder *et al.*, 2004). Tanmateix, a l'assaig de CBMN, les cèl·lules binucleades amb NPBs es poden acumular perquè la citocinesi està inhibida i la membrana nuclear es forma eventualment al voltant dels cromosomes permetent que el pont d'anafase s'observi com un pont nucleoplasmàtic. En les cèl·lules que no s'ha bloquejat la citocinesi alguns MN també poden originar-se de ponts d'anafase que s'han trencat, però no se sap si aquest procés també té lloc en les cèl·lules en les que no es divideix el citoplasma.

La combinació d'aquesta tècnica amb la d'hibridació *in situ* fluorescent utilitzant sondes de DNA específiques de cromosoma permet avaluar la segregació cromosòmica entre els nuclis principals i els micronuclis (figura 1.18).

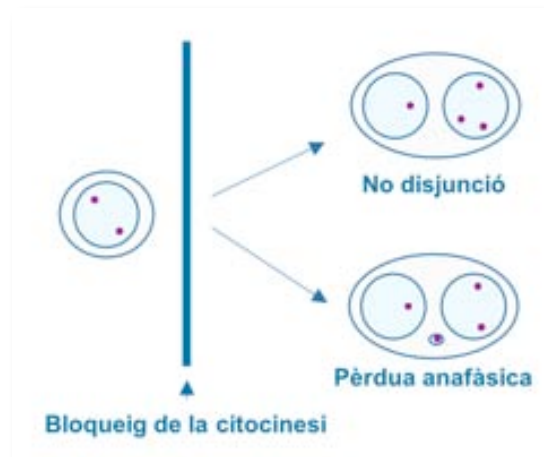


Figura 1.18. No disjunció i pèrdua anafàsica en cèl·lules amb bloqueig de la citocinesi detectada amb una sonda específica de cromosoma (senyal lila).

Model germinal

L'anàlisi citogenètica de les cèl·lules germinals de mamífers contribueix a l'avaluació del risc associat a l'exposició d'agents ambientals físics i químics. Hi ha una sèrie de metodologies disponibles per a la investigació de les cèl·lules germinals de femelles i mascles, utilitzant com a indicadors les anomalies cromosòmiques estructurals, les anomalies cromosòmiques numèriques, els intercanvis de cromàtides germanes (SCE, *sister chromatid exchange*) i els micronuclis (Russo, 2000).

Els estudis de mutagènesi en cèl·lules germinals requereixen una precisa comprensió del desenvolupament de les cèl·lules germinals de mamífers i de la durada de varis estadis de desenvolupament. La majoria d'experiments de mutagènesi en cèl·lules germinals es fan en mascles i no en femelles perquè la biologia de les cèl·lules germinals femenines les fa, d'alguna manera, prohibitiva. Les cèl·lules germinals femenines proliferen durant el període fetal i queden aturades en un estadi tardà de la profase meiòtica (dictiotè) abans del naixement (Peters, 1970; Kurilo, 1981) (figura 1.19). Un petit nombre dels oòcits aturats són alliberats del bloqueig durant cada cicle estral i maduren, sota estímuls hormonals (Crisp, 1992), a través de la resta de la profase meiòtica cap a les divisions meiòtiques (Pedersen, 1970; Oakberg, 1979). La maduració de l'oòcit finalitza amb un altre bloqueig a metafase II (MII). Així, els oòcits són ovulats a l'estadi de metafase de la segona divisió meiòtica i només completen la meiosi després de ser fecundats per un espermatozoide. Per tant, el nombre de cèl·lules germinals femenines al naixement és fix i limitat. A més a més, els estadis de proliferació sensibles ocorren prenatalment. En canvi, les cèl·lules germinals masculines són il·limitades en nombre i són generades a partir d'una població de cèl·lules mare al llarg de tota la vida reproductiva (de Kretser *et al.*, 1998). Per tant, les conseqüències de l'exposició de les cèl·lules germinals a mutàgens ambientals han estat avaluades preferentment en els diferents tipus cel·lulars de la gametogènesi masculina. Els passos de desenvolupament de les cèl·lules germinals són gairebé idèntics en les diferents espècies de mamífers, incloent l'home. Pels estudis de mutagènesi s'han utilitzat diferents espècies de rosegadors, però es considera el ratolí com l'espècie de referència per l'anàlisi de cèl·lules germinals i zigots.

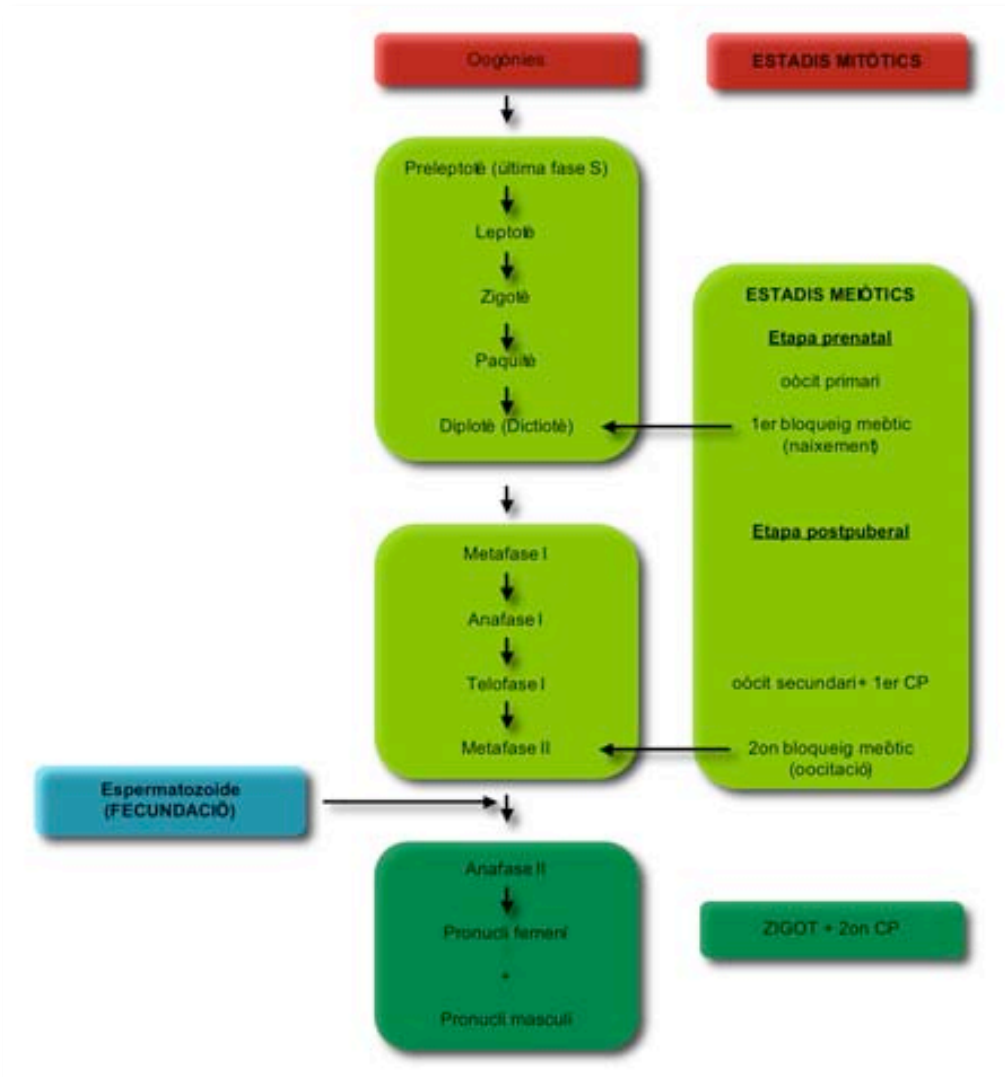


Figura 1.19. Etapes de la gametogènesi femenina. Es poden distingir dues etapes, la prenatal i la postpuberal. L'oòcit només acabarà la segona divisió meiótica si és fecundat.

Espermatogènesi

L'espermatogènesi és el procés de formació, desenvolupament i maduració de les cèl·lules germinals masculines, els espermatozoides.

L'espermatogènesi és un sistema de diferenciació complex i altament regulat que es pot dividir en tres fases (figura 1.20): 1) la fase proliferativa, en la que els espermatogonis cèl·lules mare, que estan sempre presents, de divisió lenta i competents en quan a reparació (Sharpe, 1994), generen més espermatogonis cèl·lules mare, i per un mecanisme desconegut, espermatogonis diferenciats. Els espermatogonis diferenciats van fent cicles de divisions mitòtiques i es designen seqüencialment com a espermatogonis A, intermedis i B en rosegadors (en humans no hi ha espermatogonis

intermedis). Aquests estadis són de divisió ràpida i competents en la reparació del DNA. A nivell d'espermatogonis s'inicia la connexió de cadenes de cèl·lules a través de ponts citoplasmàtics, i se sincronitza el seu desenvolupament (Schleiermacher i Schmidt, 1973); aquests sincitis es mantenen fins a la fase d'espermàtide. Les cèl·lules filles dels espermatogonis B, els espermatòcits primaris, són els que entraran a la fase següent, la meiosi. 2) la fase meiòtica, en la que els espermatòcits I pateixen la recombinació i dues divisions seguides, sense síntesi de DNA entre elles, per donar les espermàtides haploides (cèl·lules postmeiòtiques). I 3) la fase d'espermioogènesi, durant la que les espermàtides pateixen grans canvis morfològics i bioquímics per formar els espermatozoides. Les espermàtides esdevenen deficientes en reparació durant l'etapa postmeiòtica tardana (Sega, 1979; Sotomayor i Sega, 2000) quan el nucli pateix la principal reestructuració de la cromatina (Meistrich, 1989; Wouters-Tyrou *et al.*, 1998) i la reprogramació epigenètica (Hazzouri *et al.*, 2000). L'espermatogènesi està regulada per estrictes controls de l'expressió de gens que codifiquen proteïnes que juguen un paper essencial durant períodes específics del desenvolupament de les cèl·lules germinals (Hecht, 1998; Grootegoed *et al.*, 2000; Kleene, 2001). Els mecanismes de control transcripcionals i traduccional són responsables dels patrons d'expressió específics temporals i d'estadi (Kleene, 1996; Braun, 1998; Eddy i O'Brien, 1998; Sassone-Corsi, 2002). Igualment important és l'establiment i el manteniment de les modificacions epigenètiques necessàries per la correcta expressió dels gens d'origen patern durant el desenvolupament embrionari normal (Trasler, 1998; Kerjean *et al.*, 2000; Reik *et al.*, 2001; Reik i Walter, 2001).

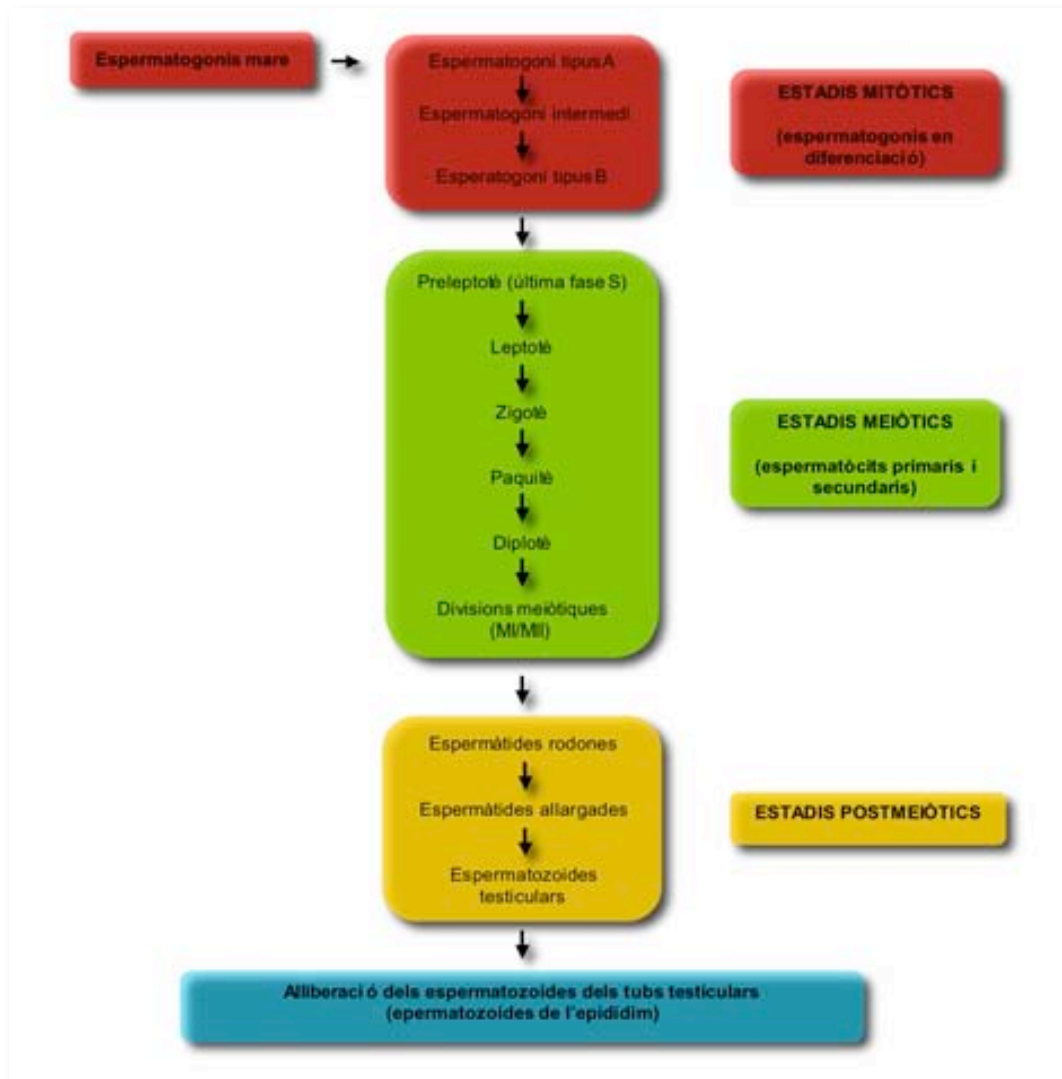


Figura 1.20 Representació esquemàtica del procés d'espermatogènesi en rosegadors (Adaptada de Russo (2000))

Etapas meiótiques i postmeiótiques

Per dur a terme la fase meiótica, els espermatòcits primaris entren en el compartiment adluminal dels túbuls seminífers i són acompanyats per les cèl·lules de Sertoli al llarg de tot el seu desenvolupament posterior (figura 1.21). L'última ronda de replicació del DNA durant l'espermatogènesi té lloc a la fase S prèvia a l'inici de la meiosi. Durant la profase els cromosomes homòlegs s'aparellen i recombinen comportant l'intercanvi de material genètic d'origen matern i patern, i queden units pels quiasmes. Els cromosomes homòlegs se separen a l'anafase per generar els nuclis haploides de les dues cèl·lules filles, els espermatòcits secundaris. Després d'una breu intercinèsi de només unes hores, té lloc la segona divisió meiótica, per generar espermàtides haploides.

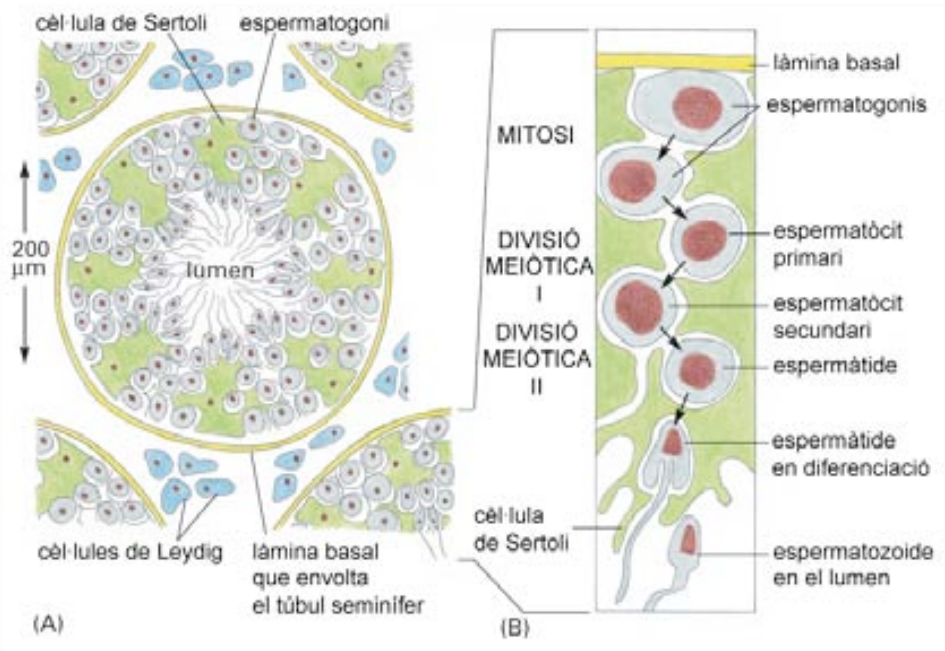


Figura 1.21. Esquema simplificat d'un tall transversal d'un túbul seminífer del testicle de mamífers (adaptada d'Alberts (2004)).

Cada espermatòcit primari dóna quatre espermàtides, les quals pateixen un procés de diferenciació, anomenat espermiogènesi, per passar de cèl·lules rodones a cèl·lules petites i mòbils, altament especialitzades, els espermatozoides. La diferenciació té lloc tant a nivell del citoplasma com del nucli i es pot dividir en varis estadis (figura 1.22). Començant per la diferenciació del citoplasma, des de la fase Golgi fins la fase de l'acrosoma, les vesícules de l'aparell de Golgi es van fusionant per formar una gran vesícula, que va recobrint el nucli com si fos una caputxa, anomenada acrosoma, el qual emmagatzema enzims que permetran a l'espermatozoide penetrar la zona pel·lúcida de l'oòcit i fecundar-lo. Paral·lelament, el centríol es col·loca al costat del nucli, a la part oposada d'on s'està formant l'acrosoma, i es va formant el flagel a partir d'aquest. Durant la fase de maduració de l'espermàtide rodona, també anomenada fase d'elongació, el nucli es va desplaçant cap a un extrem del citoplasma i es va condensant i allargant; La reducció del citoplasma va acompanyada de l'estirament del flagel i l'acumulació de mitocondris a la part proximal d'aquest. Al final de la fase d'elongació s'elimina el citoplasma residual de l'espermàtide i la cèl·lula és alliberada del suport de les cèl·lules de Sertoli a la llum dels túbuls seminífers. En el procés de diferenciació nuclear, per aconseguir la condensació de la cromatina, les histones associades al DNA són

substituïdes gradualment per d'altres proteïnes fins arribar a l'associació amb protamines, moment en el que la capacitat de reparació del DNA arriba a la seva fi. Aquesta substitució progressiva s'inicia ja en l'estadi d'espermatòcit primari i a l'etapa d'espermàtide les histones somàtiques i meiotiques són substituïdes, aproximadament 14 dies abans de l'ejaculació en ratolins (~21 dies en humans), per proteïnes de transició bàsiques i després per protamines (Meistrich i 1989), les quals són proteïnes riques en arginina i permeten un major grau de condensació de la cromatina causant que el DNA esdevingui transcripcionalment inactiu (Kierszenbaum i Tres, 1978). Les cèl·lules de Sertoli secreten el fluid seminal, que permetrà als espermatozoides travessar la *rete testis*, i arribar de forma passiva a l'epidídim a on maduraran durant un període que dura varis dies, adquirint motilitat i modificacions de la membrana plasmàtica encaminades a adquirir la capacitat de fecundar l'oòcit (Gatti *et al.*, 2004). Durant el trànsit des del cap a la cua de l'epidídim, el volum del citoplasma es redueix més ($\approx 95\%$) i la cromatina també es condensa més. Finalment, l'espermatozoide completament madur s'emmagatzema en el conducte deferent fins que tingui lloc l'ejaculació o la resorció per part dels macròfags.

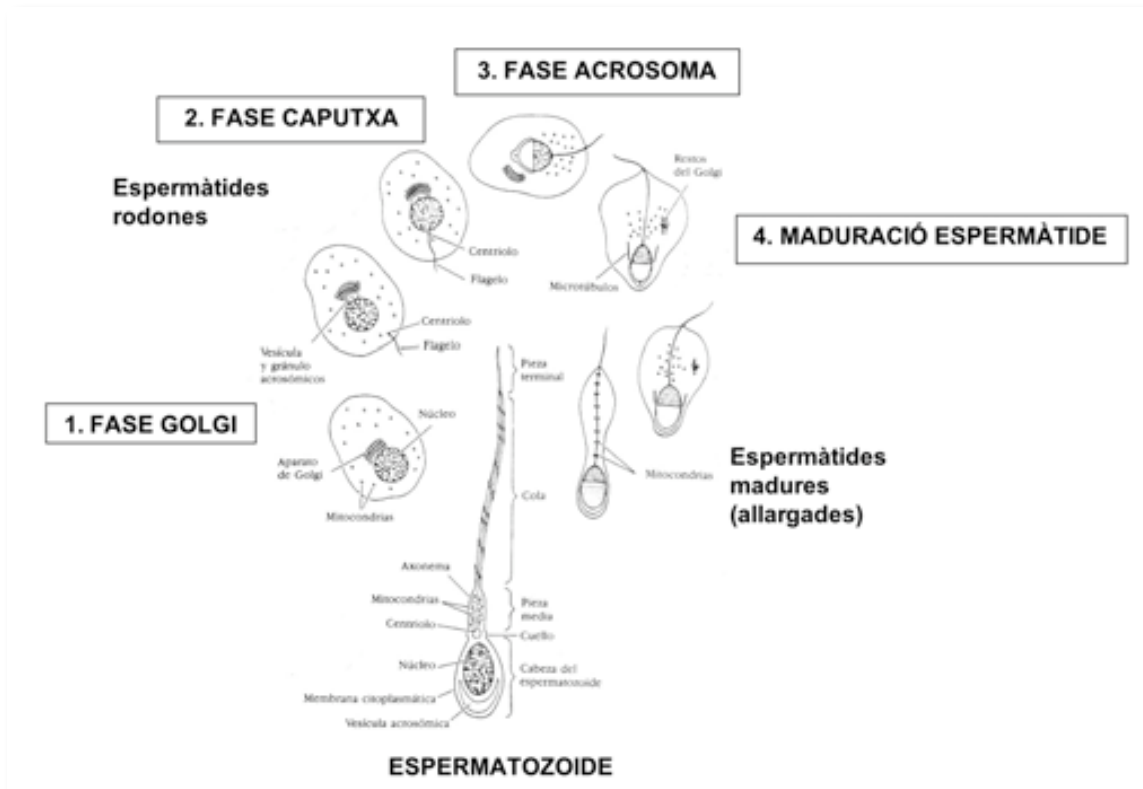


Figura 1.22. Diferenciació citoplasmàtica de l'espermàtide rodona fins a l'espermatozoide. El centríol produeix un llarg flagel que serà l'extrem posterior de l'espermatozoide i l'aparell de Golgi forma una vesícula acrosòmica al futur extrem anterior. Els mitocondris es reuneixen al voltant del flagel prop de la base del nucli haploide i s'incorporen a la peça mitja de l'espermatozoide. S'ha augmentat la mida de l'espermatozoide madur respecte a les altres figures (adaptada de Gilbert (1988)).

El procés de l'espermatogènesi està regulat per hormones. La hipòfisi, (glàndula pituïtària) produeix les gonadotropines FSH (*follicle stimulating hormone*) i LH (*luteinising hormone*). La seva producció és estimulada per l'hipotàlem a través de la hormona GnRH (*gonadotropin releasing hormone*). La FSH estimula l'espermatogènesi i dóna suport a la formació de receptors de la LH a les cèl·lules de Leydig. La testosterona i la FSH indueixen la producció de proteïnes específiques a les cèl·lules de Sertoli, les quals regulen la diferenciació dels espermatòcits i les espermàtides. En una reacció de retroalimentació negativa, la testosterona redueix la producció de LH probablement via la inhibició de la l'alliberament de GnRH. Una proteïna produïda per les cèl·lules de Sertoli, anomenada inhibina, regula la secreció de FSH. Aquests mecanismes de retroalimentació entre els túbuls testiculars i la hipòfisi regulen l'espermatogènesi.

Durada

La figura 1.23 i la taula 1.3 comparen la durada de varis estadis de l'espermatogènesi entre els rosegadors més utilitzats experimentalment i l'home. Els espermatogonis sempre estan presents. Els estadis d'espermatogonis diferenciats duren 6 dies en el ratolí, 10.5 en la rata i 16 dies en l'home tot i que només fan dues rondes de divisió mitòtica davant de les 6 rondes en ratolí i rata. El procés complet del desenvolupament de l'espermatòcit, incloent la meiosi, dura aproximadament 14 dies en el ratolí mascle, 19 dies en la rata mascle i 25 dies en l'home. La diferenciació de les espermatides dura aproximadament 9 dies en ratolí, 12 dies en la rata i 16 dies en l'home. Incloent l'estadi d'espermatozoide testicular, la durada total de l'espermatogènesi és de 35 dies en el ratolí, 50 dies en la rata i 64 dies en l'home. El temps addicional a l'epidídim pel ratolí i la rata és d'aproximadament una setmana, i de 8-17 dies en l'home.

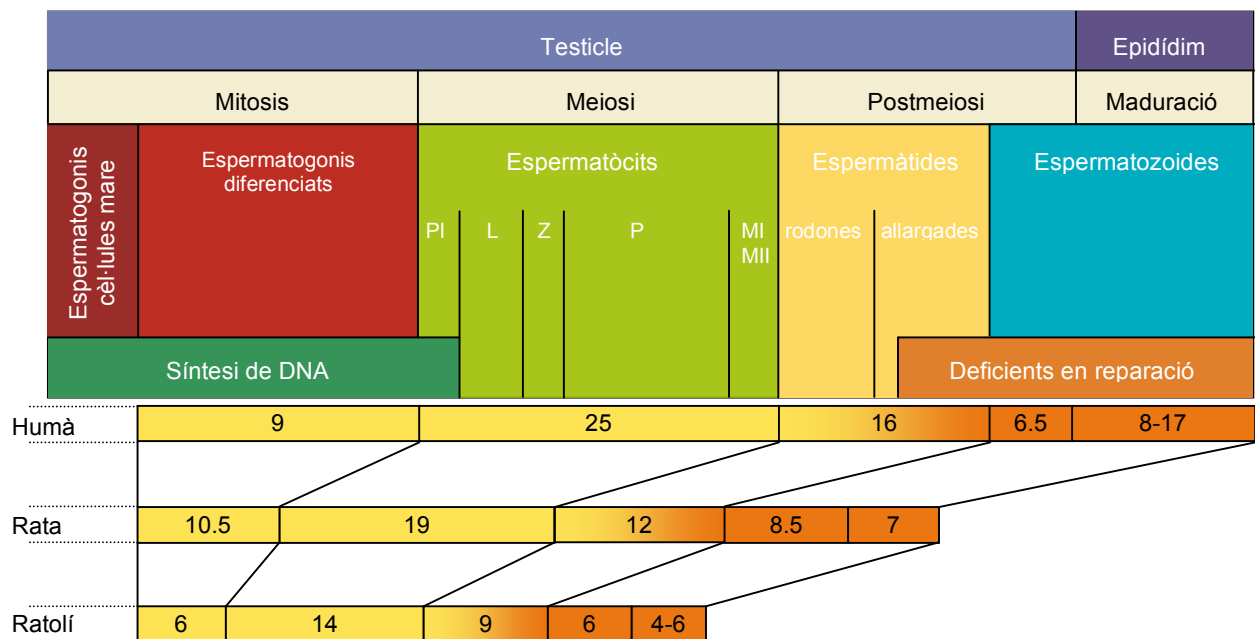


Figura 1.23. Comparació de la durada (en dies) del desenvolupament de les cèl·lules germinals masculines en ratolins, rates i humans. La reparació del DNA no té lloc en els períodes pintats de carbassa. PI: preleptotè; L: leptotè; Z: zigotè; P: paquitè; MI MII: meiosi I i II (adaptada d'Adler (1996) i Marchetti i Wyrobek (2005)).

Taula 1.3. Durada (dies) dels estadis de desenvolupament de les cèl·lules germinals masculines en ratolins, rates i humans. (Adaptada d'Adler (1996)).

	Ratolins ^a	Rates ^b	Humans ^c
Espermatogonis mare			
Espermatogonis diferenciats			
Espermatogonis A	3	7	9.5
Espermatogonis intermedis	2	1.8	-
Espermatogonis B	1	1.7	6.5
	6	10.5	16
Espermatòcits			
Preleptotè (última fase S)	<1.0	3.5	2.5
Profase:			
Leptotè	2.0	1.0	5.5
Zigotè	1.5	2.0	1.0
Paquitè	8.0	11	15
Diplotè	<1.0	<1.0	-
MMI i MMII *	<1.0	>0.5	1.0
	14	19	25
Espermàtides			
Rodones	5	7.5	9.2
Allargades	4	4.5	6.7
	9	12	16
Espermatozoides testiculars	6	8.5	6.5
Total espermatogènesi	35	50	64
Alliberament a l'ejaculat	39-41	57	72-81

* Primera i segona divisió meiótica (transició d'espermatòcit primari a secundari)
^a (Oakberg, 1956a, b); ^b (Clermont *et al.*, 1959); ^c (Heller i Clermont, 1963)

2.Objectius

En el procés de divisió cel·lular és molt important que hi hagi una correcta segregació del material genètic, per això hi ha un seguit de controls del cycle cel·lular que aturen el procés fins que s'hagi resolt el problema existent, o en cas contrari direccionen la cèl·lula cap a la seva mort. Tot i així, hi ha situacions en les que se superen tots aquests controls i s'acaben formant cèl·lules amb anomalies cromosòmiques que poden comportar una proliferació cel·lular alterada i permetre el desenvolupament d'un càncer. A més a més, si aquestes alteracions es presenten a les cèl·lules de la línia germinal hi ha el risc que es puguin transmetre a la descendència.

Els mutàgens físics i químics poden afectar tant el DNA com les proteïnes, induint doncs anomalies cromosòmiques estructurals i numèriques. Es àmpliament conegut l'efecte clastogènic de la radiació ionitzant, i en aquest treball es pretén analitzar el seu potencial aneugènic tant en cèl·lules somàtiques com en germinals. Per poder aconseguir-ho es van plantejar els següent objectius:

1. Analitzar la inducció d'aneuploïdia en limfòcits humans irradiats *in vitro* a diferents dosis de raigs gamma.
2. Analitzar la inducció i la persistència d'aneuploïdia per la irradiació *in vivo* de cèl·lules somàtiques de ratolí.
3. Valorar els tipus d'anomalies cromosòmiques que poden originar micronuclis després de la irradiació *in vivo* de ratolins.
4. Caracteritzar la sensibilitat als raigs gamma dels diferents estadis de l'espermatogènesi en la producció d'espermatozoides amb anomalies numèriques després de la irradiació *in vivo* de ratolins.

3. Materials i Mètodes

MOSTRES BIOLÒGIQUES

Les mostres amb les que s'ha realitzat l'estudi pertanyen a dues espècies diferents de mamífers, els humans i els ratolins.

El tipus cel·lular estudiat en humans són els limfòcits circulants en sang perifèrica. Aquestes mostres es van irradiar *in vitro* i es va estudiar la inducció d'aneuploïdia per part de les radiacions ionitzants.

Els ratolins es van irradiar *in vivo* i es van estudiar els limfòcits localitzats a la melsa, anomenats esplenòcits, i els espermatozoides. El treball amb animals ens ha permès estudiar tant la inducció com la persistència de l'aneuploïdia en cèl·lules somàtiques, els esplenòcits, i la sensibilitat a la radiació ionitzant de diferents estadis de l'espermatogènesi valorada com aneuploïdia en els espermatozoides.

CÈL·LULES HUMANES

Obtenció de les mostres

Per l'estudi de la inducció d'aneuploïdia en humans es van extreure 20 mL de sang perifèrica, per venipunció anterocubital amb una xeringa amb heparina sòdica, a dos donants sans, un home i una dona de 32 i 25 anys respectivament.

Irradiació de la sang

Les mostres es van irradiar amb 1, 2 i 4 Gy de raigs γ utilitzant una font de cobalt (Theratron-780) de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. La calibració de la dosi es va realitzar a la unitat de Radiofísica i Radioprotecció de l'hospital després de la calibració de la unitat de teleteràpia amb un electròmetre (Farmer 2570). La taxa de dosi va oscil·lar entre els 52,86 cGy/min i 51,70 cGy/min degut al desgast del cobalt. Durant les irradiacions es van seguir les recomanacions de la IAEA (Beninson *et al.*, 1986) simulant al màxim les condicions d'irradiació *in vivo*. Breument, es mantenen les mostres de sang a 37 °C des de l'extracció fins que es posen en cultiu; s'omplen completament dos tubs de plàstic de 9 mL amb punta rodona i es col·loquen en un bany a 37 °C. Per mantenir l'equilibri electrònic durant la irradiació, la mostra es col·loca en posició horitzontal, perpendicular a la font de cobalt, i submergida just 1 cm per

sota de la superfície de l'aigua. El camp d'irradiació és de 22 cm x 22 cm i la distància de la font a la superfície de l'aigua és de 80 cm. Posteriorment es deixa la mostra durant 1h 30 min a 37 °C abans de procedir al cultiu.

CULTIU DE LIMFÒCITS BINUCLEATS

Per analitzar la segregació anòmala dels cromosomes després de la irradiació s'aplica la tècnica del bloqueig de la citocinesi (Fenech i Morley, 1985a) que ens permet analitzar els dos nuclis resultants d'una divisió cel·lular englobats en un mateix citoplasma gràcies a la presència d'una substància al medi de cultiu, la citocalasina B, la qual impedeix la formació de l'anell contràctil d'actina requerit per la citocinesi, sense impedir la correcta divisió del nucli.

Reactius i equipament

- ✓ Àcid acètic glacial (Merck)
- ✓ Citocalasina B (Sigma-Aldrich)
- ✓ DMSO (Sigma-Aldrich)
- ✓ Fitohemaglutinina (PHA, GIBCO)
- ✓ Formaldehid (Panreac)
- ✓ H₂O tridestil·lada
- ✓ Heparina sòdica a l'1% (ROVI)
- ✓ L-glutamina 200 mM (GIBCO)
- ✓ Metanol (Merck)
- ✓ Penicil·lina / Streptomina (GIBCO)
- ✓ RPMI-1640 amb glutamina i 25 mM HEPES (GIBCO)
- ✓ Sèrum boví fetal (FCS, GIBCO)
- ✓ Bany a 57 °C (P Selecta, Precistern)
- ✓ Campana de flux laminar per cultius biològics (Telstar, BH-100)
- ✓ Centrifugadora (MLW, T5)
- ✓ Congelador de -20 °C (Zanussi, Tropic System)
- ✓ Eppendorfs d'1,5 mL
- ✓ Gradetes
- ✓ Incubador a 37 °C i 5% de CO₂ (Forma Scientific)
- ✓ Micropipetes
- ✓ Pipetes Pasteur

- ✓ Portaobjectes (Knittel-Gläser)
- ✓ Puntetes per les micropipetes
- ✓ Tubs de 10 mL

Protocol

Preparació del medi (en condicions estèrils)

100 mL de RPMI-1.640 amb glutamina i 25 mM d'Hepes

20 mL de sèrum fetal boví (FCS) inactivat

El sèrum s'inactiva descongelant-lo i deixant-lo 30 min al bany a 57 °C. Després s'alíquota i es congela.

2 mL de Penicil·lina / Streptomicina

2 mL d'heparina sòdica a l'1%

S'homogeneïtza i s'alíquota en tubs de 5 mL. Es conserva a -20 °C.

Sembra de la mostra de sang (heparinitzada i preferentment fresca)

- Es descongelen els tubs amb els 5 mL de medi
- Se suplementa cada tub amb:
 - 50 µL de L-glutamina 200 mM
 - 100 µL de fitohemaglutinina(Aquests dos productes arriben liofilitzats. S'han de dissoldre amb H₂O tridestil·lada: 20 mL per a la glutamina i 10 mL per a la fitohemaglutinina. Es fan alíquotes i es conserven a -20 °C).
- Per cada tub de medi complet, se sembren de 250-300 µL de sang (màxim 8 gotes de sang).

Incubació del cultiu

Durant 72 h a 37 °C i 5% de CO₂.

És convenient col·locar els tubs sembrats inclinats, perquè la sang no precipiti i hi hagi un repartiment de nutrients el més uniforme possible, i agitar-los suament dues vegades al dia.

A les 44h de l'inici del cultiu s'afegeix la Citocalasina B (Cyt B, solució stock 2 mg/mL en dimetilsulfòxid (DMSO)) a una concentració final de 6 µg/mL per bloquejar la citocinesi.

Extracció del cultiu

- Es centrifuguen els tubs a 200 x g durant 8 min
- Es treu el sobrenedant amb molta cura fins a la part cònica, deixant un petit volum de medi
- Es resuspenen en 5 mL de 0,075 KCl a 4 °C
- Immediatament, es centrifuguen a 200 x g durant 8 min i s'elimina el sobrenedant, però no completament.
- Es fixa amb Carnoy, metanol:àcid acètic (3:1, v/v), seguit de 3 gotes de formaldehid.
- Es centrifuga a 200 x g durant 8 min i es resuspenen els pellets. Aquest procés es repeteix varies vegades, però sense afegir les gotes de formaldehid, fins que el sobrenedant quedi clar.
- Les cèl·lules es resuspenen en una quantitat mínima de fixador fresc.
- Es fan les extensions tirant varies gotes suaument al portaobjectes.
- Es guarden al congelador de -20 °C fins a la seva utilització.

HIBRIDACIÓ DE LIMFÒCITS BINUCLEATS

La hibridació amb mostres de cèl·lules binucleades requereix d'un tractament enzimàtic previ amb pepsina per facilitar la penetració de la sonda sense que s'elimini completament el citoplasma, ja que és aquest el que ens permet diferenciar clarament les cèl·lules binucleades de dues cèl·lules mononucleades que a l'atzar hagin quedat disposades una al costat de l'altra.

Reactius i equipament

- ✓ Etanol (Merck)
- ✓ Formaldehid (Panreac)
- ✓ Formamida (Riedel-de Häen)
- ✓ Goma aràbiga
- ✓ H₂O MiliQ
- ✓ HCl (Merck)
- ✓ MgCl₂ (Merck)
- ✓ PBS
- ✓ Pepsina (Sigma-Aldrich)
- ✓ Sonda cromosoma 4 Spectrum Green (Vysis)

- ✓ Sonda cromosoma 4 Spectrum Orange (Vysis)
- ✓ Sonda cromosoma 7 Spectrum Green (Vysis)
- ✓ Sonda cromosoma 18 Spectrum Orange (Vysis)
- ✓ Tampó d'hibridació (Vysis)
- ✓ *4, 6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI, Sigma-Aldrich)
- ✓ Solució antiesvaïment (Vector)
- ✓ Bany a 37 °C
- ✓ Bany a 45 °C
- ✓ Bany a 69-70 °C
- ✓ Cambra humida
- ✓ Cobreobjectes de vidre de 20 mm x 20 mm, 22 mm x 22 mm o 24 mm x 32 mm (Menzel-Gläser)
- ✓ Cubetes Coplin
- ✓ Incubador a 37 °C, 5% de CO₂ i humitat (Shel Lab, model 1535)
- ✓ Xeringa

Solucions

Pepsina 5 µg/mL en HCl 10 mM (50 mL)

5 µL pepsina (100 mg/mL)

50 mL HCl 10 mM

PBS (pH 7,0; 1 L):

8,00 g NaCl

0,20 g HCl

1,15 g Na₂HPO₄

0,20 g KH₂PO₄

H₂O MiliQ fins a 1 L

20 x SSC (pH 5,3)

175.32 g NaCl

88.22 g Citrat sòdic

H₂O MiliQ fins a 1 L

2 x SSC (pH 7,0)

100 mL 20 x SSC

Fins a 1 L H₂O MiliQ

PBS / 50mM MgCl₂ (50 mL):

2,5 mL MgCl₂ 1M

PBS fins a 50 mL

Formaldehid 1% en PBS / 50 mM MgCl₂ (50 mL):

2,50 mL 1M MgCl₂

1,50 mL Formaldehid

PBS fins a 50 mL

70% Formamida / 2 x SSC (pH 7,0-7,5; 50 mL)

35 mL Formamida

5 mL 20 x SSC

10 mL H₂O MiliQ

50% Formamida / 2 x SSC (pH 7,0-7,5; 150 mL)

75 mL Formamida

15 mL 20 x SSC

60 mL H₂O MiliQ

4 x SSC / 0,05% Tween-20 (pH 7,0; 1 L)

200 mL 20 x SSC

2,5 mL 20% Tween-20

H₂O MiliQ fins a 1 L

Protocol

Dia 1

1. Sobre els portaobjectes es fa un tractament enzimàtic suau amb pepsina per eliminar restes citoplasmàtiques que podrien dificultar la hibridació de les sondes. Es deixen els portaobjectes durant 5 min en una solució que conté 5 µg/mL de pepsina en 10 mM HCl a 37 °C. Primer es tempera la solució d'àcid clorhídric a 37 °C i 10 min abans de posar els portaobjectes s'afegeix la pepsina per tal que s'activi.

2. Es fa una postfixació per conservar al màxim la morfologia cel·lular.

Consisteix en els passos següents, tots ells realitzats en agitació:

- 5 min en PBS
- 5 min en MgCl₂
- 10 min en 1% Formaldehid en MgCl₂
- 5 min PBS

3. Es deshidraten els portaobjectes:
 - 3 min etanol al 70%
 - 3 min etanol al 85%
 - 3 min etanol al 100%
4. Es deixen assecar. És important que no passi massa temps des que s'han assecat completament fins que es desnaturalitzin (pas 6) perquè es podrien tornar a hidratar.
5. Es prepara la barreja de sondes i simultàniament anem fent el processat dels portaobjectes:
 - 0,5 μ L sonda cromosoma 4 Spectrum Green
 - 1 μ L sonda cromosoma 4 Spectrum Orange
 - 1 μ L sonda cromosoma 7 Spectrum Green
 - 0,4 μ L sonda cromosoma 18 Spectrum Orange
 - 2,9 μ L sonda
 - 7,1 μ L Buffer
 - 10 μ L/portaobjectes
6. Es desnaturalitzen els portaobjectes durant 5 min amb 70% de formamida en 2 x SSC en un bany d'aigua a 69-70 °C
7. Es torna a fer una deshidratació dels portaobjectes, però ara només 2 min en cada etanol:
 - 2 min etanol 70%
 - 2 min etanol 85%
 - 2 min etanol 100%
8. Es desnaturalitza la sonda durant 5 min en un bany d'aigua a 69-70 °C. Aquest procés es fa paral·lelament amb la deshidratació dels portaobjectes de manera que coincideixi el pas en el que els portaobjectes estan secs i la sonda desnaturalitzada. Per fer més fàcil aquesta coincidència temporal, quan s'enretiren els portaobjectes de l'etanol absolut es col·loquen sobre una placa calefactora a 37 °C, reduint així el temps d'evaporació de l'etanol.
9. S'afegeix la sonda sobre l'àrea del portaobjectes on hi ha la mostra, que prèviament haurem marcat amb un llapis de diamant.
10. Es col·loca un cobreobjectes de vidre de 20 mm x 20 mm, 22 mm x 22 mm o 24 mm x 32 mm, en funció de l'àrea que ocupa la mostra. S'evita que es formin bombolles entre les dues superfícies de vidre

acompanyant amb molta suavitat el cobreobjectes, i si tot i així es donés el cas, es provaria d'eliminar-les fent pressió per un extrem de la bombolla i guiant-la cap a un dels marges del cobreobjectes.

11. Se segellen els marges del cobreobjectes amb goma aràbiga, per evitar que s'evapori la sonda durant el temps d'hibridació. Es deixa que s'assequi la goma.
12. Es col·loquen els portaobjectes en una cambra humida prèviament temperada a 37 °C
13. Es deixa la cambra humida dins d'una estufa a 37 °C i humitat durant tota la nit.

Dia 2

14. Es fan una sèrie de rentats per eliminar les restes de sonda que no han hibridat o que ho han fet de forma inespecífica:
 - 10 min 50% Formamida
 - 10 min 50% Formamida
 - 10 min 50% Formamida
 - 10 min 2 x SSC
 - 5 min 4 x SSC / 0,05% Tween-20
15. Es deshidraten els portaobjectes amb una sèrie d'etanols deixant-los 2 min en cadascun.
16. Es deixen assecar
17. S'afegeixen 30 µL de DAPI (*4, 6-diamidino-2-phenylindole*) barrejat amb una solució antiesvaïment a una concentració de 33 µg/mL. El DAPI és un agent intercalant del DNA que ens serveix de contrastació per poder visualitzar tot el DNA de les cèl·lules. Es deixen reposar a la nevera uns 10 min per permetre que el DAPI pugui i es vegi de forma homogènia al microscopi de fluorescència.

CÈL·LULES DE RATOLÍ

Obtenció de les mostres

Per l'estudi de la inducció i la persistència de l'aneuploidia *in vivo* en cèl·lules somàtiques i germinals, es va treballar amb ratolins mascle de la soca B6SJL F1, que és el resultat del creuament de mascles de la soca

C57BL/6 amb femelles de la soca SJL. En el moment de la irradiació els ratolins tenien entre 9-14 setmanes d'edat.

Irradiació dels ratolins

Les irradiacions es van realitzar al Servei de Radiofísica i Radioprotecció de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona amb la màquina Th-Phoenix.

Reactius i equipament

- ✓ 2,2,2-Tribromoetanol
- ✓ 2-Metil-2 Butanol
- ✓ NaCl 0,9%
- ✓ Xeringues d'1 mL
- ✓ Agulles d'insulina
- ✓ Cinta adhesiva
- ✓ Recipient de metacrilat
- ✓ Planxa de metacrilat
- ✓ CO₂

Solucions

Avertin:

- Solució stock, 1g/mL (es guarda a -20 °C):

10 g de 2,2,2-Tribromoetanol

10 mL de 2-Metil-2 Butanol

Es dissolt bé. És una solució molt espessa i corrosiva.

- Solució d'ús, 18µg/mL (es guarda a -20 °C):

0,18 mL de la solució stock

10 mL de NaCl 0,9%

Com a mínim es prepara la solució aproximadament una setmana abans del seu ús perquè reposi.

Protocol

1. Prèviament a la irradiació els animals s'anestesien amb Avertin, per evitar que es moguin durant el procés. La dosi recomanada és de 20 µL de la solució d'ús/g de pes del ratolí. Els ratolins pesaven uns 25 grams,

de manera que el volum a injectar hauria de ser de 0,5 mL d'Avertin, però al ser animals joves només s'injectaren 0,4 mL d'Avertin intraperitonealment (figura 3.1), obtenint uns resultats satisfactoris en el temps d'anestèsia que va ser al voltant de 30 min a 1 h.

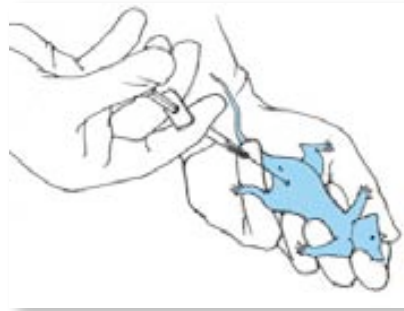


Figura 3.1. Injecció intraperitoneal a un ratolí.

2. S'irradien els ratolins amb raigs γ a 1 o 2 Gy, fent una irradiació total a 0,5 cm de la superfície, posant el ratolí de panxa a terra sobre una superfície de metacrilat. Per tal que l'animal no es mogui en el moment de la irradiació, les 4 potes i la cua dels ratolins s'enganxen amb cinta adhesiva a la placa de metacrilat.

A la dosi de 2 Gy i sacrifici al mateix dia, 0 dpi, els ratolins es van irradiar d'un en un, i en les altres situacions es van fer de tres en tres. En el cas de la irradiació d'un en un el camp va ser de 15 cm x 15 cm, i en el dels tres alhora el camp va ser de 25 cm x 25 cm.

La taxa de dosi va oscil·lar entre 147,66 i 136,65 cGy/min degut al desgast de la font de Cobalt (camp 15 cm x 15 cm: 142,06 cGy/min; camp 25 x 25: 147,66, 146,02, 128,23, 144,43, 139,71, 138,17, 136,65 cGy/min).

3. A l'arribar al laboratori, es deixen els animals a l'estabulari, si no s'han de sacrificar al moment, on es mantenen separats, cadascun en una gàbia, fins el dia del seu sacrifici.
4. Els ratolins se sacrifiquen amb CO_2 al cap de 0, 1, 3, 7, 14, 28 i 56 dies postirradiació (dpi).

CULTIU D'ESPLENÒCITS

Els esplenòcits són limfòcits residents a la melsa. S'han analitzat en estat de cèl·lules binucleades i en metafase, i per a la seva obtenció el protocol de cultiu varia lleugerament.

Reactius i equipament

- ✓ Àcid acètic glacial (Merck)
- ✓ Alcohol 96° (MPL)
- ✓ Citrat sòdic 0,03 M (Merck)
- ✓ Clorur potàssic 0,075 M (Merck)
- ✓ Concanavalina A (Con A) (Sigma-Aldrich) [1 mg/mL]
- ✓ Fitohemaglutinina (PHA) (GIBCO) [1mg/mL]
- ✓ Formaldehid (Panreac)
- ✓ Histopaque-1.119, 100 mL (Sigma-Aldrich)
- ✓ HL-1 Complete Serum-free Medium. 500 mL (Innogenetics)
- ✓ KaryoMax Colcemid líquid. 10 mL (GIBCO)
- ✓ Metanol (Merck)
- ✓ PBS⁻ (-Ca²⁺, -Mg²⁺)
- ✓ Penicil·lina / Estreptomicina, líquid 20 mL (Life Technologies)
- ✓ RPMI-1640 amb glutamina i 25 mM HEPES. 500 mL (Life Technologies)
- ✓ Sèrum boví fetal (FCS)
- ✓ Agulles d'insulina
- ✓ Bany d'aigua a 37 °C
- ✓ Campana de flux laminar (Telstar, BH-100)
- ✓ Centrifuga (MLW, T5)
- ✓ Incubador a 37 °C i 5% de CO₂
- ✓ Nevera a 4 °C
- ✓ Pinces
- ✓ Pipetes Pasteur de plàstic
- ✓ Pipetes Pasteur de vidre
- ✓ Portaobjectes (Knittel-Gläser)
- ✓ Tisores
- ✓ Tubs de 10 mL de vidre
- ✓ Vidres de rellotge
- ✓ Xeringues d'1 mL

Medis**Medi d'obtenció (5 mL/tub):**

RPMI-1.640	3,65 mL
20% HL-1	1 mL
6% FCS	0,3 mL
1/100 pen/strp	50 µL

Medi de cultiu (≈5 mL/tub):

RPMI-1.640	3,65 mL
20% HL-1	1 mL
6% FCS	0,3 mL
1/100 pen/strp	50 µL
5 µg/mL PHA	25 µL
2,5 µg/mL Conc. A	12,5 µL

Protocol

- Ratolí d'entre 9 i 14 setmanes
- Es treu la melsa estèrilment
- Es renta la melsa amb PBS sense calci ni magnesi (PBS⁻)
- Es col·loca la melsa en un vidre de rellotge i s'injecta medi RPMI (d'obtenció) varies vegades amb una xeringa d'1 mL. En total 5 mL.
- Es recull el medi. Els esplenòcits i demás cèl·lules estaran diluïts en 5 mL de medi.
- Se separen els esplenòcits mitjançant la separació en Ficoll (Histopaque-1.119).
Es posen 5 mL d'Histopaque en un tub de 10 mL de vidre, llavors s'afegeixen amb molta cura els 5 mL que hem recollit al perfondre la melsa amb medi.
- Es centrifuguen els tubs durant 15 min a 600 x g a temperatura ambient ($T = 18-26$ °C)
- Es recull la interfase, a on trobarem les cèl·lules mononuclears, plaquetes i granulòcits (figura 3.2)

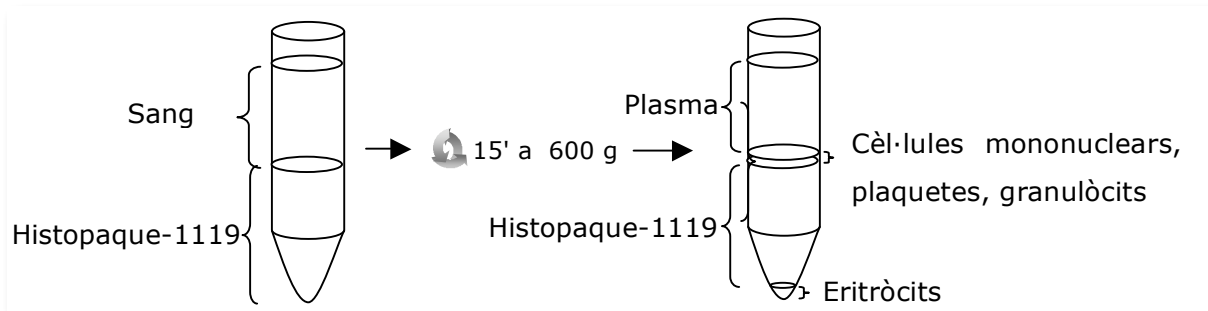


Figura 3.2. Separació de cèl·lules sanguínies per Ficoll.

- Es renta el que hem recollit en 10 mL de PBS⁻
 - Es centrifuga 5 min a 600 x g
 - S'elimina el sobrenedant
 - S'afegeixen 10 mL de medi de cultiu al pellet, i es reparteix en 2 tubs.
- } x 3

Obtenció de cromosomes

- S'incuben els cultius durant 40h a 37 °C i 5% CO₂
- S'agiten els tubs suaument 3 vegades al dia.
- A les 38h de cultiu s'afegeixen 0,08 µg/mL de Colcemid, i es deixa actuar durant 1 h 2 h.

Extracció del cultiu (a les ≈ 40h)

- Es centrifuguen els tubs durant 6 min a 600 x g
 - Es treu el sobrenedant
 - S'afegeixen de 4-5 mL d'hipotònic (Citrats sòdic 0,03M) a 37 °C
 - Es deixen 30 min a 37 °C
 - Es centrifuguen 6 min a 600 x g
 - S'elimina el sobrenedant
 - S'afegeixen de 4-5 mL de fixador (carnoy: metanol: acètic, 3:1)
 - Es centrifuguen 6 min a 600 x g
 - Es resuspenen amb fixador fresc (unes 20 gotes)
 - Es fa una extensió en un portaobjectes per comprovar la concentració cel·lular
 - Es guarda el pellet en metanol (3 mL) a -20 °C
 - En el moment de fer les extensions afegirem 1 mL d'àcid acètic i ho barrejarem bé, centrifugarem, eliminarem la resta de carnoy que ens
- } x 3

sobra per tenir la concentració cel·lular desitjada i finalment farem les extensions.

Obtenció de cèl·lules binucleades

- S'incuben durant 50h a 37 °C i 5% CO₂
- S'agiten els tubs suaument 3 vegades al dia.
- A les 18h de cultiu s'afegeixen 6 µg/mL de Citocalasina B (solució stock 2 mg/mL en DMSO)

Extracció del cultiu (a les ≈ 50h)

- Es centrifuguen els tubs 6 min a 600 x g
- Es treu el sobrenedant fins a la part cònica i es resuspèn el pellet amb pipetes de plàstic
- S'afegeixen de 4-5 mL d'hipotònic fred (KCl 0,075M a 4 °C)
- Immediatament es centrifuga 6 min a 600 x g
- S'elimina el sobrenedant i es resuspèn el pellet
- S'afegeixen de 4-5 mL de fixador (carnoy: metanol: acètic, 3:1) + 3 gotes de formaldehid
- Es centrifuguen 6 min a 600 x g
- S'elimina el sobrenedant i es resuspèn el pellet
- Es repeteix el pas del fixador sense el formaldehid 2 vegades més
- Es resuspèn amb fixador fresc (unes 20 gotes)
- Es fa una extensió en un portaobjectes per comprovar la concentració cel·lular
- Es guarda el pellet en metanol (3 mL) a -20 °C
- En el moment de fer les extensions afegirem 1 mL d'àcid acètic i ho barrejarem bé, centrifugarem, eliminarem la resta de carnoy que ens sobra per tenir la concentració cel·lular desitjada i finalment farem les extensions.

OBTENCIÓ D'ESPERMATOZOIDES DE L'EPIDÍDIM

Reactius i equipament

- ✓ Plaques de petri
- ✓ Tisoires
- ✓ Pinces

- ✓ Medi M2
- ✓ Centrífuga refrigerada (Hettig Zentrifugen Universal 16R)
- ✓ Incubador a 37 °C i 5% de CO₂ (Forma Scientific)
- ✓ Bany a 37 °C (P Selecta, Precistern)
- ✓ Pipetes de plàstic
- ✓ KCl 0,075 M
- ✓ Portaobjectes (Knittel-Gläser)

Protocol

1. Es talla l'epidídim i es deixa en medi M2 aproximadament 30 min a l'incubador a 37 °C i 5 % de CO₂
2. Es pressiona l'epidídim perquè surtin els espermatozoides
3. Es recull el què ha sortit i es passa a un tub de 10 mL
4. Es deixen 15 min a 37 °C per disgregar els espermatozoides
5. Es centrifuga durant 15 min a 800 x g a 4 °C
6. S'elimina el sobrenedant i es resuspenen amb suavitat
7. S'afeixen 5 mL de KCl 0,075 M a 37 °C i es deixa actuar durant 20 min a 37 °C
8. Es centrifuga durant 15 min a 800 x g a 4 °C
9. S'afegeixen de 4-5 mL de fixador carnoy (metanol: acètic, 3:1)
10. Es centrifuguen 6 min a 600 x g
11. S'elimina el sobrenedant i es resuspèn el pellet
12. Es repeteix el pas del fixador dues vegades més
13. Es resuspèn en un petit volum
14. Es fa una extensió en un portaobjectes per comprovar la concentració cel·lular
15. Es guarda el pellet en 3 mL de metanol a -20 °C

OBTENCIÓ DE DNA DE PACS I BACS: MINIPREPARACIÓ

Els PACs (*P1 Artificial chromosome*) són plasmidis derivats del bacteriòfag P1 que poden clonar inserts grans, amb una mida mitjana de 115kb. Els BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*) són plasmidis derivats del replicó F que poden incloure fragments de DNA genòmic d'entre 100 i 200 kb.

Els mètodes d'obtenció del DNA de plasmidis es basen en recuperar els bacteris (soques receptores) per centrifugació i lisar-les amb EDTA. Pel mètode d'extracció alcalina, es desnaturalitzen les molècules de DNA lineal (però no les molècules de DNA circular del plasmidi), que precipiten en medi neutre amb alta concentració de sals, de manera que es pot aïllar fàcilment el DNA plasmídic dels fragments cromosòmics bacterians.

Es va obtenir el DNA dels PACs i BACs a través d'una modificació del mètode estàndard de Qiagen, que fa servir la lisi alcalina i extracció no orgànica.

Reactius i solucions

- Medi LB (Luria Bertani)
 - 10 g de triptona
 - 5 g d'extracte de llevat
 - 5 g NaCl
 - fins a 1L d'H₂O MiliQ
 - S'ajusta el pH a 7,4 amb NaOH
 - S'autoclava
 - Es deixa refredar fins a uns 65 °C
 - S'afegeix kanamicina (kan) per a obtenir una concentració final de 25 µg/mL en el cas dels PACs i cloramfenicol (Cm) per a obtenir una concentració de 25 µg/mL en el cas del BACs
- Plaques de medi LB:
 - 17 g d'agar
 - 1L de medi LB
 - S'autoclava.
- Solució 1 (esterilitzada per filtració, 4 °C):
 - 15 mM Tris base, pH 8,0
 - 10 mM EDTA
 - 100 µg/mL ribonucleasa A (Rnasa A)
- Solució 2 (esterilitzada per filtració, temperatura ambient). Es prepara al moment:
 - 0,2 N NaOH
 - 1% SDS

- Solució 3 (autoclavada, 4 °C):
3 M KOAc, pH 5,5
- TE 10/1:
10 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM EDTA, pH 8

Protocol

1. Es fan estries de l'*stab* original en una placa de LB/antibiòtic per tal d'obtenir colònies úniques.
2. S'inocula una colònia a un cultiu de 5 mL de medi LB/antibiòtic i es fa créixer de 16 h a 20 h a 37 °C en agitació a 250 rpm
3. Es preparen els glicerols del cultiu ON per poder guardar un *stab* original
0,2 mL glicerol
0,8 mL cultiu ON
Es guarda a -80 °C
4. Es transfereixen 1,5 mL de cultiu en un tub eppendorf.
5. Es centrifuga a 4.000 x g durant 5 min.
6. Es descarta el medi i s'afegeixen 1,5 mL més de cultiu.
7. Es repeteixen els passos 5 i 6 les vegades que faci falta fins que es centrifugui tot el cultiu.
8. Es descarta el sobrenedant. Es resuspèn el sediment de cèl·lules en 0,3 mL de la solució 1 i es barreja bé fins que no quedi cap grumoll. En aquest pas es pot utilitzar el vòrtex.
9. S'afegeixen 0,3 mL de la solució 2, es barreja per inversió suament (no podem utilitzar el vòrtex) i es deixa a temperatura ambient durant 5 min. L'aparença de la suspensió hauria de canviar de molt tèrbola a bastant transparent.
10. S'afegeixen molt a poc a poc 0,3 mL de la solució 3, es barreja per inversió suaument, sense vòrtex, i es deixa 15 min en gel. Apareix un precipitat blanc format per proteïnes i DNA d'*E. coli*.
11. Es centrifuga a 13.000 x g durant 20 min a 4 °C.
12. Es recupera el sobrenedant, tenint molta cura de no emportar-nos restes del precipitat blanc, i es reparteix en dos tubs de 2 mL aproximadament 0,4 mL a cadascun. En el cas que aspiréssim alguna resta cel·lular dels bacteris es repetiria el pas 11.

13. S'afegeix el mateix volum, 0,4 mL, de fenol:cloroform (25:24) i s'agita enèrgicament.
14. Es deixa 5 min a temperatura ambient.
15. Es centrifuga 2 min a 13.000 x g
16. Es recull la fase aquosa (la superior) i es col·loca en un eppendorf net.
17. S'afegeixen 2,5 volums d'EtOH absolut fred.
18. Es deixa 1 h a -20 °C perquè precipiti el DNA
19. Es centrifuga a 13.000 x g durant 20 min a 4 °C.
20. Es recupera el sobrenedant i s'afegeixen 0,5 mL d'etanol al 70% fred. S'inverteix varies vegades per netejar el sediment de DNA i es centrifuga a 13.000 x g durant 20 min.
21. Es treu tot el sobrenedant possible i es deixa assecar el sediment a temperatura ambient o uns 5 min a 37 °C. Quan el pellet passa del color blanc a un de translúcid voldrà dir que la majoria d'etanol s'ha evaporat.
22. Es resuspèn el pellet en 50 µL de TE 10/1 i es deixa en agitació a 37 °C en el *thermomixer* durant 30 min. També es podria resuspèndre en aigua, però després haurem de tenir la precaució de guardar-ho a -20 °C per evitar que s'evapori.
23. Es fa un pols de centrifugadora.
24. Es guarda a -20 °C fins a la seva utilització. Si està resuspès en TE també es pot guardar a 4 °C.

MARCATGE DE LES SONDAS

Les sondes de DNA utilitzades en aquest treball són detectades mitjançant fluorescència, ja sigui perquè durant el procés de síntesi s'han incorporat nucleòtids amb un fluorocrom conjugat o bé nucleòtids associats a un haptè, el qual serà reconegut per anticossos específics, o d'altres molècules amb gran afinitat, que porten associat un fluorocrom. En el nostre cas s'han utilitzat dues sondes, cadascuna d'elles visualitzades amb un color diferent, així doncs, per localitzar la sonda del cromosoma 8 s'ha utilitzat el color verd i per la sonda del cromosoma 14 el vermell.

Pel marcatge de les sondes s'ha utilitzat la tècnica de nick translation, la qual ens ha donat més bons resultats que d'altres tècniques de PCR, com la DOP-PCR o el random priming. S'han utilitzat diferents kits de marcatge, dos pel marcatge indirecte i un pel directe. A continuació es detallen:

Marcatge indirecte

Marcatge de sondes de DNA per Nick Translation kit de GIBCO

Aquest protocol està basat en el descrit en el kit "Nick Translation System" per marcar les sondes de DNA amb Bio-11-dUTP o Bio-16-dUTP.

Reactius i solucions

- ✓ kit de "Nick Translation System" (GIBCO BRL)
- ✓ Biotina-16-dUTP (Biotina-16-2'-desoxiuridina-5'-trifosfat; Roche)
- ✓ DIG-11-dUTP (Digoxigenina-11-2'-desoxiuridina-5'-trifosfat; Roche)
- ✓ NH₄Acetat
- ✓ DNA d'esperma de salmó sonicat (10 mg/mL) (Amersham Pharmacia Biotech)
- ✓ Etanol (Merck)
- ✓ H₂O MiliQ
- ✓ Agarosa (Bio Rad)
- ✓ Bromur d'Etidi (Sigma-Aldrich)
- ✓ Marcador de DNA de 100 pb (Invitrogen, Life Technologies)
- ✓ COT-1 DNA de ratolí (Invitrogen)
- ✓ EDTA (Fluka)

- ✓ TNE (0,01 M Tris, 0,05 M NaCl, 1 mM EDTA), pH 7,0 – 8,0
 - 0,06055 g Tris
 - 0,1461 g NaCl
 - 0,0146 g EDTA
 - Fins a 50 ml en H₂O MiliQ

- ✓ TAE (Tris – acetat; pH 7,5 – 7,8)
 - Solució stock (50x, 1 L)*
 - 242 g Tris base
 - 57,1 mL àcid acètic glacial
 - 100 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0)
 - Solució de treball (1 x, pH 7,5 – 7,8)*
 - 0,04 M Tris-acetat
 - 0,001 M EDTA

- ✓ 0,5 M EDTA (pH 8,0; 100 mL)
 - 18,61 g EDTA
 - Fins a 100 mL d'H₂O MiliQ
- ✓ Tampó de càrrega 6x (0,25% blau de bromofenol, 40 % (w/v) sucrosa en aigua). Es guarda a 4 °C
 - 0,8 g sucrosa
 - 5 mg blau de bromofenol
 - Fins a 2 mL d'H₂O MiliQ
- ✓ SDS 5% (pH 7,2, 10 mL)
 - 0,5 g SDS de grau d'electroforesi
 - 9 ml d'H₂O MiliQ
 - Es dissol a 68 °C
 - S'ajusta el pH a 7,2 afegint HCl
 - S'ajusta el volum fins a 10 ml amb H₂O MiliQ
 - S'alíquota
- ✓ TE (10 mM Tris Cl, 1 mM EDTA; pH 8,0; 100 mL)
 - 0,1211 g Tris base
 - 0,03722 g EDTA
 - 95 mL d'H₂O MiliQ
 - S'ajusta el pH amb HCl. El pH varia en funció de la temperatura, per això s'ha de mesurar quan la solució estigui a temperatura ambient
 - S'ajusta el volum a 100 ml
 - S'alíquota
 - S'esterilitza autoclavant-ho

Material i equipament

- ✓ Tubs Eppendofs d'1,5 ml
- ✓ Gel picat
- ✓ Centrifugadora refrigerada
- ✓ Bany a 15 °C
- ✓ Bany a 70 °C
- ✓ Columnes de Sephadex G-50 (Amersham Pharmacia Biotech, Nick Columns Sephadex G-50 DNA grade)

- ✓ Congelador a -20 °C
- ✓ Nevera a 4 °C
- ✓ Font d'electroforesi
- ✓ Cubeta d'electroforesi horitzontal
- ✓ Transil·luminador de llum UV
- ✓ Matràs d'Erlenmeyer
- ✓ Proveta
- ✓ Gel Doc (Bio Rad)

Protocol

1. En un eppendorf en gel picat s'afegeix:
 - 5 μL Solució A4
 - X μL DNA sonda (1 μg)
 - 3,3 μL Biotina-16-dUTP o DIG-11-dUTP
 - 36,7 -X μL Aigua tridestil·lada (Solució E)
2. S'afegeixen 5 μL de la Solució C (DNA polimerasa I / DNAsa I)
3. Es barreja suaument i es fa un pic de centrifugadora
4. S'incuba 90 minuts a 15 °C
5. Per aturar la reacció es deixa:
 - 10 min a 70 °C
 - 15 min a -20 °C (com a mínim)
6. Es fa un gel d'agarosa al 1,5% per comprovar la mida dels fragments.
 - S'afegeixen 0,45 g d'agarosa en 30 ml de TAE i 5 ml d'H₂O MiliQ en un matràs d'Erlenmeyer
 - Es dissol l'agarosa escalfant-la al microones durant 1 min i 20 s. Es remena i es torna a escalfar uns 20 s més.
 - S'aboca a una proveta, i s'enrasa a 30 ml amb aigua MiliQ
 - Es traspasa l'agarosa a la safata (10 cm x 6,5 cm) de la cubeta d'electroforesi, on prèviament s'hauran segellat els laterals amb cinta adhesiva, es col·loca la pinta perquè quedin marcats els pous
 - Es deixa uns 20 min a temperatura ambient perquè es refredi i se solidifiqui
 - S'enretiren la pinta i la cinta adhesiva
 - Es col·loca la safata a la cubeta d'electroforesi

- S'omple la cubeta de TAE cobrint el gel com a mínim 1 mm.
 - Es carreguen 8 μL de la sonda marcada en un pou juntament amb 1 μL de tampó per cada mostra, i paral·lelament en un altre pou es fa córrer un marcador de DNA amb fragments de 100 pb de mida.
 - Es deixa córrer entre 45 min i 1 h a 100 V
 - Un cop ha corregut el gel, es tenyeix amb bromur d'etidi (1 ng de BrEt en 1 L d'aigua destil·lada) uns minuts
 - Es renta amb aigua destil·lada per eliminar l'excés de bromur d'etidi que no s'ha unit al DNA
 - Es col·loca al transil·luminador de llum UV i es fa una fotografia, ja sigui amb una polaroid o digitalment amb el GelDoc.
 - S'estima el rang de la mida dels fragments. S'obté un *smear* de DNA on la majoria de fragments haurien de ser d'entre 200 pb i 500 pb. Si els fragments són més grans es pot afegir una mica d'enzim i deixar-ho a 15 °C una estona més (ex: 30 min) dependent de lo grans que hagin sortit, es torna a parar la reacció com abans, i es torna a visualitzar en un gel d'agarosa.
Si s'augmenta la quantitat d'enzim i/o la concentració d'enzim s'aconsegueix que la majoria dels fragments de DNA siguin d'una mida més petita. És important tenir-ho en compte a l'hora d'ajustar les condicions de la nick per cada mostra.
7. Un cop s'ha aconseguit la mida dels fragments desitjada s'afegeixen:
- 5 μL Solució D (*Stop buffer*)
 - 1,25 μL SDS 5%

Marcatge de sondes de DNA per Nick Translation amb kits de Roche

Reactius i solucions

- ✓ Bio-Nick Translation Mix (Roche)
- ✓ DIG-Nick Translation Mix (Roche)
- ✓ Agarosa (BioRad)
- ✓ TAE
- ✓ Tampó de càrrega

- ✓ Tampó de la columna filtrat

Tris-EDTA (10/1) 49 mL

SDS 10% 1 mL

Es passa per un filtre de 0,22 μm i es guarda a temperatura ambient.

Materials i equipament

- ✓ Bany a 15 °C
- ✓ Bany a 70 °C
- ✓ Congelador a - 80 °C
- ✓ Columnes de Sephadex G-50: AutoSeq G-50 (Amersham Biosciences)

Protocol

Aquests kits venen amb la barreja feta i només s'han d'afegir 4 μL de la barreja (*mix*) per reacció, el volum total de la qual és de 20 μL . La concentració de DNA que recomanen utilitzar és d'1 μg .

1. Es deixa 1 h i 30 min a 15 °C
2. Per aturar la reacció:
 - 10 min a 70 °C
 - 15 min a -20 °C (com a mínim)
3. Es prepara un gel d'agarosa a l'1,5% com s'ha explicat a l'apartat anterior, i es carreguen 3 μL del producte de la reacció de cada mostra ja que el volum de la reacció és la meitat. Es comprova la mida dels fragments de DNA i si és la correcta es procedeix a la filtració de les sondes.

Filtració de les sondes

Serveix per eliminar les restes de nucleòtids no incorporats i l'enzim.

4. S'equilibra una columna de Sephadex G-50 afegint 3 mL de TNE (compte que la columna no s'assequi).
5. Un cop equilibrada, i tenint la precaució que no s'assequi la columna, es diposita la mostra a la part superior de la columna, es deixa penetrar i s'afegeixen 0,4 mL de TNE. Es descarta el tampó que surt de la columna, sense deixar caure l'última gota que penja.

6. Es col·loca un eppendorf sota la columna, s'afegeixen 0,4 mL de TNE i es recull el què surt de la columna.

Precipitació de la sonda

7. S'afegeixen:

1 μ L DNA d'esperma de salmó (10 mg/mL)

40 μ L NH₄Acetat 3M

8. Es barreja suaument i es fa un pic de centrifugadora
9. S'afegeix 1 mL d'etanol al 100% fred i es barreja per inversió suaument
10. Es deixa a -20° d'1 hora a tota la nit (pot estar força hores a -20° C, però no és convenient excedir-se ja que es pot fragmentar el DNA).
11. Es centrifuga a 13.000 x g a 4 $^{\circ}$ C durant 20 minuts
12. S'elimina el sobrenedant per aspiració
13. S'afegeixen 500 μ L d'EtOH al 70% fred
14. Es centrifuga a 13.000 x g a 4 $^{\circ}$ C durant 20 min
15. S'elimina el sobrenedant i s'asseca el pellet a la bomba de buit amb molta cura. Si no es disposa de bomba de buit es deixa uns 5 min a una estufa, un bany sec i bé un *thermomixer* a 37 $^{\circ}$ C
16. Es resuspèn el pellet en 8 μ L de TE pH 8
17. Es deixa a la nevera almenys fins al dia següent per tal que es resuspengui bé o bé 30 min a 37 $^{\circ}$ C
18. Es guarda a -20° C

Marcatge directe

Marcatge directe de la sonda de DNA amb un kit de Vysis

Reactius i solucions

- ✓ SpectrumGreen(TM)-dUTP (Vysis) (50 nmol, liofilitzat)
 - ✓ SpectrumOrange(TM)-dUTP (Vysis) (50 nmol, liofilitzat)
- Els dos nucleòtids marcat es reconstitueixen en 50 μ L H₂O MiliQ o tampó TE i es guarden a -20° C protegits de la llum.
- ✓ Nick Translation Kit (Vysis) (s'ha de guardar a -20° C)

Aquest kit de nick translation està dissenyat per marcar DNA amb fluorescència utilitzant els dUTPs marcats associats a fluorocroms de Vysis. El kit inclou:

- Barreja d'enzims per la nick translation (525 µL)
- 10x tampó de nick translation (300 µL)
- dATP, dCTP, dGTP and dTTP solutions (200 µL cadascuna)
- Aigua lliure de nucleases (1.500 µL)
- El protocol pel marcatge de nick translation amb els Spectrum dUTP de Vysis

Reactius

0,2 mM SpectrumGreen o SpectrumOrange dUTP

- 10 µL 1 mM dUTP
- 40 µL aigua lliure de nucleases

0,1 mM dTTP

- 10 µL 0,3 mM dTTP
- 20 µL aigua lliure de nucleases

0,1 mM dNTP mix

- 10 µL 0,3 mM dATP
- 10 µL 0,3 mM dCTP
- 10 µL 0,3 mM dGTP

Protocol

1. Es col·loca un tub eppendorf en gel per tal que es refredi el tub.
2. S'afegeixen al tub els components següents:

(17,5-x)	µL d'aigua lliure de nucleases
x	µL 1 µg DNA de la sonda
2,5	µL 0,2 mM SpectrumGreen o SpectrumOrange dUTP
5	µL 0,1 mM dTTP
10	µL dNTP mix
5	µL 10x tampó de nick translation
10	µL enzim de la nick translation
<hr/>	
50	µL volum total

3. Es barreja amb el vòrtex.
4. S'incuba durant 1h i 30 min en un bany d'aigua a 15°C.
5. S'atura la reacció escalfant el tub a 70°C en una bany d'aigua durant 10 min.
6. Es refreda en gel durant 30 min.
7. Per comprovar la mida dels fragments es visualitza en un gel d'agarosa a l'1% tal com està descrit a l'apartat anterior. En aquest cas es carreguen 9 µL del producte de la reacció

Filtració de les sondes

Es filtren amb columnes de Sephadex G-50

8. Es resuspèn la resina de la columna vortejant (o agitant manualment) suaument.
9. S'afluixa el tap 1/4 de volta i trenca el tap de baix.
10. Es posa la columna dins d'un tub d'1,5 mL
11. Es centrifuga 1 min a 2.000 x g
12. S'afegeixen 100 µL de tampó de la columna
13. Es centrifuga 1 min a 2.000 x g
NOTA: S'han d'utilitzar les columnes immediatament per evitar que s'assequi al resina.
14. Es treu el tap
15. Es posa la columna en un nou tub d'1,5 mL i a poc a poc s'afegeix la mostra (en un volum de 12 µL a 25 µL) al centre de la superfície angulada de la resina compactada, vigilant de no tocar la resina.
16. Es centrifuga 1 min a 2.000 x g
17. Es descarta la columna

Precipitació de la sonda

Materials

DNA d'esperma de salmó sonicat, 10 mg/mL

(Current Protocols in Molecular Biology, 14.7.10 (Volum 3))

Tris 50 mM (2 mL)

0,1 mL Tris 1M

1,9 mL H₂O estèril

10 mg/mL DNA d'esperma de salmó (2 mL)

20 mg DNA d'esperma de salmó (Fluka)

2 mL Tris 50 mM

1. Es dissolen 10 mg de DNA d'esperma de salmó en 1 mL d'aigua estèril* en un tub de policarbonat.
2. Se sonica 3 vegades, 30 segons cada vegada, a la màxima potència, refredant el tub en gel entre *bursts*
3. Es comprova la mida dels fragments de DNA en un gel d'agarosa, haurien de ser de 200 pb a 400 pb.
4. Es guarda en alíquotes de 50 µL fins a 1 any a -20 °C

* Fluka, recomana que es dissolgui en 50 mM Tris a la mateixa concentració.

Formamida desionitzada

Amberlite AG501 25 g

Formamida 500 mL

S'agita durant 2 h, es filtra, s'alíquota i es guarda a -20 °C

Dextrà sulfat

Dextrà sulfat 10 g

20 x SSC 30 mL

H₂O MiliQ 50 mL

Es filtra, s'alíquota, i es guarda a -20 °C, excepte l'alíquota que s'utilitza que pot estar a 4 °C

Mètode

1. S'afegeix a cada tub:

2 μ L ssDNA

3 μ L Cot-1 DNA

80 μ L H₂O

~100 μ L

+ 10 μ L NaCl 1M (1:10)

+ 200 μ L EtOH 100% fred (2 volums)

2. Es deixa precipitant a -20 °C durant 30 min a 1 h

3. Es centrifuga 20 min a 13.000 g a 4 °C

4. Es decanta el sobrenedant (SN)

5. S'afegeix 1 mL d'EtOH 70% fred

6. Es centrifuga 20 min a 13.000 g a 4 °C

7. Es decanta el SN

8. S'eixuguen les parets del tub amb un kleenex

9. Es tapa amb parafilm i s'hi fan uns foradets

10. Es deixa de 8 min a 15 min a 37 °C, ja sigui a l'estufa o bé al *thermomixer*, perquè s'evapori l'EtOH. El pellet passa de color blanc a transparent.

11. Un cop el pellet està sec, es resuspèn en:

10 μ L Formamida desionitzada. Es barreja bé

↓

5 min a 65 °C perquè es resuspengui bé

↓

10 μ L 20%Dextrà Sulfat / 12 x SSC

12. Es guarda a 4 °C

HIBRIDACIÓ D'ESPLENÒCITS BINUCLEATS

Es van hibridar amb sondes marcades amb biotina i digoxigenina i detectades amb FITC i Rodamina respectivament.

Reactius i equipament

- ✓ 20x SSC
- ✓ Anti-DIG-Rodamina (Roche)
- ✓ Biotinilated Anti-Avidin D (Vector)
- ✓ Etanol (Merck)
- ✓ Fluorescein avidin DCS (Vector)
- ✓ Fluorescent Antibody Enhancer Set for DIG Detection (Roche)
- ✓ Formaldehid (Panreac)
- ✓ Formamida (Riedel-de Häen)
- ✓ H₂O MiliQ
- ✓ HCl 10 mM
- ✓ MgCl₂
- ✓ PBS
- ✓ Pepsina (Sigma-Aldrich)
- ✓ Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- ✓ Bany d'aigua a 37 °C
- ✓ Bany d'aigua a 45 °C
- ✓ Cobreobjectes de plàstic (Appligene Oncor)
- ✓ Cobreobjectes de vidre
- ✓ Cubetes coplin
- ✓ Estufa a 37 °C i humitat
- ✓ Goma aràbiga

Solucions**PBS / 50mM MgCl₂ (50 mL):**

2,5 mL MgCl₂ 1M

PBS fins a 50 mL

Formaldehid 1% en PBS / 50 mM MgCl₂ (50 mL):

2,50 mL 1M MgCl₂

1,50 mL Formaldehid

PBS fins a 50 mL

70% Formamida / 2x SSC (pH 7,0-7,5; 50 mL)

35 mL Formamida
5 mL 20x SSC
10 mL H₂O MiliQ

Es pot reutilitzar guardant-la ben tapada a 4 °C fins a 7 dies després d'haver-la preparada.

50% Formamida / 2x SSC (pH 7,0-7,5; 150 mL)

75 mL Formamida
15 mL 20x SSC
60 mL H₂O MiliQ

Es pot reutilitzar guardant-la ben tapada a 4 °C fins a 7 dies després d'haver-la preparada.

2x SSC (pH 7,0; 1 L)

100 mL 20 x SSC
Fins a 1 L H₂O MiliQ

4 x SSC / 0,05% Tween-20 (pH 7,0; 1 L)

200 mL 20 x SSC
2,5 mL 20% Tween-20
H₂O MiliQ fins a 1 L

Protocol

Dia 1

1. Es fan les extensions sobre portes freds i desengreixats en metanol
2. S'envelleixen les preparacions posant els portaobjectes en 2x SSC en un bany en agitació a 37 °C durant 30 min
3. Es fa un tractament enzimàtic per eliminar lleugerament el citoplasma per fer més accessible la sonda tractant els portaobjectes durant 5 min en pepsina (5 µL pepsina (solució stock 100 mg/mL) en 50 mL HCl 10 mM) a 37 °C en un bany en agitació
4. Es prepara la barreja de sondes afegint 5 µL de cadascuna i es tempera aproximadament durant 30 min a 37 °C

5. Es procedeix a la postfixació en la que les solucions estan a temperatura ambient i en agitació:
 - 5 min en PBS
 - 5 min PBS / 50 mM MgCl₂
 - 10 min en 1% Formaldehid / 50 mM MgCl₂ en PBS
 - 5 min PBS
6. Es deshidraten els portaobjectes durant 3 min en una sèrie EtOH (70, 85 i 100%) en agitació
7. Es desnaturalitzen els portaobjectes durant 5 min amb 70% de formamida en 2 x SSC en un bany d'aigua a 69-70 °C
8. Es torna a fer una deshidratació dels portaobjectes, però ara només 2 min en cada etanol:
 - 2 min etanol 70%
 - 2 min etanol 85%
 - 2 min etanol 100%
9. Es desnaturalitza la sonda durant 5 min en un bany d'aigua a 69 -70 °C. Aquest procés es fa paral·lelament amb la deshidratació del portaobjectes de manera que coincideixi el pas en el que el portaobjectes està sec i la sonda desnaturalitzada. Per fer més fàcil aquesta coincidència temporal, el portaobjectes un cop surt de l'etanol absolut es col·loca sobre una placa calefactora a 37 °C, i així el temps d'evaporació de l'etanol es redueix.
10. S'afegeix la sonda sobre l'àrea del portaobjectes on hi ha la mostra, que prèviament haurem marcat amb un llapis de diamant.
11. Es col·loca un cobreobjectes de vidre de 20 mm x 20 mm, 22 mm x 22 mm o 24 mm x 32 mm, en funció de la mida de l'àrea. S'evita que es formin bombolles entre les dues superfícies de vidre acompanyant amb molta suavitat el cobreobjectes, i si tot i així es donés el cas, es provaria d'eliminar-les fent pressió per un extrem de la bombolla i guiant-la cap a un dels marges del cobreobjectes.
12. Se segellen els marges del cobreobjectes amb goma aràbiga, per evitar que s'evapori la sonda durant el temps d'hibridació. Es deixa que s'assequi la goma.
13. Es col·loquen els portaobjectes en una cambra humida que prèviament s'haurà temperat a 37 °C

14. Es deixa la cambra humida dins d'un incubador a 37 °C, 5% de CO₂ i humitat durant 48 h.

Dia 2

Detecció amb anticossos

Per a la detecció de la Digoxigenina amb Rodamina:

- ✓ Fluorescent Antibody Enhancer Set for DIG Detection. Per la detecció amb FITC estan inclosos tots els anticossos.
- ✓ Anti-DIG-Rodamina

Per a la detecció de la Biotina amb FITC:

- ✓ Fluorescein Avidin DCS
- ✓ Biotinilated Anti-Avidin D

Solució de bloqueig (BS, *blocking solution*)

Ve amb el kit per a la detecció de la Digoxigenina concentrada 10 vegades. La solució d'ús es dilueix en PBS

Barreja d'anticossos

- 1- anti-DIG monoclonal (mouse) (1:25) + Fluorescein Avidin (1:500) + BS
 - 2- Anti-mouse-DIG (1:25) + Biotinilated Anti-Avidin D (1:100) + BS
 - 3- Anti-DIG-Rodamina (1:200) + Fluorescein Avidin (1:500) + BS
-
1. Es fan 3 rentats de 10 min cadascun en 50% formamida / 2 x SSC (pH 7,0 - 7,5) a 45 °C en un bany d'aigua i agitació
 2. Un altre rentat de 10 min en 2 x SSC (pH 7,0) a 45 °C i agitació
 3. I un de 5 min en 4 x SSC/0,05% Tween-20 a 45 °C i agitació
 4. Es bloqueja el portaobjectes durant 20 min afegint 100 µL de la solució de bloqueig, es col·loca un cobreobjectes de plàstic i es deixa a 37 °C en una cambra humida
 5. Es fa un rentat de 3 min amb 4 x SSC / 0,05% Tween-20 a 37 °C en un bany d'aigua en agitació
 6. S'incuba durant 30 min en 100 µL amb la barreja d'anticossos número 1, es col·loca un cobreobjectes de plàstic i es deixa a 37 °C en una cambra humida

7. Es fan 2 rentats de 5 min cadascun en 4 x SSC / 0,05% Tween-20 a 37 °C bany agitació
8. S'incuba durant 30 min en 100 µL amb la barreja d'anticossos número 2, es col·loca un cobreobjectes de plàstic i es deixa a 37 °C en una cambra humida
9. Es fan 2 rentats de 5 min cadascun en 4 x SSC / 0,05% Tween-20 a 37 °C bany agitació
10. S'incuba durant 1 h en 100 µL amb la barreja d'anticossos número 3, es col·loca un cobreobjectes de plàstic i es deixa a 37 °C en una cambra humida
11. Es fan 2 rentats de 5 min cadascun en 4 x SSC / 0,05% Tween-20 a 37 °C bany agitació
12. Es deshidrata en una sèrie d'etanols (70, 85 i 100%) en agitació 2 min cadascun
13. Es deixa assecar
14. S'afegeixen 40 µL de DAPI a una concentració de 125 ng/mL i es col·loca un cobreobjectes de vidre de 24 x 60 mm
15. Es deixa a la nevera almenys 10 minuts

Criteris de recompte

Se segueixen els criteris descrits per Fenech (1993).

- Les cèl·lules han de tenir ben preservat el citoplasma
- El contorn dels nuclis i micronuclis ha d'estar ben definit
- La mida dels micronuclis ha de ser d'entre 1/6 i 1/3 el diàmetre del nucli principal.
- Els micronuclis no són refringents i han de presentar la mateixa intensitat de tinció que els nuclis principals.
- Els micronuclis poden tocar però no poden estar sobreposats als nuclis principals

HIBRIDACIÓ SEQÜENCIAL DE TELÒMERS AMB SONDES DE PNAs PER SEQÜÈNCIES TELOMÈRIQUES I SONDES DE DNA DELS CROMOSOMES 8 I 14

Hibridació dels telòmers amb sondes de PNAs

Solucions

MgCl₂ Buffer (10 mL)

MgCl ₂ 25 mM	0,05 g
Àcid Cítric 9 mM	0,018 g
Na ₂ HPO ₄ 82 mM	0,22 g

Pepsina

50 mL HCl 10 mM
20-25 µL pepsina (1mg/mL)

* a 37 °C i esperar 10 min a que s'activi la pepsina abans de posar els portes

Formaldehid 0,7-0,8 %

2 mL Formaldehid
48 mL H₂O MiliQ

TNT (pH=7,5)

0,908 g Trizma Base
1,315 g NaCl
375 µL Tween-20 al 20%
150 mL H₂O MiliQ

Blocking 1x (Boheringer)

PBS-MgCl₂

5 mL MgCl₂ 1M
95 mL PBS

Formamida 70% / PBS (pH=7,2)

70 mL Formamida

30 mL PBS

Preparació de la sonda: Es prepara just abans de fer-la servir.

Sondes de PNA-FISH:

- ✓ Cy3-(CCCTAA)₃ (PE Biosystems)
- ✓ FITC-(CCCTAA)₃ (PE Biosystems)

Tris HCl (pH 7)	2,5 µL
MgCl ₂ Buffer	21,4 µL
Formamida desionitzada	175 µL
Blocking 1x	12,5 µL
H ₂ O MiliQ	28,6 µL
Sonda Telomèrica FITC (10 µM)	10 µL
Sonda Telomèrica Cy3 (10 µM)	10 µL
TOTAL	250 µL

- La sonda es posa al final de tot
- Es barreja bé la barreja amb el vòrtex

Protocol

1. Es treu el tub del congelador, es deixa temperar, s'afegeix 1 mL d'àcid acètic (el pellet de cromosomes està en 3 mL de metanol) i es barreja bé
2. Es centrifuga durant 5 min a 600 x g
3. S'elimina el sobrenedant
4. Es resuspèn amb un volum adequat de fixador fresc per tenir la concentració cel·lular correcta
5. Es fa l'extensió
6. Es comprova en un microscopi amb contrast de fases si la concentració cel·lular i l'extensió dels cromosomes és la correcta. Si no és així és repeteix fins aconseguir-ho, ja sigui afegint més fixador si està massa concentrat, o bé si és el cas contrari i s'ha de concentrar es repetiran els passos de centrifugació i resuspensió en menys volum

7. Es renta durant 5 min en PBS
8. Es fa un tractament enzimàtic amb pepsina (20 – 25 µg/mL en HCl 10 mM) entre 5 min i 10 min a 37 °C
9. Es renta 5 min en PBS
10. Es postfixa la mostra al portaobjectes:
 - 2x 5 min PBS / MgCl₂
 - 2 min Formaldehid 4%
 - 3x 5 min PBS
11. Es deshidrata durant 5 min en cada etanol de la sèrie de 70, 85 i 100%
12. Es deixa assecar
13. S'afegeixen 12,5 µL de la barreja de sondes telomèriques a la regió del portaobjectes on es troben les cèl·lules
14. Es col·loca un cobreobjectes de vidre
15. Es desnaturalitzen de forma conjunta la sonda i el DNA dels cromosomes en el HYBrite durant 2 a 3 min a 80 °C
16. S'hibrida durant 2 h a temperatura ambient en una cambra humida col·locada dins d'una altra cambra humida
17. Es fan 2 rentats de 15 min cadascun en formamida 70% / PBS (Els cobreobjectes han de caure sols durant els primers 5 min)
18. Es continua amb 3 rentats de 5 min cadascun en TNT
19. Es deshidraten els portaobjectes en sèrie etanols (70, 85 i 100%) durant 2 min cadascun
20. Es deixen assecar
21. Un cop secs s'afegeix DAPI a una concentració de 125 ng/mL
22. Es deixa uns 10 min a 4 °C

Hibridació amb les sondes dels cromosomes 8 i 14

Protocol

Dia 1

1. Es repeteix una postfixació dels portaobjectes a temperatura ambient i en agitació:
 - 5 min en PBS
 - 5 min PBS / 50 mM MgCl₂

10 min en 1% Formaldehid / 50 mM MgCl₂ en PBS

5 min PBS

2. Es deshidraten els portaobjectes durant 3 min en una sèrie EtOH (70, 85 i 100%) en agitació.
3. Es desnaturalitzen els portaobjectes durant 5 min amb 70% de formamida en 2 x SSC en un bany d'aigua a 69-70 °C.
4. Es torna a fer una deshidratació dels portaobjectes, però ara només 2 min en cada etanol (70, 85 i 100%) en agitació.
5. Es prepara la barreja de sondes, entre 5 i 10 µL de cada sonda per portaobjectes, dependent de la grandària de l'àrea amb la que estan repartides les cèl·lules.
6. Es desnaturalitza la sonda durant 5 min en un bany d'aigua a 69 -70 °C. Aquest procés es fa paral·lelament amb la deshidratació del portaobjectes de manera que coincideixi el pas en el que el portaobjectes està sec i la sonda desnaturalitzada. Per fer més fàcil aquesta coincidència temporal, el portaobjectes un cop surt de l'etanol absolut es col·loca sobre una placa calefactora a 37 °C, i així el temps d'evaporació de l'etanol es redueix.
7. S'afegeix la sonda sobre l'àrea del portaobjectes on hi ha la mostra, que prèviament haurem marcat amb un llapis de diamant.
8. Es col·loca un cobreobjectes de vidre de 20 mm x 20 mm, 22 mm x 22 mm o 24 mm x 32 mm, en funció de la mida de l'àrea. S'evita que es formin bombolles entre les dues superfícies de vidre acompanyant amb molta suavitat el cobreobjectes, i si tot i així es donés el cas, es provaria d'eliminar-les fent pressió per un extrem de la bombolla i guiant-la cap a un dels marges del cobreobjectes.
9. Se segellen els marges del cobreobjectes amb goma aràbiga, per evitar que s'evapori la sonda durant el temps d'hibridació. Es deixa que s'assequi la goma.
10. Es col·loquen els portaobjectes en una cambra humida que prèviament s'haurà temperat a 37 °C.
11. Es deixa la cambra humida dins d'un incubador a 37 °C, 5% de CO₂ i humitat durant 24h a 48 h.

Dia 2

- 12.S'enretira la goma segelladora i el cobreobjectes (no es pot fer bruscamment perquè ens podríem emportar la mostra).
- 13.Es renta durant 2 min en 0,4 X SSC / 0,3% NP-40 a 73 °C ± 1 °C.
- 14.Es fa un altre rentat durant 2 min en 2 X SSC / 0,1% NP-40 a temperatura ambient.
- 15.Es deshidrata durant 2 min en cada etanol de la sèrie 70%, 85% i 100%.
- 16.Es deixa assecar el portaobjectes a l'aire.
- 17.S'afegeixen 30 µL de DAPI a una concentració de 125 ng/mL.
- 18.Es col·loca un cobreobjectes de 24 mm x 60 mm i es comprova com ha anat la hibridació al microscopi de fluorescència.
- 19.Es deixen a la nevera almenys 10'.

HIBRIDACIÓ D'ESPERMATOZOIDES DE RATOLÍ

El DNA dels espermatozoides de ratolí està molt condensat i perquè les sondes puguin penetrar i unir-s'hi cal que es faci un tractament previ, el què anomenem la descondensació del DNA. Es va utilitzar el protocol descrit per Ibañez *et al.* (2001). La hibridació es va fer amb sondes de DNA marcades directament amb Spectrum Green la del cromosoma 8 i Spectrum Orange la del cromosoma 14.

Reactius i equipament

- ✓ Àcid acètic glacial (Merck)
- ✓ 20x SSC
- ✓ DAPI (Sigma-Aldrich)
- ✓ DTT (Sigma-Aldrich)
- ✓ Etanol (Merck)
- ✓ Formamida (Riedel-de Hæn)
- ✓ H₂O MiliQ
- ✓ NP-40 (Vysis)
- ✓ Tris (Sigma-Aldrich)
- ✓ Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- ✓ Solució antiesvaïment (Vector)

- ✓ Bany d'aigua a 37 °C
- ✓ Centrifugadora
- ✓ Cobreobjectes de 22 x 22 mm
- ✓ Cubetes Coplin
- ✓ Incubador a 37 °C, 5% de CO₂ i humitat
- ✓ Pipetes Pasteur de plàstic
- ✓ Portaobjectes (Knittel-Gläser)

Solucions

DTT (25 mM DTT, 50 mM Tris, 1% Triton X-100) (pH 7,4; 100 mL)

- 0,385 75 gr de DTT (guardar-lo sempre a la nevera)
- 0,605 5 gr Tris (Sigma-Aldrich)
- 1 mL de Triton X-100
- Fins a 100 mL H₂O MiliQ

70% Formamida / 2 x SSC (pH 7,0-7,4; 50 mL)

- 35 mL de Formamida (a la campana)
- 5 mL de 20 x SSC
- Fins a 50 mL d' H₂O MiliQ

S'aconsella treballar a la campana amb la formamida perquè els vapors són tòxics

0,4 X SSC / 0,3% NP-40 (pH 7,0 – 7,5; 1 L)

- 20 mL de 20 X SSC
- 3 mL de NP-40
- Fins a 1 L d'H₂O MiliQ

Es guarda a temperatura ambient. Es descarta la solució al cap de 6 mesos, o si s'enterboleix o apareixen contaminants.

2 X SSC / 0,1% NP-40 Wash (pH 7,0 – 7,5; 1 L)

- 100 mL of 20X SSC
- 1 mL de NP-40
- Fins a 1 L d'H₂O MiliQ

Es guarda a temperatura ambient. Es descarta la solució al cap de 6 mesos, o si s'enterboleix o apareixen contaminants.

DAPI (37-33 ng/mL)

Protocol

Dia 1

1. Es treu el tub del congelador i s'afegeix 1 mL d'àcid acètic (el pellet d'espermatozoides està en 3 mL de metanol)
2. Es fa l'extensió
3. Es renta durant 3 min en 2x SSC
4. Es deshidrata durant 2 min en cada alcohol de la sèrie de 70%, 85% i 100% EtOH
5. Es descondensa durant 30 min en DTT 25mM a 37 °C en una estufa
6. (el temps de DTT varia en funció de l'individu, del tipus de sonda i de l'antiguitat de la mostra)
7. Sense deixar assecar el portaobjectes es fan dos rentats de 3 min cadascun en 2 x SSC
8. Es torna a deshidratar durant 2 min en cada etanol de la sèrie de 70%, 85% i 100%
9. Es deixa assecar el portaobjectes i es mira al microscopi de contrast de fases com ha anat la descondensació (si encara falta, es deixa una estona més en DTT i es repeteixen els passos posteriors)
10. Es desnaturalitza durant 5 min en Formamida al 70% a 70 °C en un bany d'aigua
11. Es deshidrata 2 min en cada etanol de la sèrie 70%, 85% i 100%
12. Es desnaturalitza la sonda 6 min a 70 °C en un bany d'aigua (mentre els portaobjectes estan en els etanols després de la desnaturalització)
13. Es posen 5 µL de cada sonda sobre l'extensió i es cobreix amb un cobreobjectes de 22 mm x 22 mm
14. Se segella el cobreobjectes amb goma
15. S'hibrida de 24 h a 48 h en una cambra humida a 37 °C

Dia 2

1. S'enretira la pasta segelladora i el cobreobjectes (no es pot fer brusquement perquè ens podríem emportar la mostra)
2. Es renta durant 2 min en 0,4 X SSC / 0,3% NP-40 a 73 °C ± 1 °C

3. Es fa un altre rentat durant 2 min en 2 X SSC / 0,1% NP-40 a temperatura ambient
4. Es deshidrata durant 2 min en cada etanol de la sèrie 70%, 85% i 100%
5. Es deixa assecar el portaobjectes a l'aire
6. S'afegeixen 30 µL de DAPI a una concentració de (33-37) ng/mL
7. Es col·loca un cobreobjectes de 24 mm x 60 mm i es comprova com ha anat la hibridació al microscopi de fluorescència.

Criteris de recompte

Els espermatozoides es van analitzar segons els següents criteris:

- Només es va fer el recompte dels espermatozoides amb una forma clara de ganxo.
- Els espermatozoides superposats o sense una clara delimitació van ser exclosos de l'estudi.
- En cas d'espermatozoides disòmics o diploides, tots els senyals d'hibridació havien de tenir la mateixa intensitat i estar separat entre ells una distància superior al diàmetre de cada senyal.
- Les nul·lisomies no es van analitzar directament, considerant la seva incidència l'equivalent a la de les disomies.

4. Resultats

Resultats

Capítol I: Inducció d'aneuploïdia en limfòcits humans irradiats *in vitro*

(Ponsa, I., Barquinero, J. F., Miró, R., Egozcue, J., i Genescà, A. (2001) *Radiation research* **155**, 424-431)

En aquest capítol es presenta un estudi de limfòcits humans amb bloqueig de la citocinesi utilitzant la hibridació *in situ* fluorescent (FISH) amb sondes de DNA centromèriques específiques de cromosoma per detectar simultàniament la no disjunció i la pèrdua anafàsica induïda pels raigs γ . Al mateix temps es van poder valorar els trencaments dins de la regió marcada. Aquesta combinació de tècniques només s'havia aplicat en estudis que valoraven la freqüència d'aneuploidia espontània o la induïda per agents químics. L'estudi es va fer irradiant *in vitro* sang perifèrica de dos individus sans. Com que en alguns treballs s'havien descrit variacions inter- i intraindividuals dels nivells de micronuclis (Huber *et al.*, 1989, 1992), així com el dany potencial de la citocalasina B (Cyt B) en el fus mitòtic (Norppa *et al.*, 1993; Zijno *et al.*, 1994), el present estudi es va portar a terme utilitzant només una mostra de sang per cada un dels individus i es van considerar els nivells basals respectius de cada un dels indicadors analitzats. D'aquesta manera, la significació dels efectes no es veu afectada per aquests artefactes.

La FISH es va realitzar utilitzant sondes de DNA específiques dels centròmers dels cromosomes 4 (4p11-4q11) i 7 (7q11.1-q11.1) conjugades amb Spectrum Green, i amb Spectrum Orange pels cromosomes 4 i 18 (18p11.1-q11.1). Els senyals resultants van ser grocs per al cromosoma 4, verd per al cromosoma 7 i vermell per al cromosoma 18.

Els portaobjectes es van codificar i es van analitzar a cegues. Es van examinar amb un microscopi de fluorescència Olympus AX70 equipat amb els filtres per DAPI, FITC, Rodamina i un filtre de pas de banda triple que permet l'observació simultània dels cromosomes marcats i el material contratenyit. Primer, les cèl·lules s'observaven amb el filtre de pas de banda triple per detectar la presència de cèl·lules binucleades amb citoplasma ben conservat i la distribució dels senyals en els nuclis fills i els micronuclis. Llavors, s'observaven amb el filtre de DAPI per confirmar la presència de micronuclis. Els criteris per a la identificació de les cèl·lules binucleades i dels micronuclis van ser els proposats per Fenech (1993). Per restringir l'anàlisi a la primera divisió cel·lular després del tractament i excloure artefactes tècnics, només es van analitzar les cèl·lules binucleades que mostraven quatre senyals per a cada cromosoma marcat sense tenir en compte la seva localització; amb l'excepció d'aquelles cèl·lules binucleades

que presentaven trencaments dins de la regió marcada. Utilitzant tres sondes centromèriques específiques de cromosoma, es van poder observar diferents patrons (figura 4.I.1). Es va detectar la pèrdua anafàsica (PA) quan un micronucli (MN) mostrava com a mínim un senyal centromèric sencer (figura 4.I.1b) i es va enregistrar com un micronucli centròmer positiu (C+ MN). La no disjunció (ND) es va detectar quan un nucli fill mostrava tres senyals centromèrics per al mateix cromosoma, i l'altre nucli només un (figura 4.I.1c). Un micronucli que portava un fragment acèntric o un cromosoma no marcat (figura 4.I.1d) es va enregistrar com un micronucli centròmer negatiu (C- MN). Es va considerar un trencament dins de la regió marcada quan els dos fragments estaven situats en el nucli (figura 4.I.1e) o quan un fragment estava situat en el nucli i l'altre al micronucli (figura 4.I.1f). Un filament de cromatina connectant els dos nuclis principals (figura 4.I.1g) va ser enregistrat com un pont nucleoplasmàtic. Es van analitzar aproximadament mil cèl·lules binucleades (500 per cultiu) per a cada dosi i donant. Les imatges de la FISH dels limfòcits es van capturar amb el programa *Cytovision* (Applied Imaging Inc.).

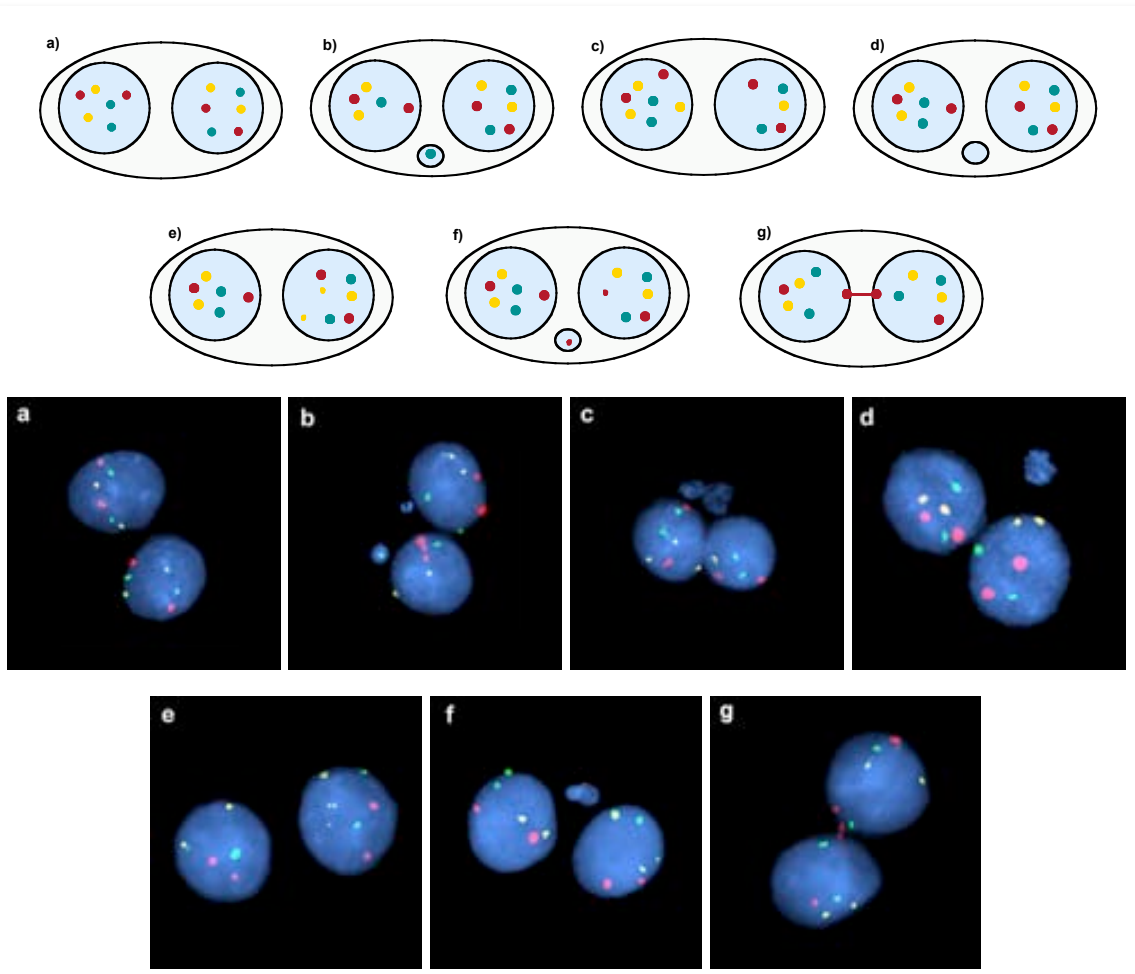


Figura 4.I.1. Representació esquemàtica i imatges dels possibles esdeveniments detectables utilitzant tres sondes centromèriques específiques de cromosoma en limfòcits binucleats. a) Limfòcit binucleat normal; b) pèrdua anafàsica; c) no disjunció; d) pèrdua anafàsica d'un cromosoma o d'un fragment no marcat; e) trencament dins de la regió marcada (els dos fragments en el nucli); f) trencament dins de la regió marcada (un fragment en el nucli i l'altre en el micronucli); g) pont nucleoplasmàtic.

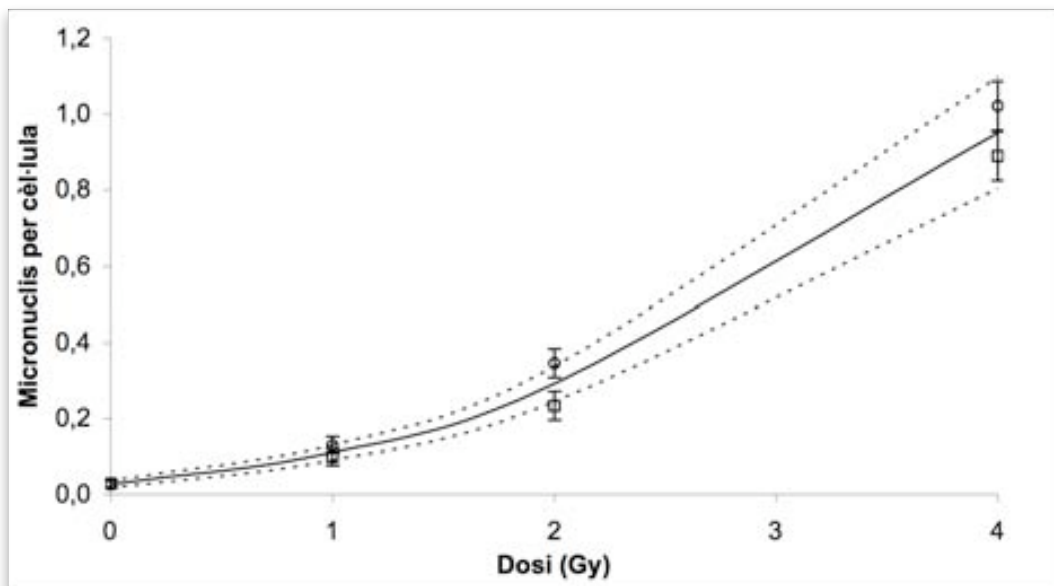
Per comprovar si la distribució de MN totals, MN centròmer positiu i no disjunció entre les cèl·lules per a cada dosi seguia una distribució de *Poisson*, es va utilitzar l'índex de dispersió (variància/mitjana) i la seva unitat normalitzada, el test de la *U* (Rao i Chakravarti, 1956; Savage, 1970). Les corbes es van obtenir utilitzant el mètode de ponderació iterativa dels mínims quadrats. Per comparar les corbes d'efecte de dosi obtingudes per a cada donant amb l'obtinguda utilitzant les dades agrupades, es va utilitzar la prova de la *F* ponderada per a la identitat de paràmetres (acceptant un valor de $P < 0,05$ com a significatiu). Per comparar la freqüència de cada procés en els cultius irradiats i els control, es va utilitzar el test de la *t d'Student*, i per a variàncies desiguals es va

aplicar la regla de *Satterthwaite*. Per comparar les cèl·lules binucleades amb MN, es va utilitzar el test de la χ^2 .

El nombre total de MN i la seva distribució entre les cèl·lules per a cada donant es mostra a la taula 4.I.1. Per a gairebé totes les dosis, la distribució de MN segueix una distribució de Poisson; només per al donant 2 a 2 i 4 Gy els valors d'*U* van mostrar sobredispersió (valors més grans que +1,96). Les freqüències basals dels dos donants van ser similars ($P > 0,05$). Tanmateix, després de la irradiació les freqüències observades van ser diferents, i el donant 2 va mostrar valors més alts ($P < 0,05$). Els valors individuals per a cada donant així com els dos valors dels dos donants a dosis diferents, es van ajustar al model lineal quadràtic: $Y = C + \alpha D + \beta D^2$, on *Y* és la freqüència de MN per cèl·lula, *C* la freqüència espontània, *D* la dosi en Gy, i α i β els coeficients lineal i quadràtic, respectivament (figura 4.I.2). Malgrat les diferències de la freqüència de MN induïda entre donants, la corba dosi-efecte obtinguda quan es van considerar les dades agrupades no va mostrar diferències amb les obtingudes per cada donant ($P > 0,10$). Els coeficients obtinguts amb les dades agrupades van ser $C = (2,71 \pm 0,97) \times 10^{-2}$, $\alpha = (3,45 \pm 2,46) \times 10^{-2}$, i $\beta = (4,92 \pm 0,80) \times 10^{-2}$. Es van obtenir resultats similars quan es van considerar els limfòcits binucleats amb MN (BNMN) (taula 4.I.1). Mentre el donant 2 mostrava freqüències significativament més altes a 1 i 2 Gy que el donant 1 (en ambdós casos $P < 0,04$), la corba dosi-efecte obtinguda utilitzant les dades agrupades no va mostrar diferències amb la de cada donant ($P > 0,10$). La corba per a les dades agrupades va ser: $Y = (2,59 \pm 0,63) \times 10^{-2} + (6,51 \pm 1,40) \times 10^{-2} D + (1,99 \pm 0,39) \times 10^{-2} D^2$, on en aquest cas *Y* és la freqüència de limfòcits binucleats amb MN per cèl·lula.

Taula 4.I.1. Freqüència i distribució de micronuclis (MN) totals en limfòcits binucleats (BN) de diferents donants després de la irradiació.

Dosi (Gy)	Donant	BN	BNMN ^a	Distribució de MN							MN	MN/BN	ID ^b	U ^c
				0	1	2	3	4	5	6				
0	1	1062	30	1032	30	0	0	0	0	0	30	0,03	0,97	-0,64
	2	1027	26	1001	26	0	0	0	0	0	26	0,03	0,98	-0,56
1	1	1040	95	945	88	7	0	0	0	0	102	0,10	1,04	0,92
	2	1022	124	898	115	9	0	0	0	0	133	0,13	1,01	0,14
2	1	1061	230	831	213	16	1	0	0	0	248	0,23	0,92	-1,84
	2	1015	283	732	223	53	6	1	0	0	351	0,35	1,09	2,12
4	1	1025	595	430	360	166	57	11	1	0	912	0,89	1,02	0,38
	2	1044	640	404	348	193	70	23	5	1	1067	1,02	1,11	2,63

^a BNMN, BN amb MN^b ID, índex de dispersió^c U, unitat normalitzada**Figura 4.I.2.** Corba dosi-efecte per a raigs γ . Els valors dels coeficients que s'ajusten a la funció quadràtica lineal $Y = C + \alpha D + \beta D^2$ són: $C = (2,71 \pm 0,97) \times 10^{-2}$; $\alpha = (3,45 \pm 2,46) \times 10^{-2}$; $\beta = (4,92 \pm 0,80) \times 10^{-2}$. Les freqüències observades de micronuclis per cèl·lula estan representades amb quadrats per al donant 1 i amb cercles per al donant 2. Les barres d'error representen els intervals de confiança d'un 95%.

La taula 4.I.2 presenta el nombre de PA i ND per a cada dosi de raigs γ pels dos donants. Com s'esperava, la freqüència de pèrdua anafàsica i no disjunció és més baixa que la freqüència total de MN, però també hi ha un clar augment amb la dosi per a les dues anomalies. Per a la pèrdua anafàsica, en les dades agrupades es va observar un augment

estadísticament significatiu a 2 ($P < 0,05$) i 4 Gy ($P < 0,005$) respecte a 0 Gy. Per a la ND, es van observar augments estadísticament significatius respecte als valors control per a totes les dosis ($P < 0,01$ a 1 Gy, $P < 0,005$ a 2 Gy i $P < 0,001$ a 4 Gy). Malgrat els augments observats, el baix nombre d'esdeveniments va fer difícil establir una corba dosi-efecte.

Taula 4.I.2. Pèrdua anafàsica (PA), no disjunció (ND) i trencaments centromèrics en limfòcits binucleats (BN) de diferents donants després de la irradiació

Dosi (Gy)	Donant	BN	MN	PA	ND	Trencaments Centromèrics	
						en MN	en Nuclis
0	1	1062	30	0	0	1	4
	2	1027	26	0	0	0	2
	T ^a	2089	56	0	0	1	6
1	1	1040	102	1	6	0	7
	2	1022	133	0	2	0	4
	T	2062	235	1	8	0	11
2	1	1061	248	3	9 (8) ^b	2 (1)	7
	2	1015	351	3	3	0	9 (7)
	T	2076	599	6	12 (11)	2 (1)	16 (14)
4	1	1025	912	4 (3)	14	5 (4)	19
	2	1044	1067	8 (7)	11	12 (8)	6
	T	2069	1979	12 (10)	25	17 (12)	25

^a T, dades agrupades dels dos donants

^b El número entre parèntesis representa el nombre de cèl·lules amb anomalies

La taula 4.I.2 també mostra els trencaments observats dins de la regió cromosòmica marcada per la sonda. Dos fragments constitueixen un trencament. Aquests fragments tant van aparèixer junts en el nucli, un en un nucli i l'altre en un MN, com els dos en un MN. Dependent de la seva localització es van classificar els trencaments en els nuclis quan els dos fragments eren presents en els nuclis, o en els micronuclis quan un o més fragments apareixien en els micronuclis. Es van observar augments estadísticament significatius en les dades agrupades a 4 Gy ($P < 0,001$) per a trencaments trobats en els MN, i a 2 ($P < 0,05$) i 4 Gy ($P < 0,001$) per a trencaments en els nuclis.

Es van observar uns filaments de cromatina molt prims que connectaven els dos nuclis, anomenats ponts nucleoplasmàtics. Aquests filaments eren tan prims que gairebé només es podien distingir aquells parcialment o totalment marcats amb les sondes centromèriques; només en

un cas es va detectar un pont nucleoplasmàtic no marcat. Aquests esdeveniments van ser molt poc freqüents, i el nombre i freqüència observada va ser de 0 (0‰), 2 (0,97‰), 4 (1,93‰) i 3 (1,45‰) per a 0, 1, 2 i 4 Gy respectivament. Tot i no haver una relació amb la dosi, l'observació d'aquests ponts només en les mostres irradiades podria indicar que la seva aparició estaria relacionada amb els efectes de la radiació ionitzant.

Discussió

Tot i que es va trobar heterogeneïtat en la freqüència de MN totals per a cada dosi de radiació amb l'excepció del nivell basal, aquesta diferència no es va observar quan es van comparar les corbes obtingudes per a cada donant amb l'obtinguda amb les dades agrupades. La corba que millor s'ajusta per a la inducció de MN va ser lineal quadràtica, amb concordança amb d'altres estudis (Kormos i Koteles, 1988; Prosser *et al.*, 1988; Littlefield *et al.*, 1989; Balasem i Ali, 1991; Lee *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1994; Koksai *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1996). El component quadràtic normalment és tan petit, que també permet que una corba lineal sigui estadísticament compatible (Fenech i Morley, 1985a, 1986; Ramalho *et al.*, 1988), així com una de no lineal (Mitchell i Norman, 1987; Ramalho *et al.*, 1988).

Es va comparar la corba obtinguda per a la inducció de MN amb una corba d'acèntrics totals (fragments cromosòmics acèntrics que sorgeixen de delecions o de la formació de dicèntrics i anells) calculada a partir de les dades resultants d'una corba de calibratge de raigs gamma prèviament obtinguda després d'exposicions de sang completa del donant 1 a dosis d'entre 0 i 5 Gy de raigs γ (Barquinero *et al.*, 1995). La font de raigs γ i el protocol d'irradiació van ser idèntics als utilitzats per la quantificació de MN radioinduits del present estudi. Es va observar que la freqüència de MN a dosis baixes era més alta que la d'acèntrics, mentre que a dosis més altes aquesta relació s'invertia. No obstant això, a dosis baixes no podem assegurar si la freqüència de MN és sempre més alta que la d'acèntrics o si aquesta diferència està causada per la freqüència basal de MN, ja que la dosi més baixa analitzada en l'estudi dels MN va ser d'1 Gy. Tanmateix, Prosser *et al.* (1988) havia obtingut resultats similars. La hipòtesi postulada

per Prosser *et al.* (1988) és que a dosis baixes els MN contenen cromosomes sencers a més a més de fragments acèntrics, mentre a dosis altes hi ha una probabilitat més gran que dues o més aberracions siguin incloses en una única membrana micronuclear o que siguin retingudes en un nucli principal i així no produeixen un micronucli individual (Huber *et al.*, 1983; Prosser *et al.*, 1988; Ramalho *et al.*, 1988; Savage, 1988; Littlefield *et al.*, 1989; Cornforth i Goodwin, 1991; Koksai *et al.*, 1996). Els nostres resultats donen suport a aquesta hipòtesi, ja que es van observar MN amb més d'un senyal centromèric a dosis altes. El punt on es van creuar les dues corbes va ser a 0,7 Gy (figura 4.I.3). Tanmateix, en el nostre estudi no podem demostrar que per sota d'aquest punt encara hi hagin MN amb senyal centromèric perquè la dosi més baixa analitzada va ser d'1 Gy. Per això, caldria que es fessin més estudis amb dosis per sota d'1 Gy.

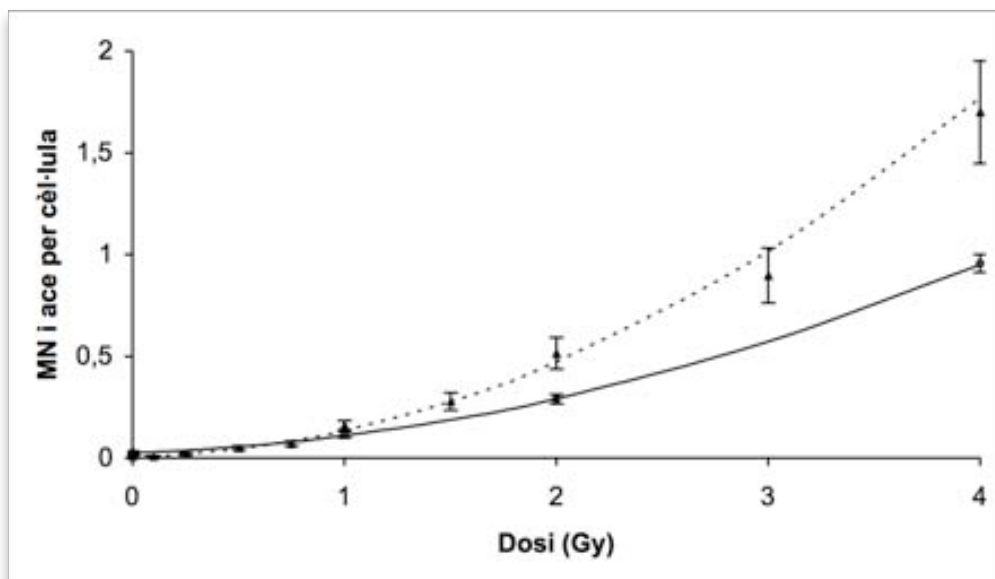


Figura 4.I.3. Gràfic de microneclis per cèl·lula (línia contínua) després de la irradiació amb raigs γ per a tots els donants, ajustada al model lineal quadràtic, juntament amb la corba de resposta de dosi per a acèntrics totals (Barquintero *et al.*, 1995) (línia discontinua, $C = (0,74 \pm 0,16) \times 10^{-2}$; $\alpha = (2,63 \pm 1,16) \times 10^{-2}$; $\beta = (10,36 \pm 0,83) \times 10^{-2}$). La freqüència observada de microneclis per cèl·lula està representada amb cercles i la freqüència observada d'acèntrics (ace) per cèl·lula amb triangles. Les barres d'error representen els intervals de confiança d'un 95%.

L'anàlisi dels C+ MN com a indicador de pèrdua anafàsica es va fer en aquells MN que mostraven un senyal centromèric sencer, no tenint en compte aquells amb un senyal fragmentat, perquè en l'últim cas aquests MN són el resultat de l'activitat clastogènica, i no aneugènica de la radiació

ionitzant. Tanmateix, la suposició que els C+ MN continguin cromosomes sencers no està demostrada totalment, perquè els micronuclis que contenen cromosomes sencers no es poden diferenciar d'aquells que contenen fragments centrals i cromosomes reorganitzats. No obstant això, Cornforth i Goodwin (1991) van suggerir que la formació de reorganitzacions cromosòmiques no seria la responsable dels C+ MN radioinduits perquè mentre el nombre de dicèntrics observats en cèl·lules en metafase disminuïa dramàticament com a resultat de la incubació després de la irradiació, la freqüència de micronuclis cinetocor positius romanía inalterada. En el nostre estudi, la freqüència de C+ MN es va calcular en relació al total de cèl·lules binucleades analitzades (freqüència absoluta), en comptes d'una proporció entre C+ MN i C- MN (freqüència relativa), perquè el fet que s'observi un augment en les proporcions no significa necessàriament que no hagi augmentat la freqüència de MN que contenen un cromosoma endarrerit (Schuler *et al.*, 1997). Els resultats obtinguts amb tres sondes específiques de centròmer mostren un augment lleuger però significatiu de pèrdua anafàsica a les dosis més altes (2 i 4 Gy). Per poder fer la comparació amb estudis que han utilitzat sondes pancentromèriques per a l'avaluació de la pèrdua anafàsica, i suposant que aquest esdeveniment ocorre aleatòriament en els diferents cromosomes, es va aplicar el factor de correcció de 46/6 a les freqüències observades de pèrdua anafàsica per estimar la freqüència genòmica. La freqüència genòmica de pèrdua anafàsica en el present estudi va ser una mica més baixa que en treballs previs (Schuler *et al.*, 1997; Thierens *et al.*, 1999; Touil *et al.*, 2000) per totes les dosis analitzades, però amb una marcada diferència de la freqüència basal. Aquesta diferència podria ser causada per la impossibilitat de discriminació entre trencaments dins de la regió marcada i senyals sencers quan s'utilitzen sondes pancentromèriques, que no seria tan acusada a les altres dosis perquè la majoria d'aquests fragments serien englobats pels nuclis. Aquesta baixa freqüència basal també es va observar en estudis previs utilitzant alguns dels cromosomes analitzats en el present estudi (Sgura *et al.*, 1997; Carere *et al.*, 1999).

La baixa freqüència de pèrdua anafàsica feia difícil establir una corba d'efecte de dosi, però segons els resultats obtinguts aquesta relació seria lineal. Quan es van fer comparacions entre les corbes obtingudes per a la

inducció de MN total i C+ MN, es va observar una clara diferència; la primera era lineal quadràtica mentre que la segona era lineal (figura 4.I.4). Una possible explicació per la diferència en la inducció de MN total i C+ MN podria estar relacionada amb els fragments acèntrics que acompanyen els dicèntrics i els anells. Aquestes observacions donen suport a la conclusió que la radiació ionitzant, encara que principalment sigui clastogènica, també induïx la pèrdua de cromosomes sencers.

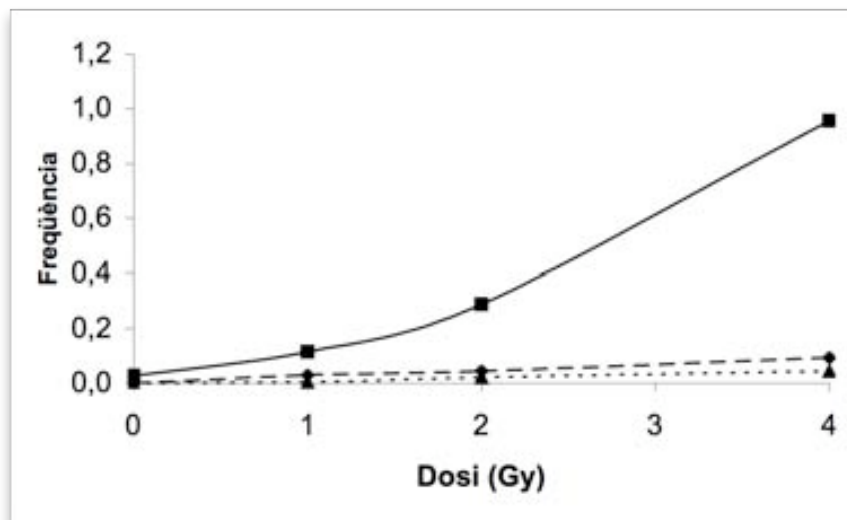


Figura 4.I.4. Freqüències de MN total (■), no disjunció genòmica (◆) i pèrdua anafàsica genòmica (▲). Les freqüències genòmiques es van calcular multiplicant 46/6 a les freqüències observades de ND i C+ MN, suposant que les dues aberracions ocorren a l'atzar i independentment per a cada cromosoma.

Es va estudiar la freqüència de no disjunció per als cromosomes 4, 7 i 18 analitzant la distribució d'aquests cromosomes entre els nuclis principals. Es va observar un augment significatiu dependent de la dosi per a totes les dosis. Aplicant el factor de correcció 46/6, es pot calcular la freqüència genòmica suposant que aquest esdeveniment té lloc de manera aleatòria en tots els cromosomes. Les freqüències obtingudes van ser similars als resultats de Touil *et al.* (2000), amb l'excepció de 0 Gy, on la seva freqüència era més alta que en el present estudi; tanmateix, Carere *et al.* (1999) també van trobar un valor més baix. La freqüència de no disjunció va ser més alta que la freqüència de pèrdua anafàsica per a totes les dosis (figura 4.I.4), indicant que el principal mecanisme inductor d'aneuploidia en limfòcits humans irradiats *in vitro* és la no disjunció.

Ja que l'efecte clastogènic de la radiació ionitzant és ben conegut, no és sorprenent trobar trencaments dins de la regió marcada. En el nostre estudi es van observar aquests fragments tant en els nuclis principals com en els micronuclis, però la freqüència va ser més alta en els nuclis que en els MN. Aquesta observació pot donar suport a la hipòtesi de l'englobament de material cromosòmic, que altrament formaria micronuclis, durant la reconstrucció de la membrana nuclear al final de mitosi.

Els ponts nucleoplasmàtics són la manifestació de ponts anafàsics que resulten d'un problema durant la segregació de cromosomes reorganitzats. En cèl·lules de mamífers, un cromosoma dicèntric es pot orientar al fus mitòtic de tal manera que els dos centròmers d'una cromàtide es dirigeixin a una mateixa cèl·lula filla, una situació que no presenta cap problema mecànic. Tanmateix, les cromàtides dicèntriques produeixen ponts anafàsics, i els cromosomes dicèntrics en els que hi hagut un gir entre els dos centròmers poden quedar connectats a l'anafase i també causar ponts anafàsics (figura 4.1.5a). La mateixa situació pot ocórrer amb els anells que pateixin intercanvis entre les seves cromàtides germanes (figura 4.1.5b). Aquests ponts nucleoplasmàtics entre nuclis fills s'observen generalment en cèl·lules tractades amb sistemes que generen radicals lliures, com la radiació ionitzant o l'aigua oxigenada (Fenech, 1997). La comprovació d'aquesta hipòtesi seria la presència de centròmers situats al final d'aquests ponts, tal com s'ha observat en el present estudi. La presència d'un senyal centromèric al pont podria ser el resultat d'una reorganització cromosòmica amb un trencament prop de la regió marcada.

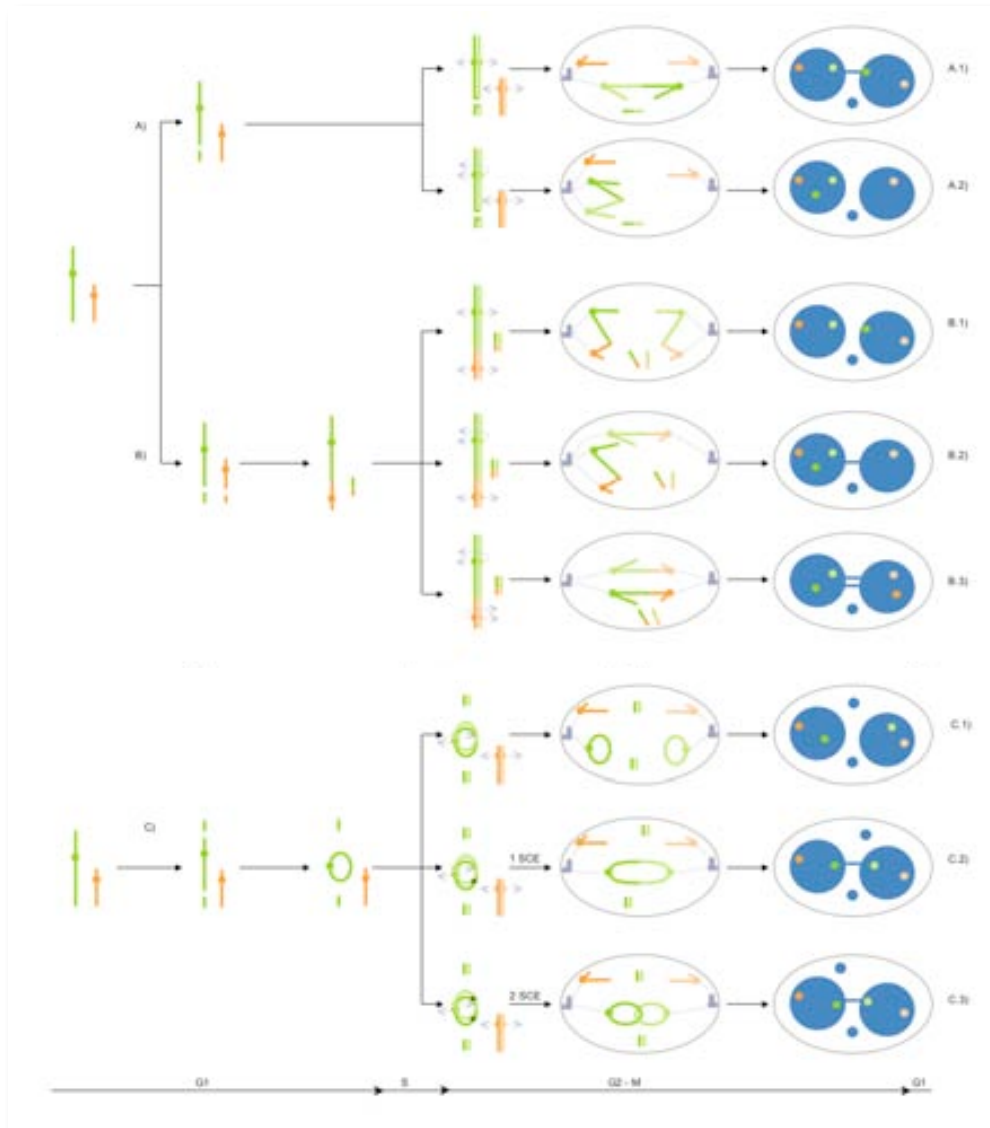


Figura 4.1.5. Esdeveniments que poden donar lloc a ponts nucleoplasmàtics. A) S'indueix un trencament de la doble cadena de DNA (DSB, *double strand break*) en un cromosoma i no es repara fins després de la replicació. La unió errònia dels extrems trencats després de la replicació comporta la formació d'una cromàtide dicèntrica i un fragment acèntric. A.1) Els centromers de la cromàtide dicèntrica són tibat cap a pols oposats de la cèl·lula a l'anafase per formar un pont nucleoplasmàtic (NPB, *nucleoplasmic bridge*) i el fragment acèntric de cromàtide es perd en forma de MN. A.2) Els centromers de la cromàtide dicèntrica són tibat cap al mateix pol de la cèl·lula i no es forma un NPB, no obstant, el fragment acèntric de cromàtide en forma de MN. B) S'indueixen dos DSBs en dos cromosomes. La unió errònia dels extrems trencats comporta la formació d'una cromàtide dicèntrica i un fragment acèntric els quals seguidament són replicats. B.1) Els centromers de cada cromàtide dicèntrica són tibat cap al mateix pol de la cèl·lula i no es formen NPB. B.2) Els centromers d'una de les cromàtides dicèntriques són tibat cap a pols oposats comportant la formació d'un NPB. B.3) Els centromers de les dues cromàtides dicèntriques són tibat cap a pols oposats de la cèl·lula comportant la formació de dos NPBs. En cadascun d'aquests casos es produeix un MN com a conseqüència de l'endarreriment del fragment acèntric cromosòmic que acompanya al cromosoma dicèntric. C) S'indueixen dos DSB, un en cada banda del centromer d'un cromosoma. Els extrems trencats es reparen erròniament produint una cromàtide en anell i dos fragments acèntrics, els quals són posteriorment replicats. C.1) Les cromàtides en anell se segreguen de forma correcta però els fragments acèntrics queden endarrerits a l'anafase i formaran dos MN. C.2) Les dues cromàtides en anell, després de que hi hagi tingut lloc un intercanvi de cromàtides germanes (SCE, *sister chromatid exchange*), acaben transformant-se en una gran cromàtide dicèntrica que acabarà donant un NPB quan els dos centromers siguin tibat cap a pols oposats de la cèl·lula a l'anafase. Els fragments acèntrics que l'acompanyen acabaran formant un o dos MN. C.3) Les dues cromàtides en anell, després de patir dos SCE, acaben concatenades, i donen lloc a la formació d'un NPB quan els centromers són tibat cap a pols oposats de la cèl·lula a l'anafase. Els fragments acèntrics que l'acompanyen acabaran formant dos MN (adaptada de Fenech (2006)).

En resum, el present estudi demostra que es pot obtenir informació citogenètica d'anomalies cromosòmiques estructurals i numèriques utilitzant la FISH amb sondes centromèriques específiques de cromosoma. L'ús d'aquest tipus d'estratègia permet l'avaluació simultània de la no disjunció i la pèrdua anafàsica, i tot i que requereix més temps, la informació obtinguda és més acurada que no utilitzant sondes pancentromèriques, perquè s'eviten possibles errors derivats del recompte de trencaments dins de la regió marcada. D'aquest estudi es desprèn que el principal mecanisme inductor d'aneuploïdia en limfòcits humans irradiats *in vitro* és la no disjunció.

Resultats

Capítol II: Inducció i persistència d'aneuploidia en
limfòcits de ratolí irradiats *in vivo*

L'estudi de la inducció d'aneuploidia en cèl·lules somàtiques irradiades *in vitro* s'ha tractat en el capítol anterior, i en aquest capítol avancem un pas més estudiant l'efecte dels raigs γ *in vivo* en els limfòcits residents a la melsa de ratolins després d'haver irradiat tot el cos dels animals a 1 i 2 Gy. L'objectiu d'aquest estudi *in vivo* era poder analitzar tant la inducció com la persistència de les d'anomalies cromosòmiques numèriques. És molt important valorar si aquestes alteracions es mantenen al llarg del temps, per les implicacions que pot tenir de cara a desenvolupar diferents patologies, com podria ser el càncer.

Per portar a terme aquest estudi es van irradiar ratolins de la soca B6SJL F1 a 1 i 2 Gy de raigs γ i es van sacrificar a diferents dies després d'haver estat irradiats, concretament a 0 (mitja hora més tard), 1, 3 i 28 dies. Es van obtenir els limfòcits de la melsa, anomenats esplenòcits, i es van fer créixer en un medi amb citocalasina B per tal d'obtenir els limfòcits binucleats resultants de la primera divisió en cultiu. Es van fer dos cultius per cada animal i es van analitzar dos animals per cada dosi i dia postirradiació (dpi); també es van analitzar dos animals no irradiats com a control. Es va fer el recompte de com a mínim 500 limfòcits binucleats per cultiu.

Tal com s'ha descrit al capítol anterior, els mecanismes que originen una segregació incorrecta del nombre de cromosomes en el moment de la divisió són la no disjunció i la pèrdua anafàsica. Per valorar aquests esdeveniments es van aplicar dues sondes de DNA subcentromèriques pels cromosomes 8 i 14, detectades amb FITC (color verd) i rodamina (color vermell) respectivament. Breument, si la distribució dels senyals dins dels nuclis diferia dels dos senyals verds i dos senyals vermells esperats en una cèl·lula normal, es va considerar no disjunció (figura 4.II.1.a); i si algun d'aquests senyals es trobava dins d'un micronucli es va classificar com a pèrdua anafàsica (figura 4.II.1.b). Es parla genèricament de malsegregació quan la segregació cromosòmica ha estat errònia, ja sigui per no disjunció o pèrdua anafàsica.

Es va aplicar el test de la *U* de Mann-Whitney a la mitjana de les freqüències dels cultius de cada dosi i dia postirradiació, comparant cada valor amb l'obtingut dels animals control. Es va tenir en compte el nivell de

significació exacte i es va considerar que hi havia increments significatius per valors de P inferiors a 0,05.

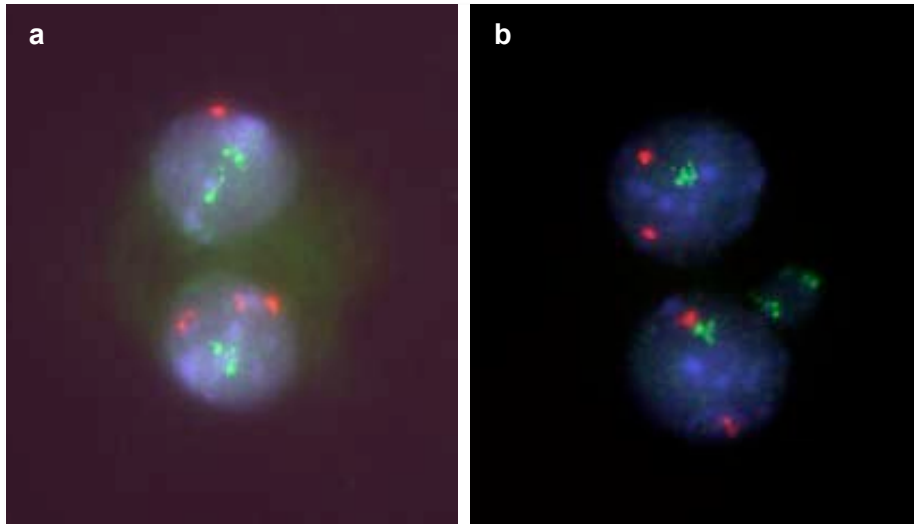


Figura 4.II.1. a) No disjunció del cromosoma 14 (vermell); b) pèrdua anafàsica doble del cromosoma 8 (verd).

La freqüència basal (\pm SEM) de micronuclis (MN) per 1.000 limfòcits binucleats i la de limfòcits binucleats amb MN (BNMN) per 1.000 cèl·lules binucleades (BN) va ser de $66,16 \pm 14,16$ i de $59,28 \pm 12,22$ respectivament (taula 4.II.1). A la figura 4.II.2 es pot observar la variació de les freqüències de MN i BNMN al llarg del dies postirradiació. En els animals irradiats a 1 Gy de raigs gamma no es van observar diferències significatives respecte els animals control. Mentre que es va observar un increment significatiu d'aquestes dues variables en els limfòcits dels animals irradiats a 2 Gy analitzats immediatament després de la irradiació i també en els analitzats a 1 i 3 dpi, no sent ja significatiu a 28 dpi. L'augment de MN va ser d'entre 3,2 i 3,5 vegades el seu valor basal en els tres primers dies; i de 2,3 vegades a 28 dpi. Pel què fa a l'augment de BNMN, va ser lleugerament inferior que el de MN ja que una part del limfòcits binucleats contenien més d'un micronucli. Així doncs, tot i no ser significatiu, es va veure que tant la freqüència de MN com la de BNMN es mantenien lleugerament per sobre del valor basal a 28 dpi.

Taula 4.II.1. Distribució de MN, freqüència de MN totals (MNT), nombre de limfòcits binucleats amb MN (BNMN) i freqüència de BNMN. Les freqüències s'expressen per 1.000 cèl·lules binucleades.

Dosi (Gy)	dpi (dies)	n	BN	Distribució de MN					MNT/BN (‰) ^a	BNMN	BNMN/BN (‰) ^a
				0	1	2	3	4			
0	0	4	2507	2343	147	14	3	0	66,16 ± 14,16	164	59,28 ± 12,22
1	0	4	2905	2684	195	20	4	2	94,35 ± 12,89	221	79,90 ± 8,64
	1	6	4074	3808	251	14	0	1	70,13 ± 6,01	266	66,04 ± 4,69
	3	4	2025	1866	142	17	0	0	86,94 ± 10,98	159	78,53 ± 8,63
	28	4	2222	2099	112	9	2	0	60,84 ± 8,91	123	54,83 ± 7,44
2	0	4	2045	1677	312	49	7	0	210,68 ± 8,09*	368	180,00 ± 7,52*
	1	4	2049	1656	324	56	12	1	232,44 ± 23,36*	393	191,88 ± 14,04*
	3	4	2014	1648	303	60	3	0	214,53 ± 24,53*	366	181,77 ± 18,06*
	28	4	2149	1883	211	49	6	0	150,34 ± 35,50	266	122,42 ± 26,92

n: nombre de cultius, SEM: error estàndard de la mitjana

^a Mitjana de les freqüències en ‰ ± SEM

* P < 0,05

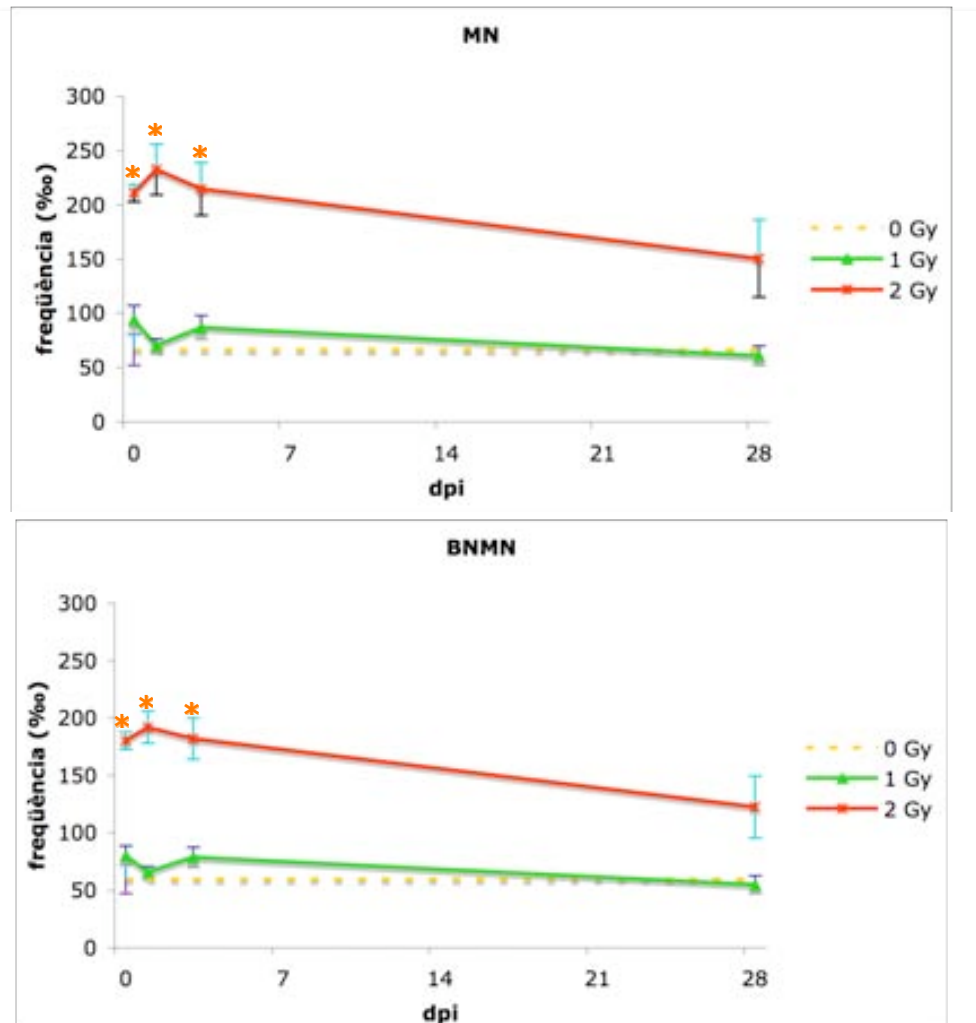


Figura 4.II.2. Freqüència de MN i de BNMN per 1.000 limfòcits binucleats. Els asteriscs indiquen els punts amb increments significatius respecte els valors basals. Les barres mostren l'error estàndard de la mitjana (SEM, *standard error of mean*).

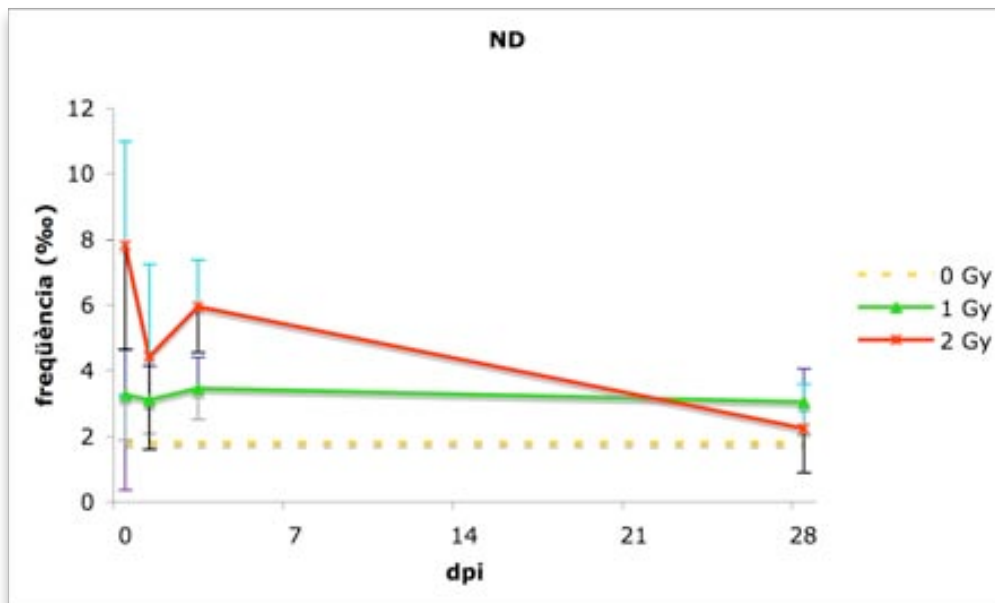
Per identificar els mecanismes inductors d'aneuploidia en esplenòcits de ratolí irradiats *in vivo* es va valorar la freqüència de no disjunció i de pèrdua anafàsica.

Els resultats obtinguts per la no disjunció es presenten a la taula 4.II.2. La freqüència basal de no disjunció va ser de $1,30 \pm 0,96$ ‰ pel cromosoma 8, i de $0,51 \pm 0,51$ ‰ pel cromosoma 14. Si es comparen les freqüències de no disjunció dels dos cromosomes en cada temps postirradiació i per totes les dosis, s'observa que la freqüència de no disjunció pel cromosoma 8 va ser lleugerament superior a la del cromosoma 14 en tots els punts analitzats, sent significatiu només en els cultius de 3 dpi d'animals irradiats a 2 Gy i en el valor total quan se sumen les no disjuncions observades de cada cromosoma en tots els cultius independentment de la dosi i dia postirradiació. Tot i les diferències, es van sumar els valors dels dos cromosomes i es va calcular la freqüència de no disjunció i la freqüència d'esplenòcits binucleats amb no disjunció (BNND), que va ser de $1,80 \pm 1,45$ ‰ per totes dues variables en els limfòcits dels animals control. No es van observar increments estadísticament significatius a cap dosi ni dia postirradiació de la freqüència de no disjunció ni de la freqüència de binucleats amb no disjunció, que en aquest cas van ser pràcticament equivalents, ja que rarament es donava la no disjunció de dos cromosomes a la vegada. Només es va observar una no disjunció doble del cromosoma 8, i una no disjunció simultània del cromosoma 8 i del cromosoma 14. L'increment de la freqüència de no disjunció en esplenòcits binucleats d'animals irradiats a 1 Gy es va mantenir pràcticament constant a tots els dies postirradiació, oscil·lant entre 1,7 i 1,9. A 2 Gy es va observar un augment més acusat, encara que no significatiu, en els cultius dels animals irradiats el mateix dia, que va ser de 4,3 vegades, i es va mantenir alt fins als 3 dies postirradiació amb valors de 3,3 vegades, i va anar disminuint fins arribar al valor basal a 28 dpi (figura 4.II.3). L'augment de la freqüència de limfòcits binucleats amb no disjunció va seguir el mateix patró i amb valors equivalents, tot i que en algun punt va ser lleugerament inferior.

Taula 4.II.2. Freqüència de no disjunció pels cromosomes 8 i 14, de binucleats amb no disjunció (BNND) per cadascun dels cromosomes i per la suma dels dos.

Dosi (Gy)	dpi (dies)	n	BN	ND8	ND8/BN (‰) ^a	ND14	ND14/BN (‰) ^a	ND	ND/BN (‰) ^a	BNND	BNND/BN (‰) ^a
0	0	4	2507	3	1,30 ± 0,96	1	0,51 ± 0,51	4	1,80 ± 1,45	4	1,80 ± 1,45
1	0	4	2905	6	2,42 ± 1,00	2	0,84 ± 0,57	8	3,26 ± 1,37	7	2,66 ± 0,82
	1	6	4074	6	1,47 ± 0,49	6	1,63 ± 0,74	12	3,11 ± 1,02	12	3,11 ± 1,02
	3	4	2025	4	1,98 ± 1,40	3	1,48 ± 0,49	7	3,46 ± 0,95	7	3,46 ± 0,95
	28	4	2222	5	2,21 ± 0,86	2	0,84 ± 0,49	7	3,04 ± 1,02	6	2,69 ± 0,94
2	0	4	2045	9	4,42 ± 1,70	7	3,39 ± 2,29	16	7,82 ± 3,17	16	7,82 ± 3,17
	1	4	2049	6	2,94 ± 1,70	3	1,48 ± 1,48	9	4,42 ± 2,83	8	3,93 ± 2,41
	3	4	2014	9	4,47 ± 1,88	3	1,49 ± 0,50	12	5,96 ± 1,41	12	5,96 ± 1,41
	28	4	2149	4	1,78 ± 1,03	1	0,45 ± 0,45	5	2,23 ± 1,35	5	2,23 ± 1,35

n: nombre de cultius, SEM: error estàndard de la mitjana

^a Mitjana de les freqüències en ‰ ± SEM**Figura. 4.II.3.** Freqüència de no disjunció pels cromosomes 8 i 14 en esplenòcits binucleats de ratolins irradiats a 1 i 2 Gy de raigs gamma i sacrificats a 0, 1, 3 i 28 dies postirradiació. Les barres indiquen l'error estàndard de la mitjana.

L'altre mecanisme implicat en l'origen d'aneuploidies és la pèrdua anafàsica, en la que els cromosomes endarrerits a l'anafase, que no s'incorporen en els nuclis principals, queden inclosos en els micronuclis. La pèrdua anafàsica es va valorar en els micronuclis que contenien senyals pels cromosomes 8 i 14, i la freqüència basal per aquests dos cromosomes va ser nul·la (taula 4.II.3). Es va comparar la freqüència de pèrdua anafàsica per aquests dos cromosomes i es va observar, a diferència de la no disjunció, que la major implicació d'un o altre cromosoma en les

diferents dosis i dies postirradiació era aleatòria, observant-se un nivell superior significatiu de pèrdues anafàsiques del cromosoma 8 en els cultius d'animals irradiats a 1 Gy i sacrificats a 3 dpi, i just el contrari pels cultius a 28 dpi dels animals irradiats a 2 Gy; tampoc es van observar diferències significatives entre cromosomes en la suma de pèrdua anafàsica de tots els cultius. Així doncs, es van sumar els valors de pèrdua anafàsica pels dos cromosomes i es va calcular la freqüència de pèrdua anafàsica i de limfòcits amb pèrdua anafàsica per 1.000 binucleats (figura 4.II.4). Es van trobar increments estadísticament significatius de la freqüència de pèrdua anafàsica en els animals irradiats a 1 Gy només en els cultius establerts el mateix dia de la irradiació, però no de la freqüència dels binucleats que presentaven pèrdua anafàsica, degut a que la majoria de micronuclis presentaven dos senyals (taula 4.II.3). En els animals irradiats a 2 Gy, els increments significatius es van observar en els cultius d'esplenòcits del dia 0, 1 i 3, tant de la freqüència de pèrdua anafàsica, com per la freqüència de binucleats amb pèrdua anafàsica. En els animals irradiats a 1 Gy la freqüència de pèrdua anafàsica va augmentar prop de 7 vegades en els cultius del mateix dia de la irradiació, i es va mantenir entre 2 i 3 vegades per sobre des del dia següent a la irradiació fins passat 28 dies. En els animals irradiats a 2 Gy, els increments de pèrdua anafàsica van ser superiors en tots els dies estudiats, sent de més de 20 vegades a 0 i 1 dpi, disminuint a la meitat a 3 dpi i tornant a reduir-se a la meitat a 28 dpi, arribant a tenir prop de 7 vegades el nivell basal. El mateix comportament van seguir els binucleats amb pèrdua anafàsica a 1 i 2 Gy, però amb uns valors inferiors.

Taula 4.II.3. Frequència de pèrdua anafàsica (PA), binucleats amb pèrdua anafàsica (BNPA) i malsegregació (conjunt de pèrdua anafàsica i/o no disjunció) pels cromosomes 8 i 14.

Dosi (Gy)	dpi (dies)	n	BN	PA8	PA8/BN (‰) ^a	PA14	PA14/BN (‰) ^a	PA	PA/BN (‰) ^a	BNPA	BNPA/BN (‰) ^a	Malsegregació/BN (‰) ^a
0	0	4	2507	0	0 ± 0,00	0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	0 ± 0	1,80 ± 1,45
1	0	4	2905	7	1,71 ± 1,15	14	5,10 ± 1,84	21	6,81 ± 1,21*	11	3,53 ± 0,55	10,08 ± 1,55
	1	6	4074	2	0,66 ± 0,66	6	1,62 ± 1,27	8	2,28 ± 1,27	4	1,14 ± 0,64	5,39 ± 1,38
	3	4	2025	6	2,95 ± 0,98	0	0 ± 0,00	6	2,95 ± 0,98	3	1,48 ± 0,49	6,41 ± 1,69
	28	4	2222	4	1,67 ± 0,99	3	1,45 ± 1,45	7	3,12 ± 2,28	4	1,80 ± 1,37	6,16 ± 2,85
2	0	4	2045	24	11,73 ± 1,58*	21	10,30 ± 2,35*	45	22,03 ± 1,40*	25	12,24 ± 0,59*	29,85 ± 3,09*
	1	4	2049	21	10,26 ± 1,88*	27	13,13 ± 5,43*	48	23,39 ± 4,76*	22	10,72 ± 2,79*	27,81 ± 4,42*
	3	4	2014	17	8,45 ± 2,35*	10	4,97 ± 2,98	27	13,41 ± 5,09*	14	6,95 ± 2,36*	19,37 ± 4,32*
	28	4	2149	2	0,94 ± 0,54	13	6,02 ± 2,57	15	6,96 ± 3,09	9	4,19 ± 1,95	9,19 ± 3,81

n: nombre de cultius; SEM: error estàndard de la mitjana

^aMitjana de les freqüències en ‰ ± SEM

* P < 0,05

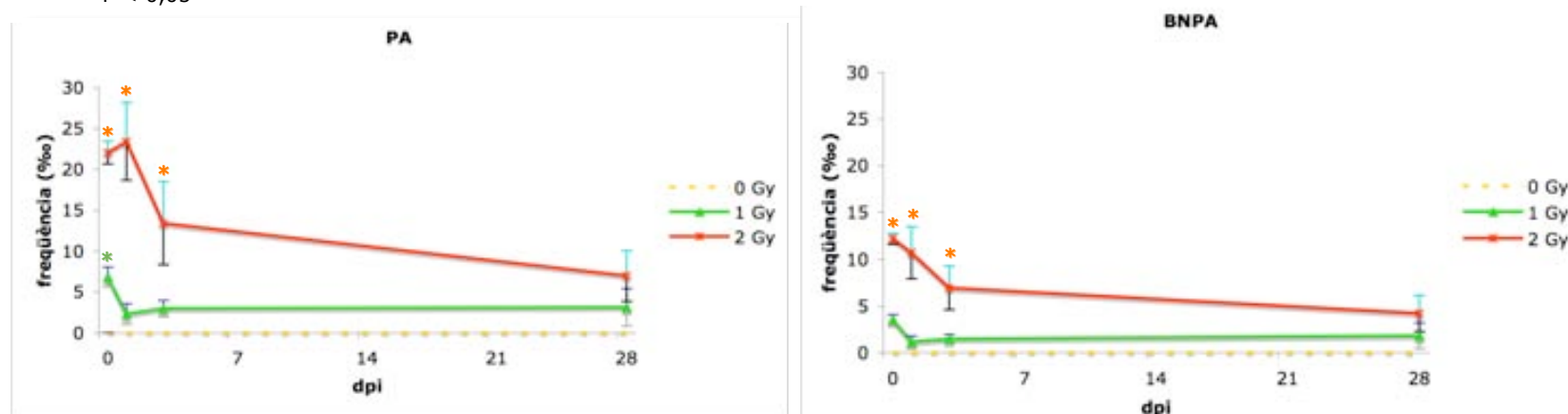


Figura 4.II.4. Frequència de pèrdua anafàsica (PA) i binucleats amb pèrdua anafàsica (BNPA) per 1.000 esplenòcits binucleats. Els asteriscs assenyalen una significació estadística amb un valor de P < 0,05. Les barres indiquen l'error estàndard de la mitjana.

Tal i com s'observa a la taula 4.II.4, la majoria de MN presentava dos senyals pel mateix cromosoma (C2+ MN)(figura 4.II.1b) tant en els animals irradiats a 1 Gy com a 2 Gy de raigs gamma. En els cultius d'animals irradiats a 1 Gy a 0 dpi, el 91% dels MN amb senyal presentaven doble senyal, i el 9% restant en presentava un (C1+ MN); hi va haver un increment a 1 i 3 dpi, apareixent el 100% dels MN amb dos senyals; i la proporció va baixar a 28 dpi amb un 75% dels MN amb dos senyals centromèrics i un 25% amb un senyal. En els esplenòcits binucleats dels animals irradiats a 2 Gy la proporció de MN amb doble senyal no es va mantenir tant elevada, sent d'un 80% immediatament després de la irradiació, va incrementar fins a un 84% a 1 dpi i va arribar al màxim als 3 dpi amb un 93%, i després va disminuir fins a un 67% a 28 dpi, semblant al què passava a 1 Gy. Cal destacar que en els cultius d'animals irradiats a 2 Gy i sacrificats 1 dia després d'irradiar-los es va trobar un MN amb tres senyals subcentromèrics pel cromosoma 8 (C3+ MN); i dos esplenòcits binucleats amb dos micronuclis, cadascun dels micronuclis amb un doble senyal, un pel cromosoma 8 i l'altre pel cromosoma 14, però en cap cas es va trobar un micronucli amb els dos cromosomes marcats simultàniament.

També a la taula 4.II.4 i a la figura 4.II.5 es mostra la freqüència de la suma de MN amb senyal pel cromosoma 8 o pel 14 (C+ MN) respecte a la freqüència de MN totals, és a dir, amb i sense senyal, observant-se uns increments significatius de MN amb senyal positiu en els cultius dels animals irradiats a 1 Gy a 0 dpi, i en els animals irradiats a 2 Gy en els cultius establerts fins al tercer dia després de la irradiació.

Taula 4.II.4. Distribució de senyals en els micronuclis dels esplenòcits binucleats irradiats a 1 i 2 Gy de raigs gamma, i freqüència de micronuclis amb senyal pels cromosomes 8 o 14 respecte als MN totals.

Dosi (Gy)	dpi (dies)	n	MNT	chr 8			chr 14		chr 8 o chr 14	
				C1+ MN	C2+ MN	C3+ MN	C1+ MN	C2+ MN	C+ MN	C+ MN/MN (%) ^a
0	0	4	184	0	0	0	0	0	0	0,00 ± 0,00
1	0	4	255	1	3	0	0	7	11	3,97 ± 0,79*
	1	6	283	0	1	0	0	3	4	1,94 ± 1,19
	3	4	176	0	3	0	0	0	3	1,94 ± 0,70
	28	4	136	0	2	0	1	1	4	2,34 ± 1,68
2	0	4	431	2	11	0	3	9	25	5,85 ± 0,44*
	1	4	476	0	9	1	3	12	25	5,41 ± 1,22*
	3	4	432	1	8	0	0	5	14	3,52 ± 1,36*
	28	4	327	2	0	0	1	6	9	3,14 ± 1,88

n: nombre de cultius; C1+ MN: MN amb un senyal; C2+ MN: MN amb dos senyals; C3+ MN: MN amb tres senyals; C+ MN: MN amb senyal; SEM: error estàndard de la mitjana

^a Mitjana de les freqüències en % ± SEM

* P < 0,05

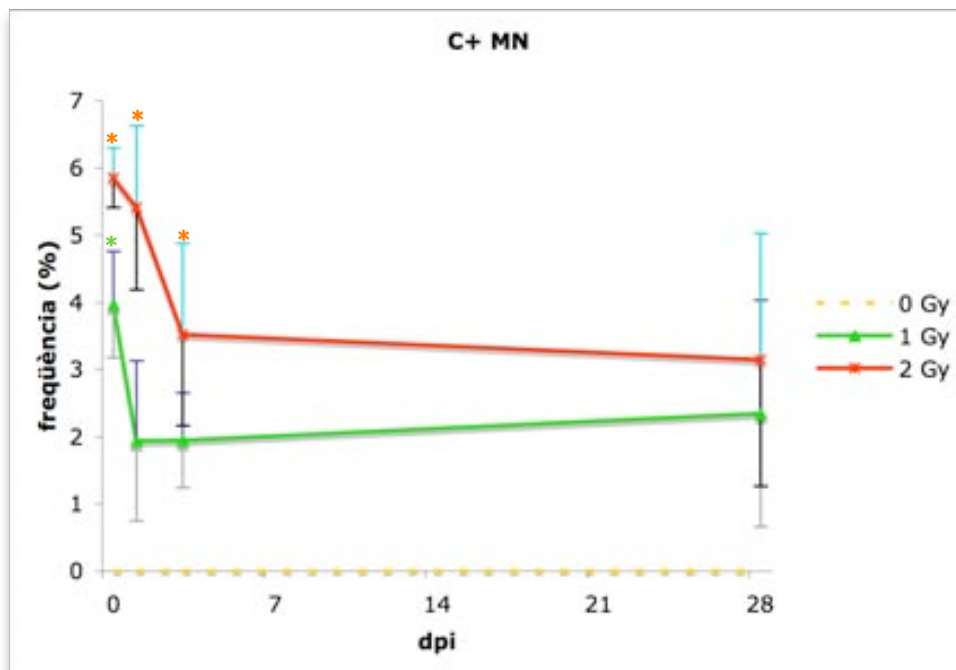


Figura 4.II.5. Freqüència de MN amb senyal pel cromosoma 8 o 14 respecte al nombre de micronuclis totals (%). Els asteriscs assenyalen una significació estadística amb un valor de P < 0,05. Les barres indiquen l'error estàndard de la mitjana.

A la figura 4.II.6 estan representades les freqüències de no disjunció i de pèrdua anafàsica, per mil binucleats, agrupades per dosi de raigs gamma. S'observa que en els ratolins irradiats *in vivo* amb raigs gamma, la freqüència de pèrdua anafàsica va ser significativament superior a la de no

disjunció per la dosi d'1 Gy en els cultius del mateix dia d'irradiació, mentre que a la resta de dies les freqüències eren equivalents. I en els cultius dels animals irradiats a 2 Gy la pèrdua anafàsica va ser significativament superior en tots els dies postirradiació.

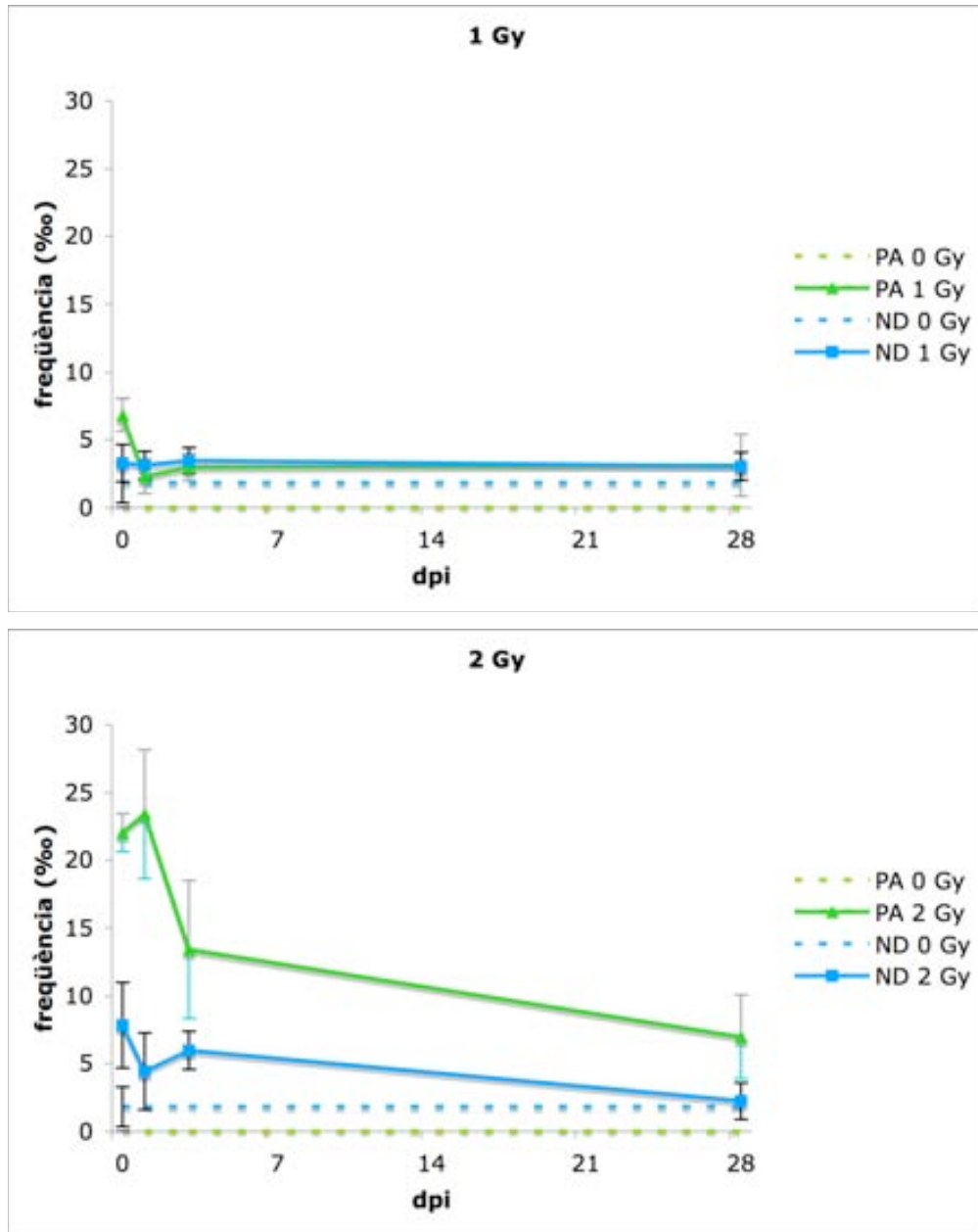


Figura 4.II.6. Relació entre la freqüència de pèrdua anafàsica i no disjunció per 1.000 BN a 1 i 2 Gy de raigs gamma. Les barres indiquen l'error estàndard de la mitjana.

En resum, juntament amb el seu potent efecte clastogènic la radiació ionitzant també és inductora d'aneuploidia *in vivo*, sent la pèrdua anafàsica el principal mecanisme implicat en la inducció d'aneuploidies, i

majoritàriament amb la presència de dos senyals pel mateix cromosoma en cada micronucli. La freqüència d'aneuploidies va disminuint a mesura que augmenta el temps transcorregut entre la irradiació i el sacrifici de l'animal, arribant als 28 dies postirradiació sense que hi hagin efectes estadísticament significatius. Hi ha una clara relació dosi-efecte, amb valors superiors a 2 Gy.

Discussió

Paral·lelament a l'anàlisi de la segregació dels senyals subcentromèrics pels cromosomes 8 i 14, es va fer el recompte del nombre de micronuclis presents a les cèl·lules binucleades. Només es va observar un increment significatiu a la dosi de 2 Gy de raigs gamma en els cultius d'animals sacrificats fins a 3 dies després d'haver-los irradiat. Si es tenen en compte les freqüències mitjanes, es veu que en els cultius dels animals irradiats a 1 Gy hi va haver un augment en els cultius establerts el mateix dia de la irradiació i va disminuir fins al valor basal a 28 dpi; mentre que pels animals irradiats a 2 Gy, les freqüències van ser més elevades, havent un màxim a 1 dpi, que podria ser degut a l'alentiment del cicle cel·lular causat per la radiació, i va anar disminuint progressivament un 30% fins als 28 dpi, on encara presentava valors equivalents al doble de la freqüència basal. Aquests comportaments són similars als observats per d'altres autors (Fenech *et al.*, 1991; Hande *et al.*, 1996b, 1997) utilitzant altres soques de ratolins, en els que observaren una freqüència basal inferior a l'obtinguda en aquest estudi, i increments superiors després de l'exposició a raigs X. Aquestes diferències podrien ser degudes a la soca de ratolí i al tipus de radiació administrada. La disminució de la freqüència de MN al llarg del temps podria ser deguda a la mort selectiva de les cèl·lules micronucleades degut al desequilibri genètic causat pel procés de micronucleació i/o a la dilució de les cèl·lules binucleades degut a la proliferació cel·lular de les cèl·lules sense micronuclis.

L'anàlisi de la no disjunció dels cromosomes 8 i 14 en esplenòcits binucleats va mostrar que en els animals irradiats a 1 Gy la seva freqüència no diferia de la basal, tot i estar lleugerament augmentada, i es mantenia constant al llarg del temps. Els resultats obtinguts a 2 Gy van ser similars, lleugerament superiors en els cultius del mateix dia de la irradiació, i van

anar disminuint fins a valors basals a 28 dies postirradiació. En xifres globals, es veu un lleuger efecte dependent de la dosi en els primers tres dies després de la irradiació. Aquestes dades semblen indicar que en ratolins, la no disjunció no té un paper gaire destacat com a mecanisme inductor d'aneuploidies per l'exposició a radiacions ionitzants. Tot al contrari del que van observar Hande *et al.* (1997), on en cultius d'esplenòcits binucleats de ratolins transgènics irradiats amb 2 Gy de raigs X fins a 28 dies postirradiació i analitzant tres cromosomes, van observar un augment de fins a 114,7 no disjuncions per 1.000 binucleats a 3 dpi que es va mantenir amb valors de 85,3 ‰ no disjuncions a 28 dpi, sent aquest el principal mecanisme inductor d'aneuploidies radioinduides. Ara bé, en el seu estudi les sondes utilitzades es localitzaven més distalment en el braç q, el què podria afavorir que el nombre de trencaments entre el centròmer i la regió marcada fos més elevat i que els fragments acèntrics amb senyal, producte de l'efecte clastogènic, s'haguessin incorporat en els nuclis principals al tornar-se a formar la membrana nuclear i haguessin estat considerats no disjuncions.

Pel què fa als resultats de pèrdua anafàsica en aquest estudi, el valor basal va ser inferior al de la no disjunció, similar al que van trobar Hande *et al.* (1997) utilitzant sondes específiques per un transgèn integrat al mig dels braços llargs de tres cromosomes. Es va observar un increment dependent de la dosi en tots els dies postirradiació, sent significatiu en els animals irradiats a 1 Gy en els cultius del mateix dia i a 2 Gy en els cultius dels tres primers dies després de la irradiació. La majoria de senyals observats pels cromosomes 8 i 14 en els micronuclis van ser dobles pel mateix cromosoma, originant dos nuclis monosòmics per aquell cromosoma implicat. En els cultius dels animals irradiats a 1 Gy només es va observar un micronucli amb un únic senyal a 1 i 28 dpi, mentre que en els cultius dels animals irradiats a 2 Gy la proporció de MN amb un senyal subcentromèric va ser més alta i es va observar en tots els dies després de la irradiació. La presència de dos senyals pel mateix cromosoma en un micronucli semblaria indicar que és el resultat d'una pèrdua anafàsica d'un cromosoma sencer que al no haver-se separat les cromàtides i trobar dificultats per migrar cap a pols oposats del fus mitòtic finalment acaba formant un micronucli, és a dir, seria el resultat d'una pèrdua anafàsica d'un

cromosoma que prèviament havia patit una no disjunció. La tècnica de FISH combinada amb la contratió del DNA amb DAPI ens dona un patró similar al de bandes C, en el que l'heterocromatina centromèrica queda més intensament tenyida. D'aquesta manera es va observar que, en la majoria de casos, els micronuclis amb doble senyal, cadascun dels senyals anava acompanyat d'heterocromatina centromèrica, i com que les sondes utilitzades es localitzen just per sota d'aquesta heterocromatina fa pensar que el contingut dels micronuclis podria ser d'un cromosoma sencer, amb les dues cromàtides. D'acord amb aquesta explicació els dos nuclis principals presentaven un sol senyal cadascun pel cromosoma implicat en la pèrdua anafàsica doble. Russo *et al.* (1996), combinant sondes telomèriques i centromèriques, van observar que més de la meitat dels MN amb senyal centromèric presentaven quatre senyals telomèrics en cultius tractats amb mitomicina C o coldemid, indicant la presència d'un cromosoma sencer. La inclusió de cromosomes duplicats en els micronuclis, per exemple dos cromosomes 8 o dos cromosomes 14, tindria el seu origen en defectes del centròmer, mentre que si enlloc de les dues cromàtides d'un cromosoma fossin cromàtides no homòlogues, per exemple un cromosoma 8 i un cromosoma 14, seria un indicador de l'amplificació del centrosoma (Leach *et al.*, 2004), fet que no es va observar en aquest estudi, ja que en el cas dels dos binucleats que van presentar pèrdua anafàsica doble pels dos cromosomes, cada parella estava en un MN.

Un altre factor que contribuiria a l'augment de senyals dobles en els MN serien els cromosomes reorganitzats, com poden ser els dicèntrics o els cromosomes tipus translocació Robertsoniana, anomenats també metacèntrics. Cornforth i Goodwin (1991) van descriure que en fibroblasts humans irradiats amb raigs gamma, fins a una quarta part dels dicèntrics de la metafase prèvia podien quedar inclosos en els micronuclis. Com també Hande *et al.* (1996a; 1996b), estudiant la persistència de MN amb senyal pel DNA satèl·lit menor i de cromosomes dicèntrics després d'haver irradiat els ratolins amb raigs X, van observar que mentre els C+ MN anaven augmentant gradualment fins el dia 14 després de la irradiació, els dicèntrics anaven disminuint de forma exponencial. Així doncs, una part podria ser explicada per la inclusió de dicèntrics en els MN però no s'ha de descartar la contribució deguda al dany a l'aparell de segregació

cromosòmica (Cornforth i Goodwin, 1991). L'altre reorganització freqüentment observada en ratolins són els cromosomes metacèntrics, resultants de la unió dels braços p de dos cromosomes, o de dues cromàtides si té lloc quan el cromosoma ja s'ha replicat. Boei *et al.* (1996) van observar en esplenòcits irradiats *in vitro* amb raigs X que només el 3,5% d'aquestes figures presentaven DNA satèl·lit menor, que és el DNA satèl·lit que podria organitzar el centròmer, ja que inclou un putatiu lloc d'unió de les proteïnes centromèriques CENP-B (Pietras *et al.*, 1983; Wong i Rattner, 1988; Masumoto *et al.*, 1989; Broccoli *et al.*, 1990), per tant, la majoria de cromosomes metacèntrics serien funcionalment fragments acèntrics, que al quedar englobats dins del mateix MN es visualitzarien com a dos senyals d'hibridació, un per a cada cromàtide. Tanmateix, en algunes espècies de ratolins amb cariotips amb cromosomes metacèntrics estables es troba una quantitat de DNA satèl·lit menor reduïda, d'unes 50 kb de mitjana de les 600 kb habituals (Kipling *et al.*, 1991), que no impedeix que el centròmer sigui funcional (Garagna *et al.*, 1995; Nanda *et al.*, 1995), i llavors no tindrien cap problema en la segregació cromosòmica.

Estudis en limfòcits humans irradiats *in vitro* presentats en el capítol anterior van mostrar que el principal mecanisme implicat en l'aneuploidia induïda per les radiacions gamma era la no disjunció, mentre que en aquesta soca de ratolí sembla tot el contrari. No obstant, Russo *et al.* (1996) indiquen que la no disjunció seguida de la pèrdua anafàsica, amb el resultat de dos nuclis monosòmics, seria el principal mecanisme que originaria els MN amb cromosomes sencers en esplenòcits de ratolí, i és just el què s'observa en el nostre estudi. Les diferències morfològiques dels cromosomes de ratolí i humans, sent els de ratolí tots acrocèntrics, podrien explicar el diferent comportament dels cromosomes a l'hora de separar-se a l'anafase, així com els diferents graus d'astringència dels punts de control del cicle cel·lular.

En resum, el principal mecanisme inductor d'aneuploidia pels raigs gamma en la soca de ratolins B6SJL F1 és la pèrdua anafàsica de cromosomes sencers, que podria ser secundària a la no disjunció d'aquests cromosomes, originant dos nuclis monosòmics. A més a més, una part d'aquests valors podria ser el resultat d'aneuploidies secundàries resultants de reorganitzacions estructurals del tipus dicèntric i metacèntric. Aquests

valors són significatius fins a 3 dies postirradiació, tot i que a 28 dpi encara es mantenen alts.

Resultats

Capítol III: Inducció d'aneuploïdia primària o secundària?: Estudi de cromosomes mitòtics de cèl·lules somàtiques irradiades *in vivo*

De l'anàlisi dels limfòcits binucleats de ratolins irradiats *in vivo* se'n va desprendre que el principal mecanisme inductor d'aneuploidia era la pèrdua anafàsica, probablement secundària a una no disjunció prèvia ja que majoritàriament es van observar binucleats amb micronuclis amb doble senyal per un mateix cromosoma i al mateix temps els nuclis principals eren monosòmics per aquest cromosoma. Aquest fet diferia notablement del que s'havia observat en limfòcits humans irradiats *in vitro* on les aneuploidies induïdes pels raigs gamma van ser principalment originades per no disjunció i amb la implicació d'un únic cromosoma.

Per poder valorar el contingut dels micronuclis amb doble senyal es van estudiar metafases d'esplenòcits de dos ratolins irradiats *in vivo* a 2 Gy de raigs gamma i d'un animal control. Així doncs, es podria veure si les aneuploidies induïdes pels raigs gamma en aquesta soca de ratolí eren degudes a segregacions anòmales de cromosomes sencers, o bé eren fruit de reorganitzacions estructurals, i per tant, secundàries.

Aquest estudi es va fer amb dues hibridacions seqüencials, primer utilitzant una sonda de PNAs específica per tots els telòmers, i posteriorment es va fer una segona hibridació amb les sondes de DNA subcentromèriques pels cromosomes 8 (marcada en verd) i 14 (marcada en vermell).

La primera hibridació ens va permetre valorar les reorganitzacions estructurals que implicaven el centròmer i els telòmers gràcies a que, després del procés d'hibridació i la contratinció del DNA amb DAPI, la regió del DNA satèl·lit major de l'heterocromatina centromèrica es visualitzava d'un color blau més brillant. D'aquesta manera es van poder identificar: a) cromosomes dicèntrics, amb dos senyals d'heterocromatina centromèrica i amb un parell de telòmers a cada extrem (figura 4.III.1.a); b) translocacions del tipus Robertsonianes, que originen cromosomes metacèntrics o submetacèntrics (a partir d'ara anomenats genèricament metacèntrics), amb un senyal d'heterocromatina centromèrica a la part interna del cromosoma i un parell de telòmers a cada extrem (figura 4.III.1.b); c) fragments acèntrics, sense senyal d'heterocromatina centromèrica i amb un nombre de telòmers que va oscil·lar entre quatre i cap, en funció de si el fragment resultava de la unió de dos fragments terminals i llavors es veien quatre telòmers (fragment compost), o bé si era

un fragment terminal i es veien dos telòmers, o bé si el fragment era intersticial i llavors no presentava cap senyal telomèric (figura 4.III.1.e); i d) fragments centromèrics o cèntrics, que presentaven un senyal d'heterocromatina centromèrica i un parell de senyals telomèrics en un dels dos extrems del cromosoma o bé en els dos extrems (figura 4.III.1.f).

La segona hibridació ens va permetre identificar els cromosomes 8 i 14 i veure si estaven implicats en alguna anomalia cromosòmica, ja sigui estructural o numèrica (figura 4.III.2). A més a més, aquesta hibridació ens va permetre detectar un altre tipus de translocació, resultant de la unió d'un fragment cèntric pels braços q amb un fragment acèntric que contenia el senyal d'un dels cromosomes marcats i s'havia trencat just per sota del centròmer (figura 4.III.1.c).

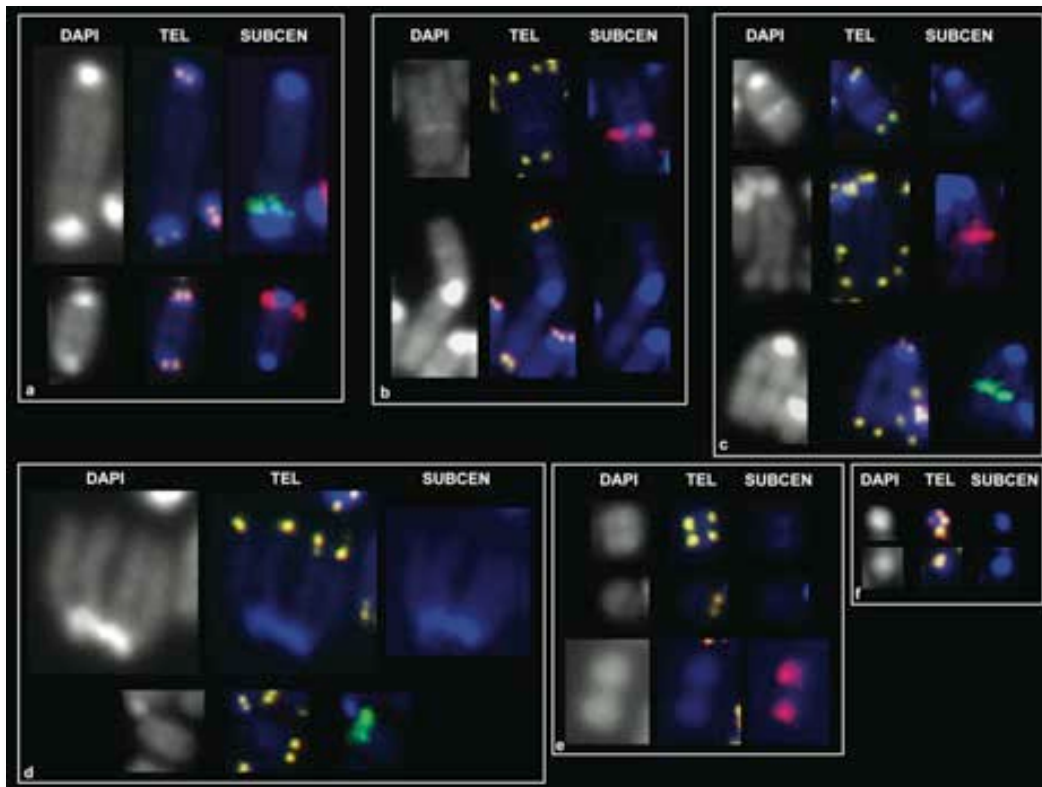


Figura 4.III.1. Imatges de diferents anomalies cromosòmiques: a la esquerra la imatge del DAPI, al centre la imatge amb la hibridació dels telòmers (groc), i a la dreta la imatge de la hibridació amb les sondes subcentromèriques pels cromosomes 8 (verd) i 14 (vermell). a) dicèntrics en els que hi ha implicats un cromosoma 8 (a dalt) i un 14 (a baix); b) cromosomes metacèntrics, a la imatge de dalt en forma part un cromosoma 14; c) metadicèntric (a dalt), i translocació del braç q del cromosoma 14 (centre) i del cromosoma 8 (a baix); d) trencaments centromèrics: per sobre l'heterocromatina centromèrica (a dalt) i entre el centròmer i la sonda subcentromèrica (a baix); e) fragments acèntrics amb un parell de senyals telomèrics a cada extrem (a dalt), un parell en un extrem (al centre) i sense telòmers (a baix) que inclou la regió d'hibridació de la sonda del cromosoma 14; i f) fragments cèntrics amb un parell de senyals telomèrics a cada extrem (a dalt) i amb un parell de senyals telomèrics a un dels extrems (a baix).

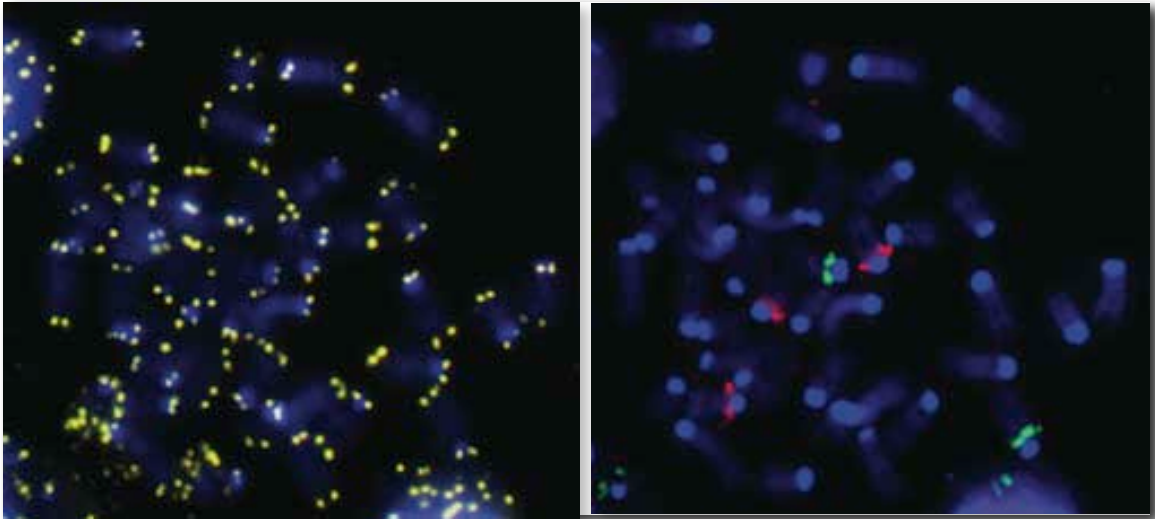


Figura 4.III.2. Trisomia del cromosoma 14. A la dreta hibridació amb una sonda telomèrica (groc), i a la dreta amb dues sondes subcentromèriques específiques pel cromosoma 8 (verd) i pel cromosoma 14 (vermell).

Es van analitzar 182 metafases d'un animal control i un total de 342 metafases dels dos animals irradiats a 2 Gy. Per poder fer l'estudi d'aneuploidia es van valorar metafases amb 39, 40 i 41 centròmers.

Es va utilitzar el test de la χ^2 amb la correcció de Yate per comparar la freqüència de metafases amb cadascuna de les alteracions cromosòmiques numèriques o estructurals observades en aquest estudi dels animals irradiats *versus* la de l'animal control.

L'anàlisi d'aneuploidies en metafase no és tant precisa com la que s'ha fet en cèl·lules binucleades ja que es poden perdre cromosomes durant l'extensió o bé, es poden incorporar cromosomes que han estat desplaçats d'alguna altra metafase. Els resultats es presenten a la taula 4.III.1. En els animals control s'observa que el cromosoma 8 no pateix ni trisomies ni monosomies i que el cromosoma 14 pateix trisomies i monosomies, sent més freqüents les monosomies que les trisomies. En el cas de les metafases dels animals irradiats a 2 Gy, de trisomies només n'observarem pel cromosoma 14, mentre que de monosomies se'n va trobar pels dos cromosomes analitzats, sent 1,8 vegades superior la freqüència del cromosoma 14 a la del cromosoma 8. Tant la freqüència de trisomies com la freqüència de monosomies pels cromosomes 8 i 14 és 2,5 vegades superior en les metafases dels animals irradiats, sense que hi hagin diferències estadísticament significatives.

Taula 4.III.1. Nombre i freqüència (‰) d'anomalies numèriques, trisomies i monosomies, dels cromosomes 8 i 14 en metafases d'esplenòcits d'un ratolí control i dos ratolins irradiats a 2 Gy de raigs gamma.

Dosi (Gy)	metafases	trisomia AAA		monosomia A		
		chr 8	chr 14	chr 8	chr 14	
0^a	total	182	0	1	0	3
	Freq (‰)		0	5,49	0,00	16,48
2^b	total	342	0	4	5	9
	Freq^c ± SEM (‰)		0	13,67 ± 8,89	14,70 ± 0,34	27 ± 3,08

^a n=1


^b n=2

^c Mitjana de la suma de freqüències

SEM: error estàndard de la mitjana

Els resultats observats del nombre i freqüència de cromosomes dicèntrics es presenten a la taula 4.III.2. Només es van observar dicèntrics a les metafases dels animals irradiats. Es van trobar dicèntrics en els que estaven implicats un dels dos cromosomes marcats, o bé un de cada. També es va poder fer el recompte dels cromosomes dicèntrics sense senyal. Una altra vegada, el cromosoma 14 va presentar una freqüència lleugerament més elevada que el cromosoma 8, sent 1,5 vegades superior la seva participació en la formació de dicèntrics. S'observa un increment estadísticament significatiu dels dicèntrics amb senyal pel cromosoma 8 o 14 en les metafases dels animals irradiats ($P < 0,05$).

Taula 4.III.2. Nombre i freqüència (‰) de dicèntrics (dic) en metafases d'esplenòcits d'un ratolí control i dos ratolins irradiats a 2 Gy de raigs gamma.

Dosi (Gy)		metafases	dic 				total
			(8;?)	(14;?) ^d	(8;14)	(?;?) ^d	
0 ^a	total	182	0	0	0	0	0
	Freq (‰)		0	0	0	0	0
2 ^b	total	342	5	6	1	32	44
	Freq ^c ± SEM (‰)		11,96 ± 11,96	18,46 ± 4,10	3,76 ± 3,76	90,23 ± 15,04	124,40 ± 19,14

^a n=1^b n=2^c Mitjana de la suma de freqüències^d ?: cromosoma no marcat

SEM: error estàndard de la mitjana

A la taula 4.III.3 es presenten els resultats dels cromosomes metacèntrics, resultants de la unió de dos cromosomes que s'han trencat per la regió d'heterocromatina centromèrica originant un cromosoma amb una aparença semblant a un translocació Robertsoniana, i els resultats dels fragments acèntrics. Donat que la majoria de metacèntrics originats per l'exposició a radiacions ionitzants no presenten DNA satèl·lit menor (Boei i Natarajan, 1996) no tindrien un centròmer funcional i s'haurien de considerar fragments acèntrics. Així doncs, la freqüència de la suma dels metacèntrics i dels acèntrics és de $267,94 \pm 47,85$ ‰. Només es van observar cromosomes metacèntrics o fragments acèntrics en els animals irradiats i pel cromosoma 14. La freqüència total de fragments acèntrics va ser 5,9 vegades superior a la dels metacèntrics. Això no és estrany si es té en compte que els fragments acèntrics s'originen al formar-se altres reorganitzacions cromosòmiques com són els dicèntrics i els anells. No es van observar diferències estadísticament significatives en la freqüència de metacèntrics i acèntrics amb senyal entre les metafases dels animals irradiats i el control.

Taula 4.III.3. Nombre i freqüència (‰) de cromosomes metacèntrics i fragments acèntrics (ace) en metafases d'esplenòcits d'un ratolí control i dos ratolins irradiats a 2 Gy de raigs gamma.

Dosi (Gy)	metafases	metacèntric X				ace ■				
		(8;?) ^d	(14;?) ^d	(?;?) ^d	total	(8)	(14)	(?) ^d	total	
0^a	total	182	0	0	0	0	0	0	0	
	Freq (‰)		0	0	0	0	0	0	0	
2^b	total	342	0	3	10	13	0	1	74	75
	Freq^c ± SEM (‰)		0	11,28 ± 11,28	26,66 ± 11,62	38,94 ± 0,34	0	2,39 ± 2,39	227,61 ± 50,58	230,01 ± 48,19

^a n=1

^b n=2

^c Mitjana de la suma de freqüències

^d ?: cromosoma no marcat

SEM: error estàndard de la mitjana

Va ser possible detectar translocacions cromosòmiques només en els casos en que el fragment sense centròmer que s'uneix als braços q d'un altre cromosoma incloïa un senyal d'hibridació, ja que el fet que tots els cromosomes de ratolí siguin acrocèntrics fa pràcticament impossible valorar canvis de mida. Segons Boei i Natarajan (1996), els cromosomes que presentaven dos blocs d'heterocromatina centromèrica com a resultat de la unió dels braços q d'un cromosoma amb els braços p d'un altre, per la seva morfologia seria considerat un metadicèntric, però en el 93,8% dels casos només l'heterocromatina terminal inclouria el DNA satèl·lit menor, i per tant, només aquest centròmer seria funcional, comportant-se com les translocacions descrites anteriorment. En els animals irradiats, al voltant d'un 30% dels metadicèntrics presentaven senyal d'hibridació per un dels cromosomes marcats o per tots dos (taula 4.III.4) i només es va observar una translocació amb senyal pel cromosoma 14 (taula 4.III.4). En els animals control no es van detectar ni metadicèntrics ni translocacions. Tampoc es van observar diferències estadísticament significatives en la freqüència de translocacions i metadicèntrics amb senyal entre les metafases dels animals irradiats i el control.

Taula 4.III.4. Nombre i freqüència (‰) de translocacions en metafases d'esplenòcits d'un ratolí control i dos ratolins irradiats a 2 Gy de raigs gamma.

Dosi (Gy)		metafases	metadicèntric \times				total	t \uparrow		total
			(8;?) ^d	(14;?) ^d	(8;14)	(?;?) ^d		(?;8) ^d	(?;14) ^d	
0 ^a	total	182	0	0	0	0	0	0	0	
	Freq (‰)		0	0	0	0	0	0	0	
2 ^b	total	342	1	0	1	5	7	0	1	1
	Freq ^c ± SEM (‰)		2,39 ± 2,39	0	3,76 ± 3,76	13,33 ± 5,81	19,48 ± 4,44	0	3,76 ± 3,76	3,76 ± 3,76

^a n=1

^b n=2

^c Mitjana de la suma de freqüències

^d ?: cromosoma no marcat

SEM: error estàndard de la mitjana

També es van trobar fragments amb centròmer (taula 4.III.5) tant en metafases de ratolins control com irradiats, sent 9 vegades superior en els animals irradiats. D'aquests fragments, només se'n va trobar un que presentés senyal d'hibridació i també va ser pel cromosoma 14.

Taula 4.III.5. Nombre i freqüència (‰) de fragments de cromosoma amb centròmer (fragments cèntrics) en metafases d'esplenòcits d'un ratolí control i dos ratolins irradiats a 2 Gy de raigs gamma.

Dosi (Gy)		metafases	fragments cèntrics			
			(8)	(14)	(?) ^d	total
0 ^a	total	182	0	0	2	2
	Freq (‰)		0	0	10,99	10,99
2 ^b	total	342	0	1	29	30
	Freq ^c ± SEM (‰)		0	2,39 ± 2,39	87,15 ± 10,59	89,54 ± 8,20

^a n=1

^b n=2

^c Mitjana de la suma de freqüències

^d ?: cromosoma no marcat

SEM: error estàndard de la mitjana

Si es té en compte el nombre de senyals telomèrics que presentaven els fragments acèntrics i cèntrics es pot estimar el nombre de fragments cromosòmics terminals que van quedar sense reparar després de l'exposició a la radiació ionitzant. Les dades es presenten a la taula 4.III.6. Un 30% dels acèntrics no presentaven telòmers a cap dels extrems, sent doncs fragments intersticials; un 20% presentaven un parell de senyals telomèrics, per tant, eren fragments terminals; i un 50% dels fragments eren composts perquè presentaven un parell de senyals telomèrics a cadascun dels extrems. Pel què fa als fragments cèntrics vam distingir els que presentaven pràcticament només l'heterocromatina centromèrica dels que eren d'una mida equivalent a un cromosoma sencer i només els faltava els telòmers dels braços p o q, anomenats cromosomes tp- i tq- respectivament. Només es van observar cromosomes tp- i tq- en les metafases dels animals irradiats, sent la freqüència de cromosomes tp- 1,6 vegades superior a la dels cromosomes tq-.

Taula 4.III.6. Relació del nombre de telòmers presents en els fragments acèntrics (ace) i cèntrics (cent) en metafases d'esplenòcits d'un ratolí control i dos ratolins irradiats a 2 Gy de raigs gamma.

Dosi (Gy)		metafases	ace				cent				
			t0	t2	t4	total	t2	t4	tp-	tq-	total
0 ^a	total	182	0	0	0	0	2	0	0	0	2
	Freq (‰)		0	0	0	0	10,99	0	0	0	10,99
2 ^b	total	342	22	15	38	75	16	3	7	4	30
	Freq ^c ± SEM (‰)		75,87 ± 51,95	46,82 ± 13,33	107,31 ± 17,09	230,01 ± 48,19	45,11 ± 7,52	8,54 ± 1,03	22,21 ± 7,86	13,67 ± 8,89	89,54 ± 8,20

^a n=1

^b n=2

^c Mitjana de la suma de freqüències
SEM: error estàndard de la mitjana

Al calcular la freqüència de fragments centrals segons el nombre de senyals telomèrics presents es van sumar els cromosomes tp- i tq- a la categoria dels fragments centrals amb dos telòmers. Així, els valors resultants van ser d'un 90% pels fragments amb dos telòmers; i d'un 10% pels fragments amb 4 telòmers, en aquests fragments només es reconeix l'heterocromatina centromèrica i i segons l'estudi de Boei i Natarajan (1996) serien dicèntrics petits.

Discussió

L'anàlisi d'anomalies numèriques no clonals es fa difícil analitzant metafases ja que en el moment de fer l'extensió és possible que es desplacin cromosomes del seu lloc d'origen, i per tant, es poden obtenir freqüències poc fiables, ja que algunes de les monosomies serien pèrdues artefactuals de cromosomes. Per aquesta raó, s'assumeix que el valor de les hipoploïdies és el mateix que l'obtingut per les hiperploïdies, ja que per cada cromosoma que segregui incorrectament s'obtindrà una cèl·lula monosòmica i una de trisòmica, tant si té lloc per no disjunció com per pèrdua anafàsica, doncs els cromosomes englobats en un MN formaran part igualment de la cèl·lula. Tot i que aquest últim punt s'hauria de matisar, ja que si al dividir-se el citoplasma el MN queda englobat juntament amb el nucli que li falta aquest material genètic, la cèl·lula acabarà contenint tota la informació, i només en el cas que el MN quedi englobat pel citoplasma del nucli oposat és quan apareixeran monosomies i trisomies. Així doncs, si es considera que la freqüència d'aneuploïdia és el doble del valor observat de trisomies s'obté que per l'animal control seria de 10,98‰ i en les metafases dels animals irradiats de 27,34‰. Si es comparen aquests valors amb els valors de malsegregació (pèrdua anafàsica i/o no disjunció) per aquests dos cromosomes dels esplenòcits binucleats (taula 4.II.3), s'observa que en els animals control és molt més elevada (10,98‰ vs 1,80 ± 1,45‰, metafase vs BN) i aproximadament equivalent en els animals irradiats (27,34‰ vs 29,85 ± 3,09‰, metafase vs BN). El fet que els valors d'aneuploïdia en metafases control sigui més elevat que en l'estudi de binucleats podria ser degut a que només es van analitzar metafases d'un únic animal, com també que el nombre de metafases analitzades va ser menor que pel total dels animals irradiats. Tot i l'elevada freqüència

d'aneuploidia en les metafases de l'animal control, s'observa un clar increment induït per les radiacions fet que demostraria que la radiació ionitzant afectaria a la maquinària de segregació, ja sigui a nivell de la seqüència de DNA centromèrica, de les proteïnes centromèriques, del cinetocor o de les cohesines. El que s'observessin majoritàriament MN amb dos senyals suggeriria que les dues cromàtides germanes no s'haurien separat, per errors en el procés de degradació de les cohesines centromèriques, o bé perquè la unió dels microtúbuls no ha estat la correcta i els cromosomes al no ser desplaçats cap a pols oposats del fus mitòtic podrien quedar englobats en forma de MN. En les dues situacions podríem observar MN amb dos senyals per un mateix cromosoma i dues regions d'heterocromatina centromèrica.

Ara bé, tot i que només amb els valors observats d'aneuploidia en les metafases ja s'explicarien els valors de malsegregació observats en els esplenòcits binucleats, també hi ha la possibilitat que aquest micronuclis amb doble senyal fossin el resultat de reorganitzacions cromosòmiques que trobessin dificultats a l'hora de segregar durant l'anafase. Fet molt probable ja que la radiació ionitzant és principalment clastogènica. Les anomalies estructurals observades en les que hi estaven implicats els cromosomes 8 o 14 van ser: dicèntrics, metacèntrics, fragments acèntrics, metadicèntrics, fragments cèntrics i translocacions. De totes elles, les que poden manifestar dificultats en el moment de la segregació dels cromosomes són totes excepte les translocacions (tal i com s'han definit anteriorment) i els fragments amb centròmer.

Els cromosomes dicèntrics, tal com s'ha explicat en el capítol de l'anàlisi de limfòcits humans irradiats *in vitro*, només en els casos que hi hagi una torsió entre els dos centròmers quedaran encallats en el moment de la segregació cap als pols oposats del fus mitòtic, i si el pont no es trenca, podria acabar formant un micronucli, o bé anar a parar a un dels dos nuclis principals (i llavors hagués estat interpretat com una no disjunció). El que es va observar en els BN dels esplenòcits de ratolí era que la majoria de MN presentaven dos senyals pel mateix cromosoma i quedaven els dos nuclis principals monosòmics. Una altra possibilitat és que el dicèntric que ha quedat encallat acabi trencant-se, i llavors cada fragment podria migrar a un dels nuclis principals, o bé també podria anar a

parar a un MN, i després tindríem cromosomes delecionats, que en el cas dels micronuclis, al separar-se les cromàtides podríem visualitzar dos senyals d'heterocromatina centromèrica i els senyals subcentromèrics dels cromosomes marcats just al seu costat. Segons Cornforth i Goodwin (1991) una quarta part dels dicèntrics acaben formant MN, així doncs, comparant els valors de pèrdua anafàsica pels cromosomes marcats ($22,03 \pm 1,40\%$) i de dicèntrics ($34,18 \pm 4,10\%$) tindríem que un $8,54\%$ dels dicèntrics acabarien formant MN.

Pel què fa als cromosomes metacèntrics induïts per la radiació ionitzant, el $96,5\%$ no presenten DNA satèl·lit menor a la regió d'heterocromatina centromèrica, i per tant, no tenen un centròmer funcional (Boei i Natarajan, 1996), mentre que els metacèntrics presents en el cariotip de determinades soques de ratolí sí que en presenten i, per tant, els cromosomes segreguen correctament (Garagna *et al.*, 1995; Nanda *et al.*, 1995). Suposant que els metacèntrics observats no presentessin DNA satèl·lit menor es comportarien com a fragments acèntrics. Tant els metacèntrics com els fragments acèntrics no podran unir-se als microtúbuls i ser dirigits cap als pols oposats del fus mitòtic i, per tant, podrien acabar formant part dels micronuclis o ser englobats per un dels nuclis principals. En el cas dels fragments acèntrics no veuríem el bloc d'heterocromatina centromèrica adjacent, mentre que sí pels metacèntrics. Si les dues cromàtides es mantenen unides, i es desplacen cap al mateix lloc, podrien donar senyals equivalents a les no disjuncions i a les pèrdues anafàsiques amb doble senyal. La freqüència de metacèntrics més acèntrics amb senyal pels dos cromosomes analitzats és d'un $13,67\%$, ara bé, la proporció d'aquests que donaran MN amb doble senyal, o seran englobats pels nuclis principals es desconeix. S'ha de tenir en compte que els metacèntrics contenen pràcticament tota la informació d'aquell cromosoma, ja que en el cas del metacèntrics la unió té lloc pels braços p, deixant els q íntegres.

Finalment, si se suma la freqüència d'aneuploidia (27%), la meitat de la freqüència dels dicèntrics ($17,09\%$, considerant que la probabilitat que presentin problemes mecànics a l'hora de separar les cromàtides és del cinquanta per cent) i la freqüència de metacèntrics més acèntrics ($13,67\%$) amb senyal d'hibridació per algun dels dos cromosomes analitzats en les metafases dels esplenòcits de ratolins irradiats a 2 Gy,

s'obté que la contribució respectiva de cadascun d'ells en la malsegregació valorada en interfase seria d'un 47%, un 29% i un 24%.

En resum doncs, amb les dades obtingudes de l'estudi de metafases d'esplenòcits d'animals irradiats a 2 Gy es pot concloure que l'origen de l'aneuploïdia induïda pels raigs gamma és principalment primària, és a dir, per la pèrdua o guany de cromosomes sencers, i que també hi ha una part d'aneuploïdia secundària deguda als metacèntrics. La majoria d'aquests darrers, però, degut a l'absència d'un centròmer funcional s'aniran perdent a mesura que les cèl·lules es vagin dividint, mentre que les monosomies i trisomies, si no són incompatibles amb la viabilitat de la cèl·lula, es poden mantenir al llarg del temps. Tanmateix, una part de les aneuploïdies estimades a partir dels nuclis interfàsics de les cèl·lules binucleades serien resultat d'anomalies estructurals, és el cas dels dicèntrics, i no serien aneuploïdies de cromosomes sencers.

Resultats

Capítol IV: Inducció d'aneuploïdia en diferents estadis de l'espermatogènesi de ratolí

Existeixen nombrosos estudis de mutagènesi de les cèl·lules germinals en rosegadors que indiquen que el tractament de les cèl·lules germinals masculines amb mutàgens té conseqüències importants en la reproducció. No obstant, es coneix poc sobre els mecanismes de formació d'anomalies cromosòmiques derivades del pare i la sensibilitat de les cèl·lules germinals masculines en els diferents estadis de l'espermatogènesi. Per valorar l'efecte de la radiació ionitzant en la segregació dels cromosomes en els diferents estadis de l'espermatogènesi del ratolí es van estudiar els espermatozoides de l'epidídim d'animals irradiats a 1 i 2 Gy de raigs gamma, sacrificant els animals a diferents dies després de la irradiació (dpi). Així es van estudiar espermatozoides que havien estat irradiats a les fases d'espermatogoni cèl·lula mare (56 dpi), espermatòcit (28 dpi), espermatide (14 dpi), espermatozoide testicular (7 dpi) i espermatozoide epididimal (3 dpi) (figura 4.IV.1). Es van analitzar dos animals per cada dosi i dia, i dos controls, és a dir, animals no irradiats. L'estudi es va fer en 10.000 espermatozoides per animal.

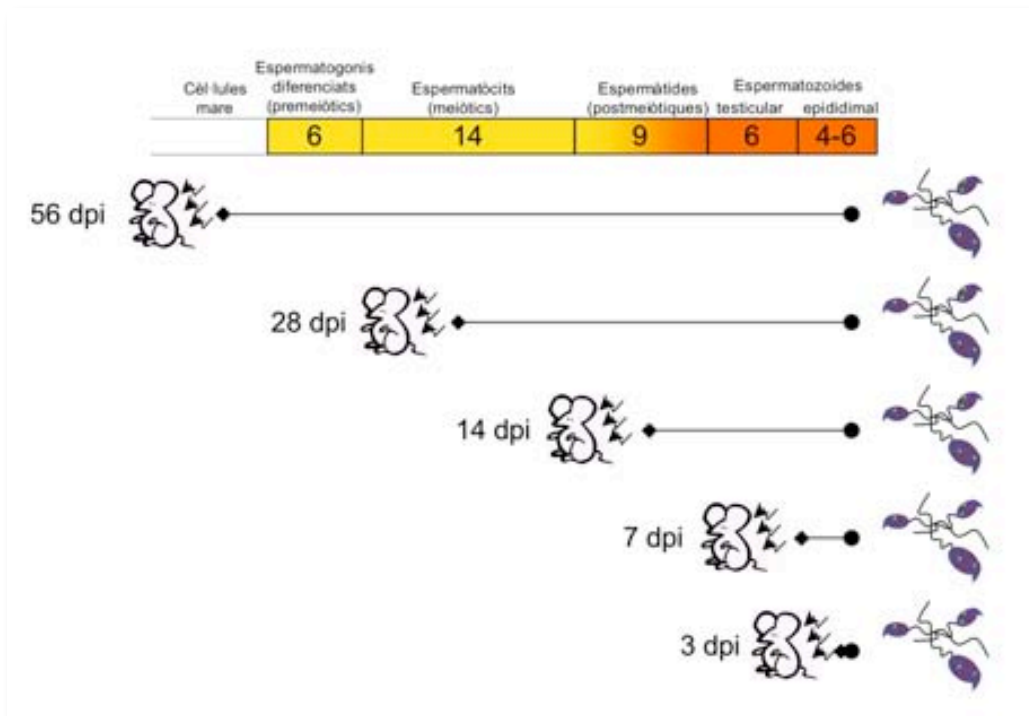


Figura 4.IV.1. Disseny experimental. Anàlisi dels espermatozoides que havien estat irradiats en les fases d'espermatogoni cèl·lula mare (56 dpi), espermatòcit (28 dpi), espermatide (14 dpi), espermatozoide testicular (7 dpi) i espermatozoide epididimal (3 dpi).

Utilitzant dues sondes de DNA específiques d'una regió subcentromèrica, una del cromosoma 8 i una altra del cromosoma 14, marcades cadascuna d'elles amb un color diferent, es va poder valorar l'alteració en el nombre normal de cromosomes per una cèl·lula haploide, que seria d'un senyal per cada cromosoma (figura 4.IV.2a). Així, si apareixien dos senyals verds, color del fluorocrom associat a la sonda de DNA del cromosoma 8, i un de vermell, color de la sonda del cromosoma 14, ens indicava que hi havia una disomia pel cromosoma 8 (figura 4.IV.2b); si observàvem dos senyals vermells i un de verd, ens indicava que hi havia una disomia pel cromosoma 14; i si observàvem dos senyals per ambdós cromosomes, es va interpretar com una diploïdia (figura 4.IV.2c); i en el cas que s'observessin tres senyals per cada cromosoma es va considerar una triploïdia. Les valoracions de les poliploïdies venien corroborades per l'augment de la mida dels espermatozoides.

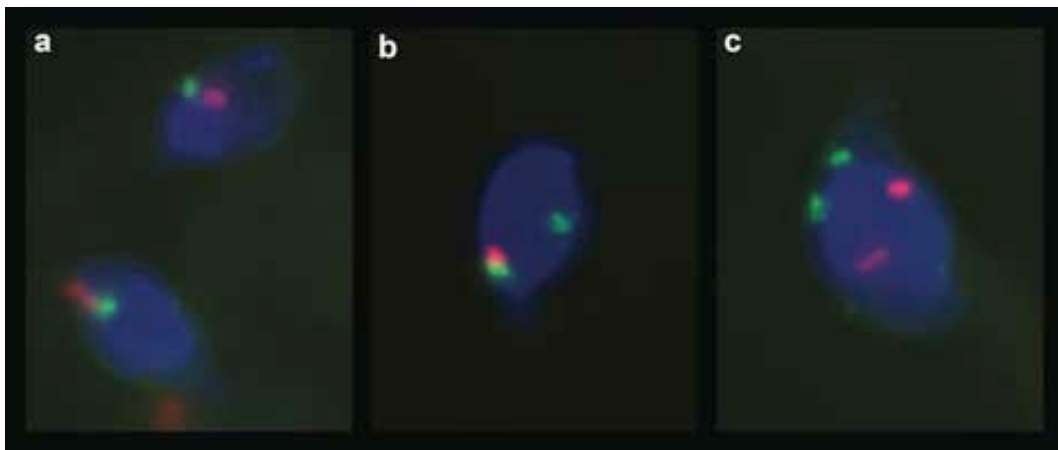


Figura 4.IV.2. Imatges d'espermatozoides de ratolí hibridats amb dues sondes subcentromèriques pels cromosomes 8, en verd, i 14, en vermell. a) espermatozoides normals; b) espermatozoide disòmic pel cromosoma 8; c) espermatozoide diploide.

Els tipus d'anomalies cromosòmiques numèriques estudiades van ser les disomies i les diploïdies (taula 4.IV.1). Les nul·lisomies no es van analitzar directament, considerant la seva incidència l'equivalent a la de les disomies.

Es va utilitzar el test de la χ^2 amb la correcció de Yate per comparar la freqüència dels espermatozoides disòmics i diploides dels animals irradiats *versus* la dels animals control.

Taula 4.IV.1. Freqüència mitjana d'anomalies numèriques (\pm SEM) pels cromosomes 8 i 14 en espermatozoides de ratolí obtinguts a 3, 7, 14, 28 i 56 dies postirradiació (dpi) a 1 i 2 Gy de raigs gamma, expressada per 10.000 cèl·lules.

Dosi (Gy)	dpi	n	Esperma-tozoides analitzats	Total	Normals	Disomia 8	Disomia 14	Disomia 8+14	Diploïdia
0	0	2	20.085	10.042,5 \pm 7,5	9.988,1 \pm 2,0	2,0 \pm 1,0	5,0 \pm 1,0	7,0 \pm 0,0	5,0 \pm 2,0
1	3	2	20.136	10.068,0 \pm 17,0	9.994,0 \pm 1,0	0,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	5,0 \pm 1,0
	7	2	20.085	10.042,5 \pm 11,5	9.983,6 \pm 3,5	2,0 \pm 1,0	3,5 \pm 1,5	5,5 \pm 0,5	11,0 \pm 3,0
	14	2	20.063	10.031,5 \pm 7,5	9.990,5 \pm 0,5	2,5 \pm 0,5	1,5 \pm 1,5	4,0 \pm 2,0	5,5 \pm 1,5
	28	2	20.056	10.028,0 \pm 4,0	9.961,1 \pm 5,0	5,5 \pm 2,5	8,0 \pm 1,0	13,5 \pm 1,5	25,4 \pm 3,5***
	56	2	20.026	10.013,0 \pm 2,0	9.977,0 \pm 0,0	4,0 \pm 1,0	6,5 \pm 0,5	10,5 \pm 0,5	12,5 \pm 0,5*
2	3	2	20.169	10.084,5 \pm 67,5	9.989,6 \pm 5,5	4,5 \pm 2,5	3,0 \pm 3,0	7,5 \pm 5,5	3,0 \pm 0,0
	7	2	20.052	10.026,0 \pm 20,0	9.980,0 \pm 4,0	5,5 \pm 1,5	6,0 \pm 1,0	11,5 \pm 2,5	8,5 \pm 1,5
	14	2	20.094	10.047,0 \pm 40,0	9.969,6 \pm 0,4	9,5 \pm 0,5**	7,5 \pm 1,5	16,9 \pm 2,1**	12,9 \pm 1,9*
	28	2	20.114	10.057,0 \pm 10,0	9.924,9 \pm 1,4	10,4 \pm 0,5**	16,9 \pm 2,0***	27,3 \pm 2,5***	47,2 \pm 3,4***
	56	2	20.105	10.052,5 \pm 7,5	9.983,6 \pm 3,5	5,5 \pm 1,5	9,0 \pm 2,0	14,4 \pm 3,5*	2,0 \pm 0,0

* P < 0,05

** P < 0,01

*** P < 0,0001

La freqüència basal de disomia (\pm SEM) per 10.000 espermatozoides va ser de $2,0 \pm 1,0$ pel cromosoma 8 i de $5,0 \pm 1,0$ pel cromosoma 14. Al comparar les freqüències dels dos cromosomes, no es van trobar diferències significatives de la freqüència basal de disomies entre les dues sondes utilitzades, així com tampoc per les observades en cada dosi i dia postirradiació. Així doncs, es van sumar els valors de disomia dels dos cromosomes i va resultar amb una freqüència basal de $7,0 \pm 0,0$ ‰.

L'anàlisi de les disomies pels cromosomes 8 i 14 va donar increments significatius en els animals irradiats amb 2 Gy respecte als controls, sent estadísticament significatiu pel cromosoma 8 a 14 dpi ($P = 0,0035$) i 28 dpi ($P = 0,0014$), mentre que pel 14 només a 28 dpi ($P < 0,0001$). Quan se sumen les disomies pels dos cromosomes s'observen increments significatius a 14 dpi ($P = 0,0061$), 28 dpi ($P < 0,0001$) i 56 dpi ($P = 0,0329$) (figura 4.IV.3).

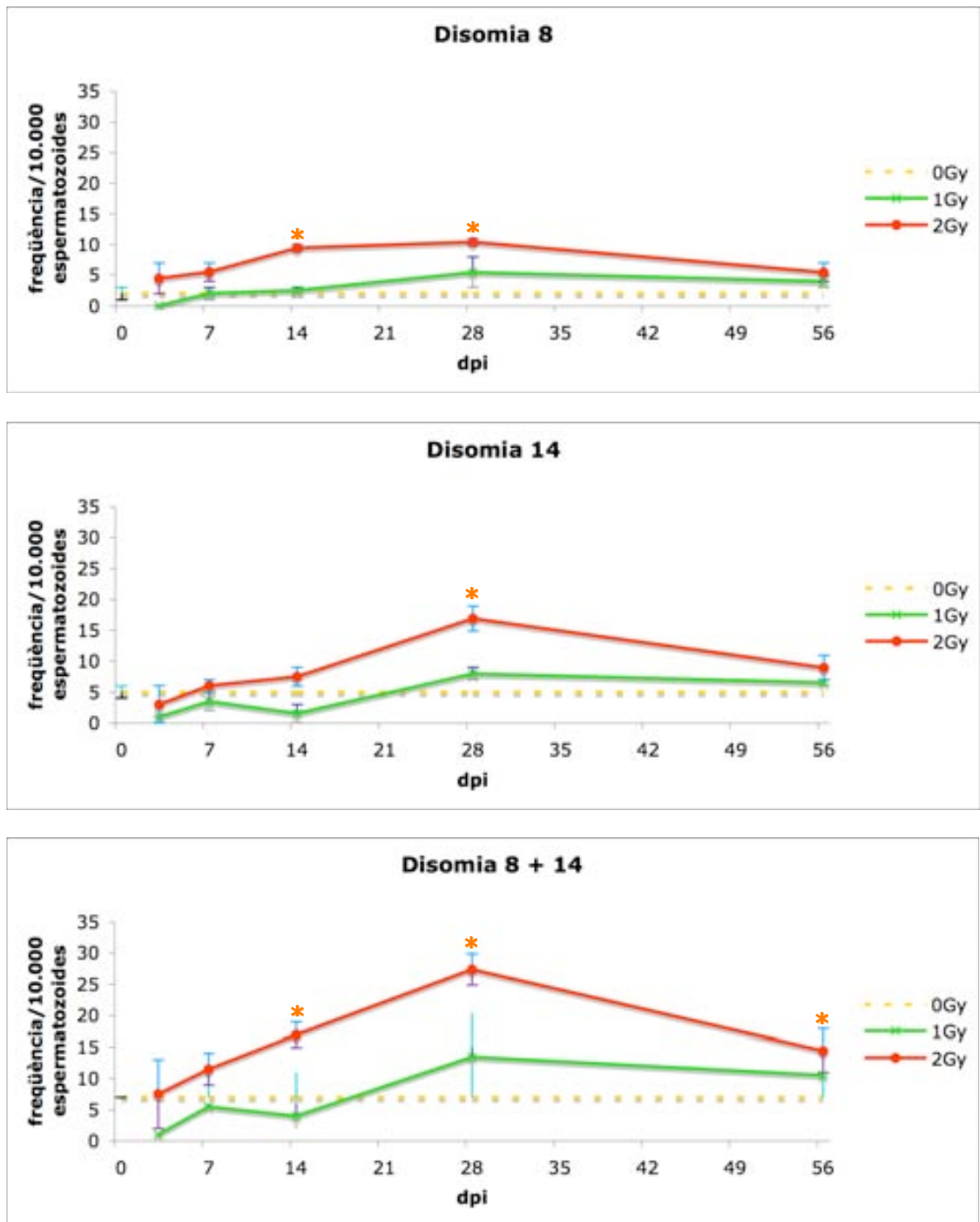


Figura 4.IV.3. Freqüència mitjana de disomies pel cromosoma 8, pel cromosoma 14 i per la suma dels dos cromosomes, en espermatozoides de ratolins irradiats a 1 i 2 Gy, obtinguts a diferents dies postirradiació. Els asteriscs marquen els increments estadísticament significatius ($P < 0,05$).

La freqüència de diploïdia (\pm SEM) va ser de $5,0 \pm 2,0$ ‰. Es van observar increments significatius dels espermatozoides diploides en els animals irradiats amb 1 Gy a 28 dpi ($P < 0,0001$) i 56 dpi ($P = 0,0175$), i pels irradiats amb 2 Gy a 14 dpi ($P = 0,0124$) i 28 dpi ($P < 0,0001$) (figura

4.IV.4). També es van observar dos espermatozoides triploides en animals irradiats amb 2 Gy, un a 28 dpi i l'altre a 56 dpi.

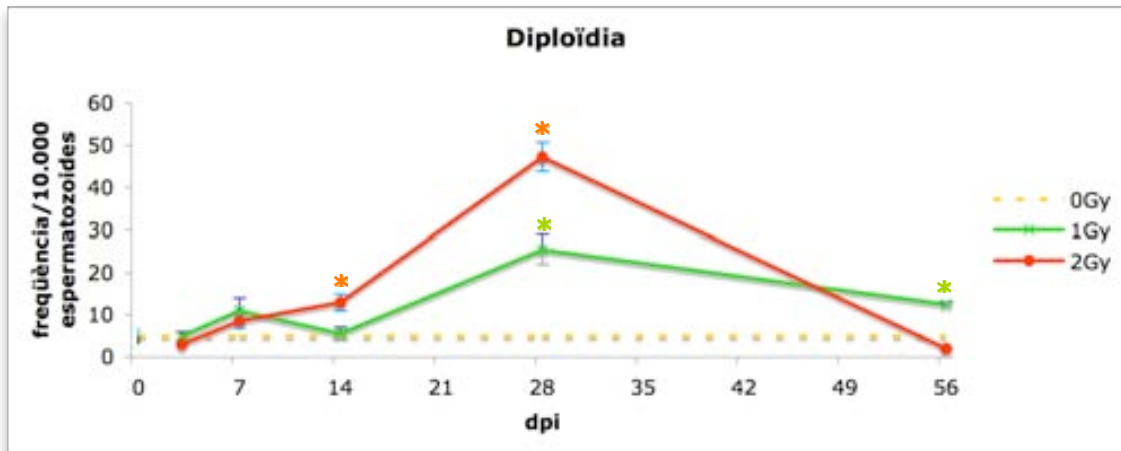


Figura 4.IV.4. Freqüència mitjana de diploïdia pels cromosoma 8 i 14 en espermatozoides de ratolins irradiats a 1 i 2 Gy, obtinguts a diferents dies postirradiació. Els asteriscs marquen els increments estadísticament significatius ($P < 0,05$).

Si s'analitza quantes vegades més es presenta una anomalia respecte el control es troben els següents valors: pel què fa a disomies totals s'observa un increment a 28 i 56 dpi a 1 Gy d'1,9 i 1,5 vegades més que el control respectivament, i a 2 Gy hi ha un augment a tots els dies postirradiació, sent molt important a 28 dpi: d'1,6 a 7dpi, 2,4 a 14 dpi, 3,9 a 28 dpi i 2,1 a 56 dpi. Per altra banda, les diploïdies a 1 Gy augmenten a 7, 28 i 56 dpi de 2,2, 5,1, i 2,5 respectivament; i a 2 Gy augmenten a 7, 14, i 28 dpi d'1,7, 2,6 i 9,5 respectivament. Un estudi realitzat per Schmid *et al.* (2001), en el que avaluaven la variabilitat de l'anàlisi de l'aneuploïdia en espermatozoides epididimals entre laboratoris i entre analitzadors va concloure que diferències d'un factor de 2 o inferior entre analitzadors, laboratoris, o entre els grups de tractats i controls s'haurien de prendre amb molta precaució, tot i la significació estadística, fins que les troballes siguin replicades i/o els portaobjectes siguin reanalitzats per una segona persona. D'aquesta manera només podríem confirmar increments de disomies a 2 Gy a 14, 28 i 56 dpi, i increments de diploïdies a 1 Gy a 7, 28 i 56 dpi, i a 2 Gy a 14, i 28 dpi. Aquestes dades concorden amb els nivells de significació trobats amb el test estadístic, excepte per 1 Gy a 7 dpi, en el que el valor de P estava just al límit de significació ($P = 0,0517$).

Considerant que els cromosomes escollits són una representació del genoma, és a dir, no pateixen ni més ni menys anomalies que la resta de cromosomes, es pot fer una estimació de la freqüència de disomia genòmica multiplicant els valors obtinguts de l'estudi dels cromosomes 8 i 14 per 20/2, sent 20 el nombre de cromosomes haploide del ratolí i 2 el nombre de cromosomes que s'han analitzat experimentalment amb les sondes de DNA. Els valors obtinguts es presenten a la taula 4.IV.2.

Taula 4.IV.2. Freqüència genòmica (\pm SEM) de disomia en espermatozoides obtinguts després de 3, 7, 14, 28 i 56 dies postirradiació (dpi) a 1 i 2 Gy de raigs gamma, expressada per 10.000 cèl·lules.

Dosi (Gy)	dpi	Disomia genòmica
0	0	69,7 \pm 0,1
1	3	9,9 \pm 0,0
	7	54,8 \pm 4,9
	14	39,9 \pm 19,9
	28	134,6 \pm 14,9
	56	104,9 \pm 5,0
2	3	74,7 \pm 55,0
	7	114,8 \pm 25,2
	14	169,3 \pm 20,6**
	28	273,5 \pm 25,1***
	56	144,3 \pm 34,9*

* P < 0,05

** P < 0,01

*** P < 0,0001

En resum, l'especial biologia de l'espermatogènesi té conseqüències importants en quan al tipus i la quantitat de defectes genètics induïts en les cèl·lules germinals masculines susceptibles de transmetre's a l'embrió via espermatozoide. Concretament, els nostres resultats indiquen que els estadis més sensibles en quant a la inducció d'aneuploïdies i poliploïdies per la radiació ionitzant són els estadis d'espermatòcit i, en menor mesura, el d'espermatogoni cèl·lula mare.

Discussió

L'anàlisi dels espermatozoides de ratolins irradiats amb raigs gamma a 1 i 2 Gy i sacrificats a diferents dies després d'haver estat irradiats, ens ha permès estudiar la sensibilitat a la inducció d'aneuploïdies de diferents estadis de l'espermatogènesi.

Tenint en compte la durada de cada fase de l'espermatogènesi de ratolí descrita per Oakberg (1956a; 1956b) i Adler (1996) (taula 1.3), els espermatozoides obtinguts de l'epidídim a 3 dpi en el moment de la irradiació es trobaven al mateix lloc, els de 7 dpi estaven també en fase d'espermatozoide però en una localització testicular, els de 14 dpi es trobaven en fase d'espermàtide, els de 28 dpi en fase d'espermatòcit I, concretament a paquitè, i els de 56 dpi es trobaven en fase d'espermatogoni cèl·lula mare.

La segregació incorrecta de cromosomes ha de tenir lloc en el moment que hi hagi una divisió cel·lular, ja sigui mitòtica o meiòtica, per tant, podria tenir lloc en les divisions mitòtiques dels espermatogonis cèl·lules mare i dels espermatogonis en diferenciació, o en les divisions meiòtiques I i II que pateixen els espermatòcits I i II respectivament. Concretament, en els espermatozoides analitzats en aquest estudi, podríem veure l'efecte en els obtinguts a 56 dpi per les divisions mitòtiques i els de 28 dpi per les meiòtiques. Ara bé, els efectes de les radiacions també es poden observar en divisions posteriors, ja sigui perquè han provocat dany al DNA o a proteïnes associades al DNA, o perquè han afectat als mecanismes de control de dany al DNA o de segregació cromosòmica. D'aquesta manera, els efectes de la irradiació dels espermatogonis cèl·lules mare poden incidir en la segregació dels cromosomes de les divisions posteriors, com són les divisions mitòtiques dels espermatogonis en diferenciació i les divisions meiòtiques dels espermatòcits I i II. Igualment passaria amb la irradiació dels espermatòcis I, en els que el seu efecte podria manifestar-se com una mala segregació cromosòmica en la següent divisió meiòtica, és a dir, en la dels espermatòcits II. Per tant, les anomalies cromosòmiques numèriques observades en els espermatozoides es poden haver originat en qualsevol divisió cel·lular intermèdia entre el moment de la irradiació i la cèl·lula subjecte d'estudi.

Els augments de disomies depenen de la dosi d'irradiació, sent superiors a 2 Gy que a 1 Gy, per tant, la radiació ionitzant també té un efecte aneugènic a les cèl·lules germinals. S'han observat increments significatius de disomies en els espermatozoides que les cèl·lules precursors havien estat irradiades en la fase d'espermàtide, espermatòcit I i espermatogoni cèl·lula mare a 2 Gy de raigs gamma, mentre que, tot i

observar-se un lleuger increment en els espermatòcits I irradiats a 1 Gy, no ha arribat al nivell de significació.

Com s'ha esmentat anteriorment, la radiació ionitzant pot afectar la correcta segregació dels cromosomes a nivell de DNA o de proteïnes implicades en la maquinària de segregació. Aquesta explicació és vàlida per interpretar l'increment de disomies en les fases de divisió, però no quan la irradiació ha tingut lloc en la fase d'espermàtide, ja que la cèl·lula no té capacitat de segregar erròniament cromosomes des del moment en el que ha estat irradiada i és analitzada. L'augment observat en aquesta fase podria ser degut a l'efecte clastogènic propi de les radiacions, afectant la regió del DNA que marca la sonda, que resultaria amb dos senyals separats, o bé a disomies prèvies a les radiacions. En l'estadi d'espermàtide tardana es perd la capacitat de reparació del DNA, ja que és quan tenen lloc les etapes finals de reestructuració de la cromatina per compactar-la al màxim, així doncs, podria ser que l'increment de disomia en aquest estadi en realitat fos el resultat de trencaments no reparats en la zona d'hibridació. El tractament de ratolins mascle amb mutàgens durant la finestra postmeiòtica resulta en una sèrie de lesions de l'espermatozoide, incloent trencaments de la cadena de DNA, adductes de DNA, i adductes de protamines (Sega *et al.*, 1989; Sega, 1991). Amb la reduïda capacitat de reparació durant la postmeiosi tardana, aquestes lesions es poden acumular i transmetre al zigot, on tenen el potencial de convertir-se en alteracions cromosòmiques estructurals si es reparen de forma incorrecta. Estudis de temps-resposta (Albanese, 1987; Matsuda *et al.*, 1989a; Matsuda *et al.*, 1989b; Marchetti *et al.*, 2001; Marchetti *et al.*, 2004; Tusell *et al.*, 2004) mostren que els patrons de sensibilitat per a la inducció d'anomalies cromosòmiques transmeses via paterna se solapen amb els patrons de sensibilitat de la letalitat dominant: és a dir, les freqüències d'anomalies cromosòmiques estructurals més elevades es troben després de l'exposició de les cèl·lules germinals postmeiòtiques, i molt pocs mutàgens indueixen increments significatius després del tractament de les cèl·lules germinals meiòtiques o espermatogonis.

Els mecanismes que podrien originar disomia a la meiosi serien aquells implicats en la separació dels cromosomes homòlegs a l'anafase de la primera divisió meiòtica o bé les cromàtides germanes a l'anafase de la

segona divisió meiòtica. En el primer cas, pot ser que la sinapsi sigui defectuosa i/o que fallin els mecanismes de reparació del DNA, els quals han d'afrontar la reparació dels DSBs generats en la recombinació meiòtica i els induïts per la radiació. En una situació normal s'activaria el punt de control de paquità comportant la mort cel·lular per apoptosi. Ara bé, si aquest punt de control està afeblit aquestes cèl·lules podrien avançar per la meiosi donant espermatòcits II aneuploides. De la mateixa manera si no es degraden les cohesines dels braços o bé es degraden les cohesines de la regió centromèrica a la l'anafase I, els cromosomes homòlegs poden segregat incorrectament, i llavors acabaran donant un espermatòcit II nul·lisòmic i un de disòmic, el qual si la segona divisió té lloc de forma correcta, separant-se les cromàtides germanes, s'obtidran dues espermatides nul·lisòmiques i dues de disòmiques. En el segon cas, el punt clau serien les cohesines centromèriques, ja sigui perquè la maquinària encarregada de degradar-les és defectuosa o bé perquè el gen de les cohesines ha patit una mutació que modifica el punt per on són degradades. Un altre factor que pot afavorir una mala segregació dels cromosomes a les dues divisions meiòtiques seria errors en la unió dels microtúbuls als cinetocors, els quals dirigeixen la migració dels cromosomes cap a pols oposats de la cèl·lula. Així doncs, a la meiosi I els cinetocors de les cromàtides germanes es comporten com una unitat, de manera que hi ha una unió bipolar dels microtúbuls entre cromosomes homòlegs; si els microtúbuls que s'uneixen a les cromàtides germanes ho fan en sentit bipolar i no funciona el punt de control del fus, hi haurà un error en la segregació obtenint un espermatòcit II amb tres cromàtides i el complementari amb una; a la segona divisió meiòtica, en el primer cas es poden separar dues cromàtides i una obtenint-se una espermatide disòmica i una de normal, i en el segon cas s'obtidria una espermatide normal i una de nul·lisòmica. Si l'error de la unió dels microtúbuls té lloc a la segona divisió meiòtica per una unió monopolar als cinetocors de les cromàtides germanes, s'obtidrà una espermatide disòmica i una de nul·lisòmica. Els mecanismes que podrien originar disomies a la mitosi serien equivalents als mencionats per la segona divisió meiòtica però en lloc de tenir un complement cromosòmic haploide seria diploide.

Per altra banda, s'ha observat un increment de les diploïdies en els espermatozoides irradiats a 1 Gy en les fases d'espermatòcit I i espermatogoni cèl·lula mare, i a 2 Gy en espermatòides i espermatòcits I. Aquestes diferències de sensibilitat en diferents estadis de l'espermatogènesi per les dues dosis de raigs gamma podrien ser degudes a la incompatibilitat amb la supervivència cel·lular en el cas de la dosi més alta en espermatogonis mare. La presència de diferències significatives en espermatozoides irradiats a 2 Gy en l'estadi d'espermatòide podria ser deguda a que els animals utilitzats presentessin un nivell de diploïdia intrínsec més elevat o una major freqüència de trencaments en la regió marcada.

La diploïdia es pot originar per un error general en la maquinària de segregació cromosòmica, com també pel bloqueig de la citocinesi per presència de DNA a la regió on es forma l'anell contràctil d'actina i llavors hi ha una regressió d'aquest originant cèl·lules binucleades (Shi i King, 2005). Si degut a la presència d'un nombre alterat de centrosomes es formés un fus multipolar a la següent divisió, les cèl·lules resultants serien aneuploides amb un elevat nombre de segregacions anòmales. Si tenim en compte que s'han marcat dos cromosomes dels vint que componen el genoma haploide del ratolí, i que es va tenir en compte la mida dels espermatozoides per valorar les poliploïdies, no es podria descartar que algun espermatozoide considerat diploide no ho fos realment, sinó que presentés disomies de diversos cromosomes simultàniament, que fes augmentar igualment la mida d'aquesta cèl·lula. De la mateixa manera, la formació d'un fus multipolar podria donar lloc a cèl·lules pseudotriploides, que donaria suport a l'observació dels dos espermatozoides aparentment triploides en el nostre estudi.

Els resultats d'aquest estudi indiquen que l'etapa més sensible a la radiació ionitzant per la inducció d'aneuploïdia és a paquitè, produint un gran nombre d'alteracions tant en la segregació de cromosomes individuals com de tot el complement genòmic. En aquest estadi hi ha dos punts de control del cicle cel·lular: el de dany al DNA o recombinació i el de sinapsi; qualsevol error en les múltiples proteïnes que participen en el procés de reparació/recombinació i sinapsi que comportin un afbliment d'aquest punt de control, faran que les cèl·lules amb anomalies avancin pel cicle cel·lular.

S'ha de tenir en compte que la radiació pot afectar estructures que participen en processos d'etapes posteriors, així doncs, l'efecte que s'observa en la irradiació dels espermatòcits I en l'estadi de paquitè, podria afectar tant la segregació dels cromosomes homòlegs a l'anafase I i com la de les cromàtides germanes a l'anafase II.

Els espermatozoides aneuploides tenen la mateixa eficiència de fecundació que els normals (Ford, 1972; Marchetti *et al.*, 1999). Analitzant embrions de 4-8 cèl·lules provinents de la fecundació d'oòcits amb espermatozoides que havien estat irradiats a 4 Gy de raigs gamma, d'una a sis setmanes prèvies al coit, Mozdarani i Salimi (2006) van observar increments significatius de les anomalies numèriques, sent molt acusats des de la quarta fins a la sisena setmana, que corresponen a la irradiació dels estadis d'espermatòcit I i espermatogonis. Ara bé, l'augment d'anomalies cromosòmiques implica una fertilitat reduïda, perquè la majoria d'embrions no seran viables.

Com es discuteix a Marchetti *et al.* (2004), una implicació de l'estreta coincidència entre les anomalies cromosòmiques en el zigot i la letalitat embrionària postimplantacional és la conclusió que el desenvolupament embrionari avança amb la presència d'anomalies cromosòmiques inestables. La falta de punts de control del cicle cel·lular astringents (Handyside i Delhanty, 1997) i de la resposta apoptòtica (Brison i Schultz, 1997; Hardy *et al.*, 2001) durant aquests estadis de desenvolupament embrionari inicials, així com el fet que durant aquest període del desenvolupament l'embrió viu en gran part dels nutrients i factors acumulats per l'oòcit abans de la fecundació, pot permetre als embrions amb anomalies cromosòmiques inestables sobreviure fins a la implantació. Es pot avançar amb l'especulació que els embrions amb nivells elevats d'anomalies cromosòmiques inestables resultarien en una mort preimplantacional primerenca, mentre que aquells embrions amb poques anomalies cromosòmiques inestables podrien avançar en el desenvolupament abans de morir (Marchetti *et al.*, 2004).

Els resultats obtinguts suggereixen que els raigs gamma no afecten de la mateixa manera els diferents estadis de l'espermatogènesi de ratolí, en quan a la inducció d'anomalies cromosòmiques numèriques presents en els espermatozoides, sent l'espermatòcit I l'estadi més radiosensible, amb increments superiors de diploidies respecte a les aneuploidies. Tot i així,

s'ha de tenir en compte que la irradiació de les cèl·lules germinals pot desencadenar inestabilitat genòmica en les cèl·lules del futur embrió a través de modificacions epigenètiques en el genoma de l'espermatozoide.

5. Discussió

APARICIÓ I PERSISTÈNCIA DE L'ANEUPLOÏDIA RADIOINDUÏDA

L'anàlisi de l'aneuploïdia induïda per la radiació ionitzant en cèl·lules binucleades va mostrar que hi havia una relació dosi-efecte *in vitro* i *in vivo*. Es va observar que majoritàriament s'originava per no disjunció en limfòcits humans irradiats *in vitro* i per pèrdua anafàsica en els limfòcits de ratolí irradiats *in vivo*, amb la particularitat que comportava la pèrdua doble d'un mateix cromosoma deixant els nuclis principals monosòmics. En ratolins, l'aparició de cèl·lules binucleades amb un MN amb doble senyal i els nuclis principals monosòmics pel cromosoma implicat en la pèrdua anafàsica comportarà que, en una situació sense bloqueig de la citocinesi, aquest MN passi a formar part d'una cèl·lula junt amb qualsevol dels nuclis principals, i llavors sempre s'obtidran cèl·lules trisòmiques i monosòmiques. En el cas que el MN degeneri, les cèl·lules esdevindran monosòmiques.

Els motius que podrien explicar l'aparició de MN amb senyal doble en ratolí però no en humans podrien ser degudes, entre d'altres coses, al fet de ser espècies diferents, que la irradiació hagi tingut lloc *in vitro* o *in vivo* i/o a la diferent arquitectura dels cromosomes. Els cromosomes de ratolí i els dels humans difereixen en la seva morfologia, sent tots acrocèntrics els de ratolí i en humans trobem cromosomes metacèntrics, submetacèntrics i acrocèntrics. Els cromosomes utilitzats per l'anàlisi d'aneuploïdia en limfòcits humans van ser tots ells submetacèntrics (4, 7 i 18) mentre que els de ratolí, com ja s'ha dit, eren acrocèntrics (8 i 14). El fet de trobar micronuclis majoritàriament amb un senyal doble pel mateix cromosoma només en els cromosomes de ratolí fa pensar que la radiació ionitzant podria incidir de manera preferent en els braços p dels cromosomes acrocèntrics, i que en el cas que no es reparés abans de la replicació del DNA, un cop tenim dues cromàtides germanes es podrien unir entre elles per formar un isodicèntric fet que podria estar facilitat per la proximitat entre els extrems trencats de les cromàtides germanes. Un isodicèntric pot presentar dificultats mecàniques a l'hora de segregar els cromosomes a l'anafase, de manera que podria acabar formant un MN (figura 5.1.a i b). Una possible comprovació que la inclusió de dos cromosomes acrocèntrics en un MN degut a la reparació postreplicativa dels braços p, amb la formació d'un isodicèntric, és deguda simplement a la morfologia del

cromosoma, seria fer el mateix estudi analitzant cromosomes acrocèntrics humans (13, 14, 15, 21 o 22).

Per conèixer quin seria el contingut dels micronuclis amb doble senyal es van analitzar les metafases d'animals irradiats *in vivo*. Es van analitzar les metafases d'esplenòcits d'animals irradiats a 2 Gy i es va comprovar la presència de telòmers en els extrems dels cromosomes i en els fragments cromosòmics i posteriorment es van identificar amb les dues sondes específiques pels cromosomes 8 i 14. Les diferents situacions que podrien acabar donant micronuclis amb doble senyal pel mateix cromosoma són les representades a la figura 5.1.

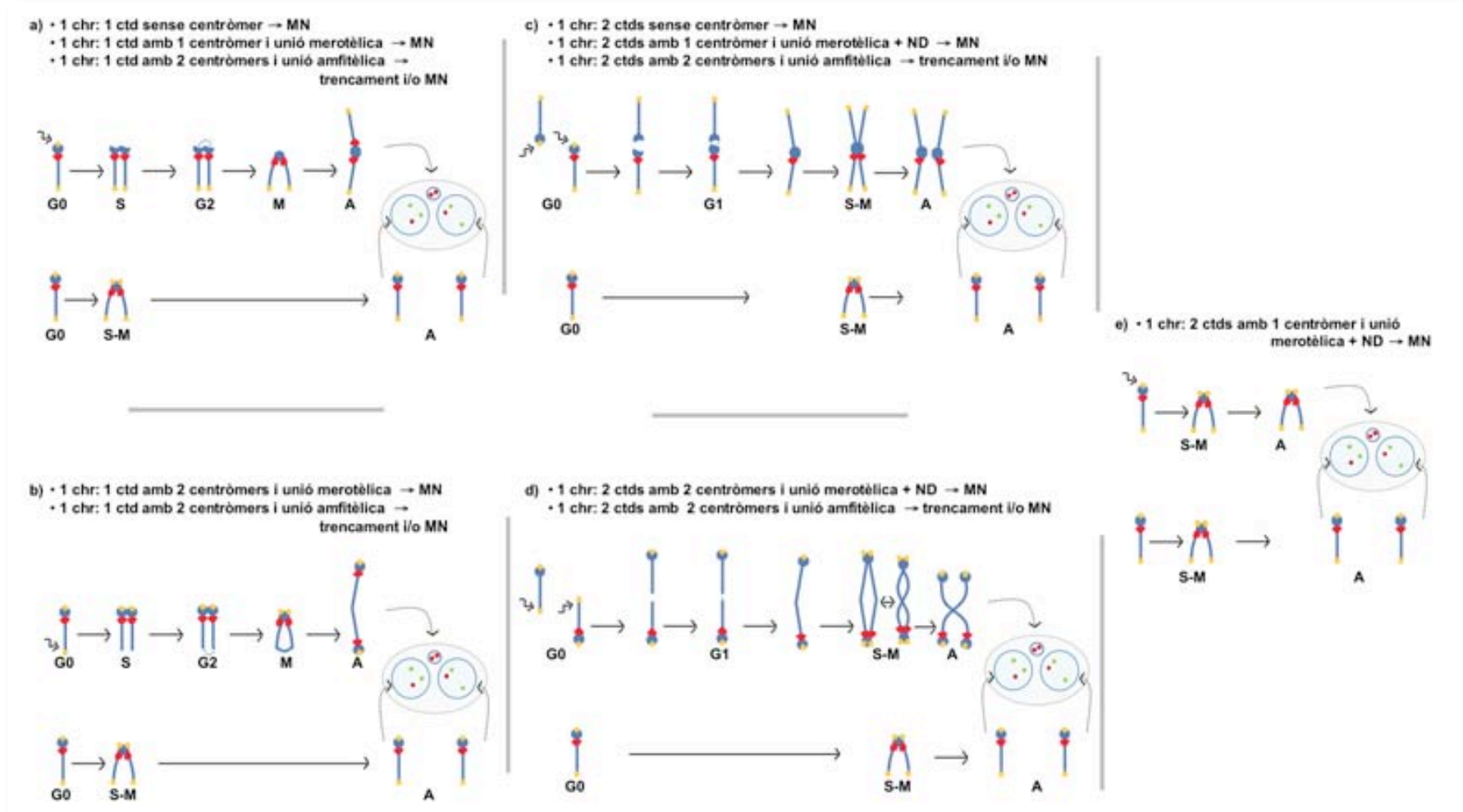


Figura 5.1. Mecanismes que poden originar micronuclis amb doble senyal per un mateix cromosoma. Reparació postreplicativa d'un trencament mitjançant la unió de les dues cromàtides germanes: a) trencament en el braç p; b) trencament en el braç q. Reparació prereplicativa de dos trencaments en cromosomes diferents (un d'ells marcat) mitjançant la seva unió: c) trencaments en el braç p; d) trencaments en el braç q. e) Afectació de la regió centromèrica causant una no disjunció seguida d'una pèrdua anafàsica. A la part de baix de les cinc figures està representat el comportament de l'homòleg del cromosoma marcat (en c) i d) no s'ha dibuixat l'homòleg del cromosoma no marcat). A la part de dalt de la figura s'indica el nombre de cromosomes i de cromàtides implicats en la formació d'un MN C2+, i el tipus d'unió dels microtúbuls als centròmers d'una mateixa cromàtide. chr: cromosoma; ctd: cromàtide; MN: micronuclis; ND: no disjunció; G0, G1, S, G2: fases G0, G1, S i G2 respectivament; M:metafase; A: anafase.

En aquest estudi, tot i que es va observar una freqüència més elevada de cromosomes tp- que tq- (taula 4.III.6), el que facilitaria la formació de cromosomes isodicèntrics amb morfologia de metacèntric (figura 5.1.a), la freqüència d'isodicèntrics per algun dels dos cromosomes analitzats va ser nul·la, mentre que la de metacèntrics amb implicació d'un sol cromosoma marcat (figura 5.1.c) va ser força elevada. La mateixa situació es va trobar pels isodicèntrics formats a partir de la unió dels braços q (figura 5.1.b), dels que no se'n va observar cap, però sí dicèntrics formats per la unió de dos cromosomes tq-, estan un d'ells marcat (figura 5.1.d). Analitzant les metafases de la primera divisió postirradiació, no es poden diferenciar les cromàtides isodicèntriques i un cromosoma que no ha reparat els trencaments terminals ja que les cromàtides es mantenen unides per les cohesines, i no serà fins l'anafase quan es podrà veure que les dues cromàtides romandran unides formant part d'una única molècula de DNA o bé que se separen. En el cas dels isodicèntrics per unió dels braços p, en funció d'on hagi tingut lloc el trencament, pot ser que el cromosoma acabi sense un centròmer funcional, que en mantingui un o bé que en presenti dos. En el cas que no tingui un centròmer funcional, llavors serà un fragment acèntric, no s'hi podran unir els microtúbuls i es perdrà probablement en forma de MN amb doble senyal. Si presenta un centròmer funcional, en el cas que hi hagi una unió merotèlica dels microtúbuls (en la que en un cinetocor s'hi uneixen microtúbuls procedents dels dos pols del fus), no s'activarà el punt de control del fus i el cromosoma es perdrà en forma de MN. I si hi ha dos centròmers funcionals, l'única situació en que és un isodicèntric de debò, i la unió és amfitèlica (en cada cinetocor s'uneixen microtúbuls de pols oposats) l'isodicèntric acabarà trencant-se i els fragments aniran a parar a un MN o tot ell al MN. En el cas dels isodicèntrics per unió de braços q, hi hauran dos centròmers funcionals i pot ser que es trenqui o vagi a parar a un MN, per processos similars als descrits pels isodicèntrics originats per la unió dels braços p. En el cas de la formació de cromosomes en forma de metacèntric o dicèntric de braços q per la unió prereplicativa de dos cromosomes (figura 5.1 c i d), el comportament és equivalent al descrit per les cromàtides isodicèntriques, però afegint que en la situació de les unions merotèliques dels microtúbuls ha de tenir lloc al mateix temps una no disjunció de les cromàtides germanes.

A més a més de les anomalies cromosòmiques estructurals com a causants de l'aparició de MN amb doble senyal, una no disjunció de les cromàtides germanes junt amb una unió merotèlica dels microtúbuls pot comportar la pèrdua anafàsica de les dues cromàtides de forma íntegra (figura 5.1.e). En l'anàlisi de metafases, a la primera divisió postirradiació, el nombre de cromosomes no variaria. En el nostre estudi, el fet de no haver posat BrdU en el cultiu, no ens va permetre assegurar l'anàlisi de només primeres divisions postirradiació, i tot i que la majoria haurien de ser-ho, l'observació d'un increment d'aneuploïdies respecte les metafases de l'animal control, ens indica que vam analitzar també segones divisions, i ahora ens confirma que durant la primera divisió hi van haver malsegregacions cromosòmiques induïdes per la radiació.

Una altra diferència important entre els resultats dels dos estudis va ser que en els limfòcits humans irradiats *in vitro* es van observar ponts nucleoplasmàtics en les cèl·lules irradiades mentre que en els esplenòcits de ratolí irradiats *in vivo* no se'n va observar cap. Aquesta diferència, junt amb la presència de MN amb doble senyal en el cas dels limfòcits binucleats de ratolí, podria indicar un diferent comportament en quan a la formació d'anomalies cromosòmiques induïdes pels raigs gamma espècie-específic i/o a diferències en l'astringència dels punts de control del cicle cel·lular d'aquestes dues espècies. A més a més, el diferent tipus d'exposició a la radiació ionitzant en ambdós estudis, és a dir, *in vitro* o *in vivo*, també podria contribuir a explicar les diferències observades. En aquest sentit, Fenech *et al.* (1991) van trobar que els limfòcits de la sang perifèrica de ratolins són més radiosensibles quan són irradiats *in vitro* que *in vivo*. Per tant, podrien haver importants factors radioprotectors *in vivo*. Si aquestes diferències de sensibilitat a l'exposició *in vitro* i *in vivo* trobades en ratolí reflecteixen la situació en humans, llavors la resposta a la dosi de raigs gamma observada en els limfòcits humans irradiats *in vitro* sobreestima el què passaria en una irradiació *in vivo*. A més a més, també s'ha demostrat que els limfòcits de la melsa de ratolins són més sensibles als efectes citogenètics de la radiació ionitzant que els limfòcits de la sang perifèrica quan s'irradien *in vivo* (Fenech *et al.*, 1991) o quan s'exposen a la etilnitrosourea (Tucker *et al.*, 1986). Això suggereix que els limfòcits de la melsa podrien ser deficientes en reparació comparat amb els limfòcits de la

sang perifèrica. No obstant, una altra explicació alternativa podrien ser factors com a) les diferències en el nivell d'antioxidants a la melsa i la sang perifèrica, i b) l'elevada radiosensibilitat dels limfòcits de la melsa degut a que alguns poden estar en fase S en el moment de la irradiació. La freqüència basal de MN també suggereix un nivell d'inestabilitat genètica superior en els esplenòcits que en els limfòcits de la sang perifèrica (Fenech *et al.*, 1991).

En el nostre estudi s'ha observat que la freqüència d'aneuploidia es manté elevada després de varis dies d'haver irradiat als animals, el mateix que van observar Hande *et al.* (1997) utilitzant sondes de DNA per dos transgens localitzats en els braços llargs de tres cromosomes, però tant els mecanismes que l'originen com la magnitud trobada són diferents en els dos estudis. En l'estudi de Hande *et al.* (1997) majoritàriament s'origina per no disjunció i els valors d'aneuploidia són molt més elevats, mentre que en el nostre estudi pràcticament l'únic mecanisme implicat és la pèrdua anafàsica, la qual podria haver-se donat després d'una no disjunció prèvia. A més a més, si se sumen els valors de segregació errònia dels dos cromosomes marcats, és a dir, la no disjunció i la pèrdua anafàsica, no s'arriba als valors obtinguts per pèrdua anafàsica de l'estudi de Hande *et al.* (1997). Aquestes diferències podrien ser originades per diferents motius: a) la utilització de diferents soques de ratolí; b) per l'anàlisi de femelles en el seu estudi i mascles en el nostre; c) per la irradiació amb raigs X i gamma respectivament; d) per la localització de les sondes que van servir per identificar els cromosomes, en l'estudi de Hande *et al.* eren transgens integrats al mig dels braços llargs dels cromosomes 2, 8 i X, i en el nostre estudi les sondes eren seqüències pròpies localitzades just per sota de l'heterocromatina centromèrica dels cromosomes 8 i 14; i e) per la possible segregació anòmala diferencial d'aquests cromosomes. Concretament d'aquest darrer punt, en el nostre estudi vam observar que el cromosoma 8 estava més implicat en la no disjunció que el cromosoma 14, sent aquest el principal mecanisme inductor d'aneuploidia en l'estudi de Hande *et al.*, i si afegim que el cromosoma X freqüentment pateix una segregació anòmala per sobre de la mitjana, podrien ser un dels motius de l'elevada freqüència trobada per Hande *et al.* (1997). De tots aquests motius, el més important probablement és la localització de les sondes, ja que el fet que en l'estudi

de Hande *et al.* es situessin més distalment augmentaria la probabilitat d'haver-hi trencaments entre la regió marcada i el centròmer, fet que implicaria haver valorat efectes aneugènics que en realitat eren resultants de la potent acció clastogènica de la radiació ionitzant.

En el nostre estudi es va observar una freqüència d'aneuploidia lleugerament elevada fins a 28 dies després de la irradiació. S'ha descrit que la vida mitjana dels esplenòcits de ratolí és d'uns 70 dies (Hande *et al.*, 1996a), per tant, part de les anomalies cromosòmiques observades podrien ser degudes a les cèl·lules que es divideixen per primera vegada després de la irradiació. Per altra banda, la disminució de la freqüència de malsegregacions cromosòmiques podria ser resultat de la mort selectiva de les cèl·lules micronucleades i de la dilució d'aquestes degut a la proliferació cel·lular.

Per confirmar la importància dels micronuclis com a indicadors d'anomalies cromosòmiques, un estudi recent fet en cohorts europees (Bonassi *et al.*, 2007) indica que individus que presentaven una freqüència de MN elevada tenen una predisposició a desenvolupar un càncer 12-15 anys després que es fes el test.

CÈL·LULES GERMINALS. PERSISTÈNCIA I RADIOSENSIBILITAT

L'anàlisi dels espermatozoides de ratolins irradiats amb raigs gamma a 1 i 2 Gy i sacrificats a diferents dies després d'haver estat irradiats, ens ha permès estudiar la sensibilitat a la inducció d'aneuploidies de diferents estadis de l'espermatogènesi. L'especial biologia de l'espermatogènesi té conseqüències importants en quan al tipus i la quantitat de defectes genètics induïts en les cèl·lules germinals masculines susceptibles de transmetre's a l'embrió via espermatozoide. Concretament, els nostres resultats indiquen que els estadis més sensibles en quant a la inducció d'aneuploidies i poliploidies per la radiació ionitzant són els estadis d'espermatòcit I, i en menor mesura, el d'espermatogoni cèl·lula mare.

S'ha de tenir en compte, però, que el nostre estudi s'ha realitzat en ratolins i no se sap fins a quin punt aquests resultats es poden extrapolar a humans. Baumgartner *et al.* (2001) van comparar les dades de la FISH en espermatozoides en humans i ratolins, i indicaren que el diazepam era com a mínim 10 vegades més efectiu en la inducció d'aneuploidia en la meiosi

masculina humana que en la de ratolins. Aquesta comparació interespecífica de la sensibilitat relativa caldria que s'estengués a d'altres agents químics o físics per determinar si aquesta diferència és específica del diazepam o bé és més general.

A l'estadi d'espermatòcit I és quan té lloc un dels processos més importants i característics de la meiosi, i és la separació dels cromosomes homòlegs a l'anafase de la primera divisió meiòtica. Per tant, cal que els cromosomes homòlegs es mantinguin units fins a la metafase, i s'aconsegueix mitjançant la recombinació meiòtica, que s'inicia amb dobles trencaments de la molècula de DNA. El mecanisme de reparació d'aquests trencaments és per recombinació homòloga. Si aquestes cèl·lules s'irradien quan té lloc la recombinació, es crearan nous trencaments al DNA que per reparar-los hauran de competir amb els creats en la recombinació meiòtica. Els trencaments induïts per la radiació ionitzant principalment són reparats pel mecanisme d'unió no homòloga dels extrems (NHEJ, *non-homologous end-joining*) i la via de senyalització de l'ATM. S'ha trobat que la proteïna KU70, una proteïna clau en la NHEJ, no s'expressa en espermatòcits (Goedecke *et al.*, 1999; Hamer *et al.*, 2003) i una altra proteïna implicada en la NHEJ, la DNA-PKcs està absent en espermàtides (Hamer *et al.*, 2003). Per altra banda la via de senyalització d'ATM i la γ -H2AX està activa en els espermatòcits humans, ja que s'han de regular els DSBs creats en la recombinació meiòtica. L'anàlisi d'unes altres proteïnes implicades en la reparació dels DSBs induïts per la radiació ionitzant, la MDC1, 53BP1 i la RAD51, ha demostrat que no s'expressen simultàniament en diferents estadis de l'espermatogènesi de ratolí (Ahmed *et al.*, 2007), de manera que en cap estadi es troba el joc complet d'aquestes proteïnes, dificultant i alentint, la reparació dels DSBs en les cèl·lules germinals que podria comportar dificultats en la segregació dels cromosomes homòlegs, ja que són dos processos que estan lligats (Strom i Sjogren, 2007). Tots aquests processos podrien contribuir a la major radiosensibilitat dels espermatòcits I observada en el nostre estudi.

La correcta segregació dels cromosomes a la mitosi i la meiosi ve facilitada per la unió de les cromàtides germanes mitjançant les cohesines i la compactació de la cromatina mediada per les condensines. Una disminució en els nivells d'aquestes proteïnes, ja sigui a nivell de quantitat

o funcionalitat, comportarà errors en la segregació cromosòmica. Per tant, si la radiació ionitzant afecta a la producció o funció d'aquestes proteïnes es veuran afectades les divisions mitòtiques dels espermatogonis i les meiotiques dels espermatòcits. En eucariotes s'han identificat tres complexos formats per proteïnes de manteniment de l'estructura del cromosoma (SMC): la condensina, la cohesina i el complex SMC5/SMC6 (Losada i Hirano, 2005), que són necessaris per diferents aspectes de la segregació cromosòmica i la reparació, contribuint a una connexió funcional entre els dos processos. Les condensines semblen lligar la condensació cromosòmica, i per tant, la segregació, amb la reparació dels trencaments de cadena senzilla (Aono *et al.*, 2002; Heale *et al.*, 2006). Mentre que les cohesines i el complex SMC5/SMC6 estan implicats en la reparació dels DSBs.

A la meiosi tant la formació com l'estabilització de les connexions del DNA requereixen la presència de les cohesines (Klein *et al.*, 1999; Buonomo *et al.*, 2000). La segregació cromosòmica i la recombinació meiotiques també es veuen afectades per mutacions al complex SMC5/SMC6 (Pebernard *et al.*, 2004). A més a més d'aquestes funcions meiotiques, hi ha evidències que indiquen que les cohesines i el complex SMC5/SMC6 també lliguen la segregació i la reparació dels DSBs mitòtiques. En llevats s'ha vist que la inducció de DSBs per la radiació ionitzant comporta el reclutament postreplicatiu de cohesines tant a la regió del DSB com en altres regions del genoma, augmentant la cohesió de les cromàtides germanes (Strom *et al.*, 2004). I també hi ha un reclutament del complex SMC5/SMC6, el qual està implicat en la reparació per recombinació homòloga (Lehmann, 2005). Mentre que mutacions en la cohesina comporten la separació prematura de les cromàtides, l'absència d'un complex SMC5/SMC6 funcional durant la replicació causa un retard en la segregació cromosòmica (Torres-Rosell *et al.*, 2005; Lindroos *et al.*, 2006). Així doncs, si la radiació provoca mutacions als gens de les cohesines o del complex SMC5/SMC6 es veuran afectats tant la reparació dels DSBs, podent originar anomalies estructurals, com la segregació dels cromosomes, resultant amb aneuploïdia o la poliploïdia si el retard en la segregació provoca que no tingui lloc la citocinesi. Al haver molts més DSBs a l'espermatòcit I degut als processos de recombinació meiotica, això podria

explicar la major freqüència d'anomalies cromosòmiques numèriques respecte l'espermatogoni.

La irradiació dels espermatogonis cèl·lules mare pot ocasionar l'aparició d'anomalies cromosòmiques estructurals que es puguin mantenir al llarg de les divisions. Si es mantenen fins a l'estadi d'espermatòcit I podran manifestar dificultats a l'hora d'aparellar-se amb els seus cromosomes homòlegs i separar-se a l'anafase I. En ratolins heterozigots portadors de quatre translocacions Robertsonianes es van observar anomalies en l'aparellament a la profase i la metafase dels espermatòcits I (Eaker *et al.*, 2001). Tot i el mal aparellament a la profase, algunes cèl·lules van avançar cap a metafase I, per tant, saltant-se el punt de control de paquitè, i també van progressar cap a anafase I, saltant-se doncs el punt de control del fus. No obstant, l'anàlisi citològica va revelar alts nivells d'apoptosi en els espermatòcits a l'estadi de metafase I. El resultat és que es van trobar espermatozoides amb una elevada freqüència d'aneuploïdia, el que demostra que els punts de control no eliminen totalment les cèl·lules germinals amb anomalies cromosòmiques. En el nostre estudi, part de l'aneuploïdia observada en els espermatozoides podria originar-se per la dificultat de l'aparellament dels cromosomes metacèntrics amb centròmer a l'espermatòcit I resultants de la irradiació dels espermatogonis mare.

La major sensibilitat a la inducció d'aneuploïdia pels raigs gamma de l'espermatòcit I davant l'espermatogoni cèl·lula mare també podria ser deguda a un mecanisme de mort cel·lular programada més eficient en els espermatogonis.

Defectes genètics que es poden transmetre a la descendència

Els nostres resultats indiquen que, tot i els mecanismes de reparació, punts de control del cicle cel·lular i mort cel·lular programada de que disposen les cèl·lules per evitar la formació de cèl·lules amb mutacions, la irradiació de diferents estadis de les cèl·lules germinals comporta la formació d'espermatozoides portadors d'anomalies cromosòmiques que podrien ser transmeses a la descendència. Si bé ens hem centrat en les anomalies numèriques, s'ha de tenir en compte que també es van observar increments a nivell d'espermàtide que serien el resultat del trencament del DNA a la regió marcada per la sonda, i de la mateixa manera, part de la

disomia observada en els altres estadis també seran deguts al l'efecte clastogènic de la radiació ionitzant.

El risc de transmetre via paterna defectes genètics està influenciat per un nombre de factors, com una fisiologia reproductiva anormal del mascle, factors genètics predisposants (Hassold i Hunt, 2001), exposicions ambientals passades i presents, o errors a l'atzar durant la producció dels espermatozoides (Crow, 2000). Tal i com s'ha vist a la introducció, hi ha diferents tipus de defectes genètics que es poden transmetre via espermatozoide (taula 1.1). Aneuploïdies completes i parcials presents en els espermatozoides poden resultar en trisomies completes o parcials a l'embrió, respectivament (Hassold i Hunt, 2001). Els trencaments del DNA i les lesions premutacionals poden originar-se espontàniament, i poden ser induïdes per l'exposició a agents mutagènics. Les variacions en la llargada de les repeticions de trinucleòtids semblen ser induïbles en cèl·lules germinals masculines després de l'exposició a les radiacions ionitzants (Dubrova *et al.*, 1996; Dubrova *et al.*, 2000; Barber *et al.*, 2002) o pol·lució ambiental (Somers *et al.*, 2002; Somers *et al.*, 2004). Els espermatozoides que porten defectes en els perfils d'impressió genòmica poden alterar l'expressió de gens paterns durant moments crítics del desenvolupament, resultant en un desenvolupament anòmal o algun defecte (Doerksen i Trasler, 1996). La probabilitat que cadascun d'aquests defectes sigui induït depèn de la biologia específica de l'estadi en el que es trobi la cèl·lula germinal.

Estudis de la primera divisió embrionària revisats per Marchetti i Wyrobek l'any 2005, han mostrat que: 1) la majoria d'anomalies cromosòmiques induïdes després de l'exposició paterna a mutàgens són representades per anomalies del tipus cromosoma com dicèntrics i fragments acèntrics; 2) la quantitat més elevada de dany cromosòmic es troba després de l'exposició de les cèl·lules germinals postmeiòtiques, el què està en acord amb els estudis tradicionals de creuaments (*breeding*); 3) a les dosis més elevades quasi tots els zigots tenen anomalies cromosòmiques d'origen patern suggerint que la presència d'un elevat nombre de lesions en el DNA no afecta la capacitat fecundant de l'espermatozoide; i 4) els estudis utilitzant l'anàlisi de PAINT/DAPI van mostrar que diferents mutàgens tenen diferents proporcions d'anomalies

estables i inestables, el què podria explicar els resultats diferents obtinguts amb els test DL (dominant letal: mesura la inducció d'anomalies cromosòmiques inestables que comporten la mort embrionària de la descendència dels mascles tractats) i HT (translocacions heretables: mesura la inducció de translocacions recíproques en la descendència dels mascles tractats). A més a més de totes aquestes anomalies presents al zigot degut a defectes en la reparació o a la formació d'anomalies cromosòmiques estructurals en les cèl·lules germinals masculines, també s'ha observat que espermatozoides amb alteracions cromosòmiques numèriques (trisomies) podien fecundar oòcits i avançar normalment fins a la implantació, moment en el qual hi haurien mecanismes que avortaran el posterior desenvolupament de l'embrió (Davisson *et al.*, 2007). I finalment, s'ha de tenir en compte que la irradiació de les cèl·lules germinals pot desencadenar inestabilitat genòmica en les cèl·lules del futur embrió a través de modificacions epigenètiques en el genoma de l'espermatozoide.

La integritat genòmica és crucial per la supervivència de les cèl·lules, i han sorgit tres mecanismes per mantenir el genoma. La reparació del DNA opera en el genoma danyat per restaurar la integritat original de la seva seqüència. Els punts de control del cycle cel·lular asseguren l'eliminació eficient d'errors durant la replicació del DNA i la segregació cromosòmica. L'apoptosi és la manera més efectiva, però l'última, d'eliminar les cèl·lules potencialment defectuoses que porten el DNA danyat. La informació genòmica es transmet correctament sota la supervisió d'aquests tres mecanismes, i una fallada d'algun d'ells dona lloc a resultats devastadors com la carcinogènesi en la generació afectada i problemes hereditaris en les següents generacions. La fidelitat, però, és cara, i el mecanisme de tolerància del dany permet sobreviure i proliferar a les cèl·lules defectuoses amb el cost de possibles mutacions (Radman, 2001). Així doncs, la inestabilitat genòmica induïda es pot veure com el mecanisme de tolerància al dany en el que la fidelitat del manteniment del genoma és persistentment inhibida en les cèl·lules irradiades (Niwa, 2003).

Tot i que els canvis en l'expressió genètica després de l'exposició a radiacions ionitzants són transitoris, l'expressió d'alguns gens podrien quedar permanentment alterats a través de mecanismes epigenètics (Reik i Dean, 2001; Watson i Goodman, 2002; Feinberg, 2004). L'epigenètica es

creu que juga un paper en la inestabilitat genòmica i podria jugar un paper en els efectes transgeneracionals heretables que s'han observat. Alteracions en els patrons de metilació poden influenciar l'expressió gènica i s'ha vist que són capaços de sobreviure a la reprogramació del genoma que té lloc durant la meiosi (Roemer *et al.*, 1997; Watson i Goodman, 2002). A més a més, s'han observat metilacions del DNA *de novo* o alteracions del patró de metilació després de l'exposició a les radiacions ionitzants (Hardwick *et al.*, 1989; Holliday, 1991; Issa *et al.*, 1996; MacLeod, 1996; Klein i Costa, 1997; Kovalchuk *et al.*, 2004; Pogribny *et al.*, 2004).

Els resultats de Baulch i Raabe (2005) conjuntament amb els d'altres suggereixen que la irradiació inicial paterna és capaç d'induir canvis basats en el DNA i poden ser transmesos a través de com a mínim quatre generacions. S'ha suggerit que la inestabilitat genòmica radioinduïda és un pas cel·lular primerenc en el procés esglaonat que resulta en la carcinogènesi radioinduïda (Doll i Peto, 1981; Ullrich i Ponnaiya, 1998).

6. Conclusions

"A conclusion is the place where you give up thinking"

Arthur Bloch

1. El present estudi demostra que es pot obtenir informació citogenètica d'anomalies cromosòmiques estructurals i numèriques utilitzant la FISH amb sondes centromèriques específiques de cromosoma. L'ús d'aquest tipus d'estratègia permet l'avaluació simultània de la no disjunció i la pèrdua anafàsica, i la informació obtinguda és més acurada que no utilitzant sondes pancentromèriques, perquè s'eviten possibles errors derivats del recompte de trencaments dins de la regió marcada.

2. La radiació ionitzant, encara que principalment clastogènica, també indueix, amb una clara relació dosi-efecte, la pèrdua o guany de cromosomes sencers.

3. Els nostres resultats indiquen que el principal mecanisme generador d'aneuploidia per la radiació ionitzant en limfòcits humans irradiats *in vitro* és la no disjunció.

4. La radiació ionitzant també és inductora d'aneuploidia *in vivo*, sent la pèrdua anafàsica el principal mecanisme implicat en la inducció d'aneuploidies. Aquestes es manifesten majoritàriament amb la presència de senyals dobles pel mateix cromosoma en cada micronucli. La freqüència d'aneuploidies va disminuint a mesura que augmenta el temps transcorregut des del moment de la irradiació fins arribar a valors basals.

5. Amb les dades obtingudes de l'estudi de metafases d'esplenòcits d'animals irradiats *in vivo* es pot concloure que l'aneuploidia induïda pels raigs gamma és principalment primària, és a dir, originada per la pèrdua o guany de cromosomes sencers. També hi ha una part d'aneuploidia secundària deguda a la segregació d'alteracions cromosòmiques estructurals inestables.

6. Els raigs gamma no afecten de la mateixa manera els diferents estadis de l'espermatogènesi de ratolí. Quan es valora la inducció d'anomalies cromosòmiques numèriques presents en els espermatozoides, l'estadi d'espermatòcit I, concretament a paquitè, és el que resulta més radiosensible.

7. Bibliografia

- Abrieu, A., Kahana, J.A., Wood, K.W. i Cleveland, D.W. (2000). CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro. *Cell* **102**(6): 817-26.
- Abrieu, A., Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J.A., Peter, M., Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T., Cleveland, D.W. i Labbe, J.C. (2001). Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* **106**(1): 83-93.
- Adler, I.D. (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutat Res* **352**(1-2): 169-72.
- Ahmed, E.A., van der Vaart, A., Barten, A., Kal, H.B., Chen, J., Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Bartkova, J., Bartek, J., de Boer, P. i de Rooij, D.G. (2007). Differences in DNA double strand breaks repair in male germ cell types: lessons learned from a differential expression of Mdc1 and 53BP1. *DNA Repair (Amst)* **6**(9): 1243-54.
- Albanese, R. (1987). Mammalian male germ cell cytogenetics. *Mutagenesis* **2**(2): 79-85.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. i Walter, P. (2004). *Biología molecular de la célula*, Omega.
- Almasy, Z., Krepinsky, A.B., Bianco, A. i Koteles, G.J. (1987). The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Int J Rad Appl Instrum [A]* **38**(4): 241-9.
- Aono, N., Sutani, T., Tomonaga, T., Mochida, S. i Yanagida, M. (2002). Cnd2 has dual roles in mitotic condensation and interphase. *Nature* **417**(6885): 197-202.
- Ashley, T., Gaeth, A.P., Creemers, L.B., Hack, A.M. i de Rooij, D.G. (2004). Correlation of meiotic events in testis sections and microspreads of mouse spermatocytes relative to the mid-pachytene checkpoint. *Chromosoma* **113**(3): 126-36.
- Balases, A.N. i Ali, A.S. (1991). Establishment of dose-response relationships between doses of Cs-137 gamma-rays and frequencies of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res* **259**(2): 133-8.
- Barber, R., Plumb, M.A., Boulton, E., Roux, I. i Dubrova, Y.E. (2002). Elevated mutation rates in the germ line of first- and second-generation offspring of irradiated male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10): 6877-82.
- Barquinero, J.F., Barrios, L., Caballín, M.R., Miró, R., Ribas, M., Subias, A. i Egozcue, J. (1995). Establishment and validation of a dose-effect curve for gamma-rays by cytogenetic analysis. *Mutat Res* **326**(1): 65-9.
- Baulch, J.E. i Raabe, O.G. (2005). Gamma irradiation of Type B spermatogonia leads to heritable genomic instability in four generations of mice. *Mutagenesis* **20**(5): 337-43.
- Baumgartner, A., Schmid, T.E., Schuetz, C.G. i Adler, I.D. (2001). Detection of aneuploidy in rodent and human sperm by multicolor FISH after chronic exposure to diazepam. *Mutat Res* **490**(1): 11-9.
- Becker, W.M., Kleinsmith, L.J. i Hardin, J. (2007). *El mundo de la célula*. Madrid, Pearson Educación.
- Beninson, D., Lloyd, D.C., Natarajan, A.T., Obe, G., Preston, R.J. i Sasaki, M.S. (1986). Biological dosimetry: chromosomal aberrations analysis for dose assessment. *Technical Reports Series*. Vienna, IAEA.

- Bergerat, A., de Massy, B., Gabelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, A. i Forterre, P. (1997). An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386**(6623): 414-7.
- Bhalla, N. i Dernburg, A.F. (2005). A conserved checkpoint monitors meiotic chromosome synapsis in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **310**(5754): 1683-6.
- Biggins, S. i Murray, A.W. (2001). The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev* **15**(23): 3118-29.
- Boei, J.J. i Natarajan, A.T. (1996). Classification of X-ray-induced Robertsonian fusion-like configurations in mouse splenocytes. *Int J Radiat Biol* **69**(4): 421-7.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H. i Fenech, M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* **28**(3): 625-31.
- Borde, V., Goldman, A.S. i Lichten, M. (2000). Direct coupling between meiotic DNA replication and recombination initiation. *Science* **290**(5492): 806-9.
- Braun, R.E. (1998). Post-transcriptional control of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **9**(4): 483-9.
- Brendolan, A., Rosado, M.M., Carsetti, R., Selleri, L. i Dear, T.N. (2007). Development and function of the mammalian spleen. *Bioessays* **29**(2): 166-77.
- Brisson, D.R. i Schultz, R.M. (1997). Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod* **56**(5): 1088-96.
- Broccoli, D., Miller, O.J. i Miller, D.A. (1990). Relationship of mouse minor satellite DNA to centromere activity. *Cytogenet Cell Genet* **54**(3-4): 182-6.
- Buonomo, S.B., Clyne, R.K., Fuchs, J., Loidl, J., Uhlmann, F. i Nasmyth, K. (2000). Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* **103**(3): 387-98.
- Camasses, A., Bogdanova, A., Shevchenko, A. i Zachariae, W. (2003). The CCT chaperonin promotes activation of the anaphase-promoting complex through the generation of functional Cdc20. *Mol Cell* **12**(1): 87-100.
- Carere, A., Antoccia, A., Cimini, D., Crebelli, R., Degrassi, F., Leopardi, P., Marcon, F., Sgura, A., Tanzarella, C. i Zijno, A. (1999). Analysis of chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked lymphocytes of 24 male subjects. *Mutagenesis* **14**(5): 491-6.
- Carter, S.B. (1967). Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature* **213**(5073): 261-4.
- Cervantes, M.D., Farah, J.A. i Smith, G.R. (2000). Meiotic DNA breaks associated with recombination in *S. pombe*. *Mol Cell* **5**(5): 883-8.
- Cimini, D., Howell, B., Maddox, P., Khodjakov, A., Degrassi, F. i Salmon, E.D. (2001). Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism

- of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J Cell Biol* **153**(3): 517-27.
- Clermont, Y., Leblond, C.P. i Messier, B. (1959). [Duration of the cycle of the seminal epithelium of the rat.]. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* **48(Suppl)**: 37-55.
- Cleveland, D.W., Mao, Y. i Sullivan, K.F. (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* **112**(4): 407-21.
- Cohen, P.E. i Pollard, J.W. (2001). Regulation of meiotic recombination and prophase I progression in mammals. *Bioessays* **23**(11): 996-1009.
- Cornforth, M.N. i Goodwin, E.H. (1991). Transmission of radiation-induced acentric chromosomal fragments to micronuclei in normal human fibroblasts. *Radiat Res* **126**(2): 210-7.
- Crisp, T.M. (1992). Organization of the ovarian follicle and events in its biology: oogenesis, ovulation or atresia. *Mutat Res* **296**(1-2): 89-106.
- Crow, J.F. (2000). The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat Rev Genet* **1**(1): 40-7.
- Chan, G.K., Jablonski, S.A., Starr, D.A., Goldberg, M.L. i Yen, T.J. (2000). Human Zw10 and ROD are mitotic checkpoint proteins that bind to kinetochores. *Nat Cell Biol* **2**(12): 944-7.
- Chan, G.K., Jablonski, S.A., Sudakin, V., Hittle, J.C. i Yen, T.J. (1999). Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J Cell Biol* **146**(5): 941-54.
- Chandley, A.C. (1991). On the parental origin of de novo mutation in man. *J Med Genet* **28**(4): 217-23.
- Chen, R.H. (2004). Phosphorylation and activation of Bub1 on unattached chromosomes facilitate the spindle checkpoint. *Embo J* **23**(15): 3113-21.
- Davisson, M., Akeson, E., Schmidt, C., Harris, B., Farley, J. i Handel, M.A. (2007). Impact of trisomy on fertility and meiosis in male mice. *Hum Reprod* **22**(2): 468-76.
- De Antoni, A., Pearson, C.G., Cimini, D., Canman, J.C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E.D. i Musacchio, A. (2005). The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* **15**(3): 214-25.
- de Kretser, D.M., Loveland, K.L., Meinhardt, A., Simorangkir, D. i Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Hum Reprod* **13 Suppl 1**: 1-8.
- Decordier, I., Dillen, L., Cundari, E. i Kirsch-Volders, M. (2002). Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. *Mutagenesis* **17**(4): 337-44.
- Degrassi, F. i Tanzarella, C. (1988). Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy. *Mutat Res* **203**(5): 339-45.
- Dewar, H., Tanaka, K., Nasmyth, K. i Tanaka, T.U. (2004). Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle. *Nature* **428**(6978): 93-7.
- Di Giacomo, M., Barchi, M., Baudat, F., Edelmann, W., Keeney, S. i Jasin, M. (2005). Distinct DNA-damage-dependent and -independent responses drive the loss of oocytes in recombination-defective mouse mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3): 737-42.

- Ditchfield, C., Johnson, V.L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N. i Taylor, S.S. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol* **161**(2): 267-80.
- Doerksen, T. i Trasler, J.M. (1996). Developmental exposure of male germ cells to 5-azacytidine results in abnormal preimplantation development in rats. *Biol Reprod* **55**(5): 1155-62.
- Doll, R. i Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* **66**(6): 1191-308.
- Dowd, S. i Tilson, E. (1999). Practical Radiation Protection and Applied Radiotherapy. Saunders. Philadelphia: 118-120.
- Dubrova, Y.E., Nesterov, V.N., Krouchinsky, N.G., Ostapenko, V.A., Neumann, R., Neil, D.L. i Jeffreys, A.J. (1996). Human minisatellite mutation rate after the Chernobyl accident. *Nature* **380**(6576): 683-6.
- Dubrova, Y.E., Plumb, M., Gutierrez, B., Boulton, E. i Jeffreys, A.J. (2000). Transgenerational mutation by radiation. *Nature* **405**(6782): 37.
- Duesberg, P., Fabarius, A. i Hehlmann, R. (2004). Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells. *IUBMB Life* **56**(2): 65-81.
- Duesberg, P. i Li, R. (2003). Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle* **2**(3): 202-10.
- Eaker, S., Pyle, A., Cobb, J. i Handel, M.A. (2001). Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci* **114**(Pt 16): 2953-65.
- Eastmond, D.A. i Tucker, J.D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen* **13**(1): 34-43.
- Eddy, E.M. i O'Brien, D.A. (1998). Gene expression during mammalian meiosis. *Curr Top Dev Biol* **37**: 141-200.
- Eijpe, M., Heyting, C., Gross, B. i Jessberger, R. (2000a). Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J Cell Sci* **113** (Pt 4): 673-82.
- Eijpe, M., Offenber, H., Goedecke, W. i Heyting, C. (2000b). Localisation of RAD50 and MRE11 in spermatocyte nuclei of mouse and rat. *Chromosoma* **109**(1-2): 123-32.
- Eijpe, M., Offenber, H., Jessberger, R., Revenkova, E. i Heyting, C. (2003). Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J Cell Biol* **160**(5): 657-70.
- Fang, G. (2002). Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex. *Mol Biol Cell* **13**(3): 755-66.
- Fang, G., Yu, H. i Kirschner, M.W. (1998). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev* **12**(12): 1871-83.
- Feinberg, A.P. (2004). The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol* **14**(6): 427-32.

- Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.*(285): 35-44.
- Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res* **392**(1-2): 11-8.
- Fenech, M. (2000a). A mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division. *Mutagenesis* **15**(4): 329-36.
- Fenech, M. (2000b). The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* **455**(1-2): 81-95.
- Fenech, M. (2002). Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov Today* **7**(22): 1128-37.
- Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* **600**(1-2): 58-66.
- Fenech, M. i Morley, A.A. (1985a). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* **147**(1-2): 29-36.
- Fenech, M. i Morley, A.A. (1985b). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* **43**(172-173): 233-46.
- Fenech, M. i Morley, A.A. (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat Res* **161**(2): 193-8.
- Fenech, M. i Morley, A.A. (1989). Kinetochores detection in micronuclei: an alternative method for measuring chromosome loss. *Mutagenesis* **4**(2): 98-104.
- Fenech, M.F., Dunaiski, V., Osborne, Y. i Morley, A.A. (1991). The cytokinesis-block micronucleus assay as a biological dosimeter in spleen and peripheral blood lymphocytes of the mouse following acute whole-body irradiation. *Mutat Res* **263**(2): 119-26.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M. i Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 959-67.
- Ford, C. (1972). *Gross genome unbalance in mouse spermatozoa: does it influence the capacity to fertilize?* Edinburgh symposium on the genetics of the spermatozoon, University of Edinburgh, Scotland, August 16-20, 1971, Edinburgh: Department of Genetics, University of Edinburgh.
- Garagna, S., Broccoli, D., Redi, C.A., Searle, J.B., Cooke, H.J. i Capanna, E. (1995). Robertsonian metacentrics of the house mouse lose telomeric sequences but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area. *Chromosoma* **103**(10): 685-92.
- Gardner, R.D. i Burke, D.J. (2000). The spindle checkpoint: two transitions, two pathways. *Trends Cell Biol* **10**(4): 154-8.
- Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A.J., Ruchaud, S., Hudson, D.F., Honda, R., Nigg, E.A., Gerloff, D.L. i Earnshaw, W.C. (2004). Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol* **166**(2): 179-91.
- Gatti, J.L., Castella, S., Dacheux, F., Ecroyd, H., Metayer, S., Thimon, V. i Dacheux, J.L. (2004). Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci* **82-83**: 321-39.

- Geijsen, N., Horoschak, M., Kim, K., Gribnau, J., Eggan, K. i Daley, G.Q. (2004). Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* **427**(6970): 148-54.
- Gerton, J.L. i Hawley, R.S. (2005). Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nat Rev Genet* **6**(6): 477-87.
- Ghabrial, A. i Schupbach, T. (1999). Activation of a meiotic checkpoint regulates translation of Gurken during *Drosophila* oogenesis. *Nat Cell Biol* **1**(6): 354-7.
- Gilbert, S.F. (1988). *Biología del Desarrollo*. Barcelona, Omega.
- Goedecke, W., Eijpe, M., Offenberg, H.H., van Aalderen, M. i Heyting, C. (1999). Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis. *Nat Genet* **23**(2): 194-8.
- Grootegeod, J.A., Siep, M. i Baarends, W.M. (2000). Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **14**(3): 331-43.
- Gruber, S., Haering, C.H. i Nasmyth, K. (2003). Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* **112**(6): 765-77.
- Habu, T., Kim, S.H., Weinstein, J. i Matsumoto, T. (2002). Identification of a MAD2-binding protein, CMT2, and its role in mitosis. *Embo J* **21**(23): 6419-28.
- Hall, S.C. i Wells, J. (1988). Micronuclei in human lymphocytes as a biological doseimeter: preliminary data following beta irradiation in vitro. *J. Radiat. Prot.*(8): 97-102.
- Hamer, G., Roepers-Gajadien, H.L., van Duyn-Goedhart, A., Gademan, I.S., Kal, H.B., van Buul, P.P., Ashley, T. i de Rooij, D.G. (2003). Function of DNA-protein kinase catalytic subunit during the early meiotic prophase without Ku70 and Ku86. *Biol Reprod* **68**(3): 717-21.
- Hande, M.P., Boei, J.J., Granath, F. i Natarajan, A.T. (1996a). Induction and persistence of cytogenetic damage in mouse splenocytes following whole-body X-irradiation analysed by fluorescence in situ hybridization. I. Dicentrics and translocations. *Int J Radiat Biol* **69**(4): 437-46.
- Hande, M.P., Boei, J.J. i Natarajan, A.T. (1996b). Induction and persistence of cytogenetic damage in mouse splenocytes following whole-body X-irradiation analysed by fluorescence in situ hybridization. II. Micronuclei. *Int J Radiat Biol* **70**(4): 375-83.
- Hande, M.P., Boei, J.J. i Natarajan, A.T. (1997). Induction and persistence of cytogenetic damage in mouse splenocytes following whole-body X-irradiation analysed by fluorescence in situ hybridization. III. Chromosome malsegregation/aneuploidy. *Mutagenesis* **12**(3): 125-31.
- Handyside, A.H. i Delhanty, J.D. (1997). Preimplantation genetic diagnosis: strategies and surprises. *Trends Genet* **13**(7): 270-5.
- Hardwick, J.P., Schlenker, R.A. i Huberman, E. (1989). Alteration of the c-mos locus in "normal" tissues from humans exposed to radium. *Cancer Res* **49**(10): 2668-73.
- Hardy, K., Spanos, S., Becker, D., Iannelli, P., Winston, R.M. i Stark, J. (2001). From cell death to embryo arrest: mathematical models of human preimplantation embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1655-60.

- Hasegawa, M., Wilson, G., Russell, L.D. i Meistrich, M.L. (1997). Radiation-induced cell death in the mouse testis: relationship to apoptosis. *Radiat Res* **147**(4): 457-67.
- Hasegawa, M., Zhang, Y., Niibe, H., Terry, N.H. i Meistrich, M.L. (1998). Resistance of differentiating spermatogonia to radiation-induced apoptosis and loss in p53-deficient mice. *Radiat Res* **149**(3): 263-70.
- Hassold, T. i Hunt, P. (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* **2**(4): 280-91.
- Hassold, T.J. (1998). Nondisjunction in the human male. *Curr Top Dev Biol* **37**: 383-406.
- Hauf, S., Cole, R.W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., van Meel, J., Rieder, C.L. i Peters, J.M. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* **161**(2): 281-94.
- Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, A.K., Usson, Y., Pelletier, R., Sele, B., Khochbin, S. i Rousseaux, S. (2000). Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* **79**(12): 950-60.
- Heale, J.T., Ball, A.R., Jr., Schmiesing, J.A., Kim, J.S., Kong, X., Zhou, S., Hudson, D.F., Earnshaw, W.C. i Yokomori, K. (2006). Condensin I interacts with the PARP-1-XRCC1 complex and functions in DNA single-strand break repair. *Mol Cell* **21**(6): 837-48.
- Hecht, N.B. (1998). Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays* **20**(7): 555-61.
- Heddle, J.A. (1973). A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat Res* **18**(2): 187-90.
- Heddle, J.A. i Carrano, A.V. (1977). The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutat Res* **44**(1): 63-9.
- Heller, C.G. i Clermont, Y. (1963). Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science* **140**: 184-6.
- Heyting, C. (1996). Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **8**(3): 389-96.
- Hoffelder, D.R., Luo, L., Burke, N.A., Watkins, S.C., Gollin, S.M. i Saunders, W.S. (2004). Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma* **112**(8): 389-97.
- Holliday, R. (1991). Mutations and epimutations in mammalian cells. *Mutat Res* **250**(1-2): 351-63.
- Hook, E.B. (1985). The impact of aneuploidy upon public health: mortality and morbidity associated with human chromosome abnormalities. *Basic Life Sci* **36**: 7-33.
- Howell, B.J., Moree, B., Farrar, E.M., Stewart, S., Fang, G. i Salmon, E.D. (2004). Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr Biol* **14**(11): 953-64.
- Huber, R., Braselmann, H. i Bauchinger, M. (1989). Screening for interindividual differences in radiosensitivity by means of the micronucleus assay in human lymphocytes. *Radiat Environ Biophys* **28**(2): 113-20.
- Huber, R., Braselmann, H. i Bauchinger, M. (1992). Intra- and inter-individual variation of background and radiation-induced

- micronucleus frequencies in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol* **61**(5): 655-61.
- Huber, R., Streng, S. i Bauchinger, M. (1983). The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. *Mutat Res* **111**(2): 185-93.
- Hubner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L.K., Kehler, J., Reinbold, R., De La Fuente, R., Wood, J., Strauss, J.F., 3rd, Boiani, M. i Scholer, H.R. (2003). Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* **300**(5623): 1251-6.
- Hunt, P.A. i Hassold, T.J. (2002). Sex matters in meiosis. *Science* **296**(5576): 2181-3.
- Hunter, N. i Kleckner, N. (2001). The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell* **106**(1): 59-70.
- Hwang, L.H., Lau, L.F., Smith, D.L., Mistrot, C.A., Hardwick, K.G., Hwang, E.S., Amon, A. i Murray, A.W. (1998). Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science* **279**(5353): 1041-4.
- Ibañez, E., Molist, J., Vidal, F., Egozcue, J. i Santaló, J. (2001). Assessment of the proportion of transgene-bearing sperm by fluorescence in situ hybridization: a novel approach for the detection of germline mosaicism in transgenic male founders. *Mol Reprod Dev* **58**(2): 166-72.
- Issa, J.P., Baylin, S.B. i Belinsky, S.A. (1996). Methylation of the estrogen receptor CpG island in lung tumors is related to the specific type of carcinogen exposure. *Cancer Res* **56**(16): 3655-8.
- Jallepalli, P.V., Waizenegger, I.C., Bunz, F., Langer, S., Speicher, M.R., Peters, J.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. i Lengauer, C. (2001). Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell* **105**(4): 445-57.
- Jin, D.Y., Spencer, F. i Jeang, K.T. (1998). Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. *Cell* **93**(1): 81-91.
- Kallio, M., Weinstein, J., Daum, J.R., Burke, D.J. i Gorbsky, G.J. (1998). Mammalian p55CDC mediates association of the spindle checkpoint protein Mad2 with the cyclosome/anaphase-promoting complex, and is involved in regulating anaphase onset and late mitotic events. *J Cell Biol* **141**(6): 1393-406.
- Katis, V.L., Galova, M., Rabitsch, K.P., Gregan, J. i Nasmyth, K. (2004). Maintenance of cohesin at centromeres after meiosis I in budding yeast requires a kinetochore-associated protein related to MEI-S332. *Curr Biol* **14**(7): 560-72.
- Keeney, S., Giroux, C.N. i Kleckner, N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**(3): 375-84.
- Kerjean, A., Dupont, J.M., Vasseur, C., Le Tessier, D., Cuisset, L., Paldi, A., Jouannet, P. i Jeanpierre, M. (2000). Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum Mol Genet* **9**(14): 2183-7.
- Kierszenbaum, A.L. i Tres, L.L. (1978). RNA transcription and chromatin structure during meiotic and postmeiotic stages of spermatogenesis. *Fed Proc* **37**(11): 2512-6.

- Kipling, D., Ackford, H.E., Taylor, B.A. i Cooke, H.J. (1991). Mouse minor satellite DNA genetically maps to the centromere and is physically linked to the proximal telomere. *Genomics* **11**(2): 235-41.
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U. i Decordier, I. (2003). Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol Lett* **140-141**: 63-74.
- Kitajima, T.S., Kawashima, S.A. i Watanabe, Y. (2004). The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* **427**(6974): 510-7.
- Kleene, K.C. (1996). Patterns of translational regulation in the mammalian testis. *Mol Reprod Dev* **43**(2): 268-81.
- Kleene, K.C. (2001). A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mech Dev* **106**(1-2): 3-23.
- Klein, C.B. i Costa, M. (1997). DNA methylation, heterochromatin and epigenetic carcinogens. *Mutat Res* **386**(2): 163-80.
- Klein, F., Mahr, P., Galova, M., Buonomo, S.B., Michaelis, C., Nairz, K. i Nasmyth, K. (1999). A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* **98**(1): 91-103.
- Koksal, G., Dalci, D.O. i Pala, F.S. (1996). Micronuclei in human lymphocytes: the Co-60 gamma-ray dose-response. *Mutat Res* **359**(2): 151-7.
- Kops, G.J., Weaver, B.A. i Cleveland, D.W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* **5**(10): 773-85.
- Kormos, C. i Koteles, G.J. (1988). Micronuclei in X-irradiated human lymphocytes. *Mutat Res* **199**(1): 31-5.
- Kovalchuk, O., Burke, P., Besplug, J., Slovack, M., Filkowski, J. i Pogribny, I. (2004). Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low-dose X-ray-irradiation. *Mutat Res* **548**(1-2): 75-84.
- Kurilo, L.F. (1981). Oogenesis in antenatal development in man. *Hum Genet* **57**(1): 86-92.
- Lammers, J.H., Offenbergh, H.H., van Aalderen, M., Vink, A.C., Dietrich, A.J. i Heyting, C. (1994). The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* **14**(2): 1137-46.
- Lampson, M.A. i Kapoor, T.M. (2005). The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. *Nat Cell Biol* **7**(1): 93-8.
- Leach, N.T., Rehder, C., Jensen, K., Holt, S. i Jackson-Cook, C. (2004). Human chromosomes with shorter telomeres and large heterochromatin regions have a higher frequency of acquired somatic cell aneuploidy. *Mech Ageing Dev* **125**(8): 563-73.
- Lee, J., Iwai, T., Yokota, T. i Yamashita, M. (2003). Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. *J Cell Sci* **116**(Pt 13): 2781-90.
- Lee, T.K., Wiley, A.L., Jr., Esinhart, J.D. i Blackburn, L.D. (1994). Radiation dose-dependent variations of micronuclei production in cytochalasin B-blocked human lymphocytes. *Teratog Carcinog Mutagen* **14**(1): 1-12.

- Lehmann, A.R. (2005). The role of SMC proteins in the responses to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* **4**(3): 309-14.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. i Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**(6712): 643-9.
- Lens, S.M., Wolthuis, R.M., Klompaker, R., Kauw, J., Agami, R., Brummelkamp, T., Kops, G. i Medema, R.H. (2003). Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *Embo J* **22**(12): 2934-47.
- Li, X.C. i Schimenti, J.C. (2007). Mouse pachytene checkpoint 2 (trip13) is required for completing meiotic recombination but not synapsis. *PLoS Genet* **3**(8): e130.
- Li, Y. i Benezra, R. (1996). Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science* **274**(5285): 246-8.
- Lindroos, H.B., Strom, L., Itoh, T., Katou, Y., Shirahige, K. i Sjogren, C. (2006). Chromosomal association of the Smc5/6 complex reveals that it functions in differently regulated pathways. *Mol Cell* **22**(6): 755-67.
- Littlefield, L.G., Sayer, A.M. i Frome, E.L. (1989). Comparisons of dose-response parameters for radiation-induced acentric fragments and micronuclei observed in cytokinesis-arrested lymphocytes. *Mutagenesis* **4**(4): 265-70.
- Losada, A. i Hirano, T. (2005). Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev* **19**(11): 1269-87.
- Luo, X., Tang, Z., Xia, G., Wassmann, K., Matsumoto, T., Rizo, J. i Yu, H. (2004). The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states. *Nat Struct Mol Biol* **11**(4): 338-45.
- MacLeod, M.C. (1996). A possible role in chemical carcinogenesis for epigenetic, heritable changes in gene expression. *Mol Carcinog* **15**(4): 241-50.
- Mahadevaiah, S.K., Evans, E.P. i Burgoyne, P.S. (2000). An analysis of meiotic impairment and of sex chromosome associations throughout meiosis in XYY mice. *Cytogenet Cell Genet* **89**(1-2): 29-37.
- Mahadevaiah, S.K., Turner, J.M., Baudat, F., Rogakou, E.P., de Boer, P., Blanco-Rodriguez, J., Jasin, M., Keeney, S., Bonner, W.M. i Burgoyne, P.S. (2001). Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* **27**(3): 271-6.
- Mahnke, K., Knop, J. i Enk, A.H. (2003). Induction of tolerogenic DCs: 'you are what you eat'. *Trends Immunol* **24**(12): 646-51.
- Manandhar, G., Schatten, H. i Sutovsky, P. (2005). Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biol Reprod* **72**(1): 2-13.
- Mao, Y., Abrieu, A. i Cleveland, D.W. (2003). Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell* **114**(1): 87-98.
- Marchetti, F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore, D., 2nd i Wyrobek, A.J. (2004). Paternally transmitted chromosomal aberrations in mouse zygotes determine their embryonic fate. *Biol Reprod* **70**(3): 616-24.
- Marchetti, F., Bishop, J.B., Lowe, X., Generoso, W.M., Hozier, J. i Wyrobek, A.J. (2001). Etoposide induces heritable chromosomal aberrations and aneuploidy during male meiosis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7): 3952-7.

- Marchetti, F., Lowe, X., Bishop, J. i Wyrobek, A.J. (1999). Absence of selection against aneuploid mouse sperm at fertilization. *Biol Reprod* **61**(4): 948-54.
- Marchetti, F. i Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and consequences of paternally-transmitted chromosomal abnormalities. *Birth Defects Res C Embryo Today* **75**(2): 112-29.
- Marston, A.L. i Amon, A. (2004). Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(12): 983-97.
- Marston, A.L., Tham, W.H., Shah, H. i Amon, A. (2004). A genome-wide screen identifies genes required for centromeric cohesion. *Science* **303**(5662): 1367-70.
- Masumoto, H., Masukata, H., Muro, Y., Nozaki, N. i Okazaki, T. (1989). A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol* **109**(5): 1963-73.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I. i Kirsch-Volders, M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* **88**(11): 1515-31.
- Matsuda, Y., Seki, N., Utsugi-Takeuchi, T. i Tobari, I. (1989a). X-ray- and mitomycin C (MMC)-induced chromosome aberrations in spermiogenic germ cells and the repair capacity of mouse eggs for the X-ray and MMC damage. *Mutat Res* **211**(1): 65-75.
- Matsuda, Y., Tobari, I., Maemori, M. i Seki, N. (1989b). Mechanism of chromosome aberration induction in the mouse egg fertilized with sperm recovered from postmeiotic germ cells treated with methyl methanesulfonate. *Mutat Res* **214**(2): 165-80.
- McGrew, J.T., Goetsch, L., Byers, B. i Baum, P. (1992). Requirement for ESP1 in the nuclear division of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **3**(12): 1443-54.
- Mebius, R.E. i Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* **5**(8): 606-16.
- Meistrich, M. i (1989). Histone and basic nuclear protein transitions in mammalian spermatogenesis. *Histones and other basic nuclear proteins*. S.G. Hnilica LS, Stein JL, Boca Raton: CRC Press: 165-182.
- Meistrich, M.L. (1989). Calculation of the incidence of infertility in human populations from sperm measures using the two-distribution model. *Prog Clin Biol Res* **302**: 275-85; discussion 286-90.
- Meistrich, M.L., Hunter, N.R., Suzuki, N., Trostle, P.K. i Withers, H.R. (1978). Gradual regeneration of mouse testicular stem cells after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res* **74**(2): 349-62.
- Meuwissen, R.L., Offenbergh, H.H., Dietrich, A.J., Riesewijk, A., van Iersel, M. i Heyting, C. (1992). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *Embo J* **11**(13): 5091-100.
- Minshull, J., Sun, H., Tonks, N.K. i Murray, A.W. (1994). A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cell* **79**(3): 475-86.
- Mitchell, J.C. i Norman, A. (1987). The induction of micronuclei in human lymphocytes by low doses of radiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **52**(4): 527-35.
- Mitelman, F., Johansson, B. i Mertens, F. (1994). *Catalog of chromosome aberrations in cancer*. New York, Wiley-Liss Publishing.

- Moens, P.B., Chen, D.J., Shen, Z., Kolas, N., Tarsounas, M., Heng, H.H. i Spyropoulos, B. (1997). Rad51 immunocytology in rat and mouse spermatocytes and oocytes. *Chromosoma* **106**(4): 207-15.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Papworth, G.D., Wang, Z., Watkins, S.C., Falo, L.D., Jr. i Thomson, A.W. (2003). Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* **101**(2): 611-20.
- Mozdarani, H. i Salimi, M. (2006). Numerical chromosome abnormalities in 8-cell embryos generated from gamma-irradiated male mice in the absence and presence of vitamin E. *Int J Radiat Biol* **82**(11): 817-22.
- Muller, W.U., Nusse, M., Miller, B.M., Slavotinek, A., Viaggi, S. i Streffer, C. (1996). Micronuclei: a biological indicator of radiation damage. *Mutat Res* **366**(2): 163-9.
- Murakami, H. i Nurse, P. (2000). DNA replication and damage checkpoints and meiotic cell cycle controls in the fission and budding yeasts. *Biochem J* **349**(Pt 1): 1-12.
- Nanda, I., Schneider-Rasp, S., Winking, H. i Schmid, M. (1995). Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements. *Chromosome Res* **3**(7): 399-409.
- Nasmyth, K. i Haering, C.H. (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem* **74**: 595-648.
- Nias, A.H.W. (1998). *An Introduction to Radiobiology*, Wiley.
- Nigg, E.A. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* **2**(11): 815-25.
- Niwa, O. (2003). Induced genomic instability in irradiated germ cells and in the offspring; reconciling discrepancies among the human and animal studies. *Oncogene* **22**(45): 7078-86.
- Norppa, H., Renzi, L. i Lindholm, C. (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization. *Mutagenesis* **8**(6): 519-25.
- O'Driscoll, M. i Jeggo, P.A. (2006). The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet* **7**(1): 45-54.
- Oakberg, E.F. (1956a). A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat* **99**(3): 391-413.
- Oakberg, E.F. (1956b). Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat* **99**(3): 507-16.
- Oakberg, E.F. (1979). Timing of oocyte maturation in the mouse and its relevance to radiation-induced cell killing and mutational sensitivity. *Mutat Res* **59**(1): 39-48.
- Offenberg, H.H., Schalk, J.A., Meuwissen, R.L., van Aalderen, M., Kester, H.A., Dietrich, A.J. i Heyting, C. (1998). SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res* **26**(11): 2572-9.
- Parra, M.T., Gomez, R., Viera, A., Page, J., Calvente, A., Wordeman, L., Rufas, J.S. i Suja, J.A. (2006). A perikinetochoric ring defined by MCAK and Aurora-B as a novel centromere domain. *PLoS Genet* **2**(6): e84.

- Pebernard, S., McDonald, W.H., Pavlova, Y., Yates, J.R., 3rd i Boddy, M.N. (2004). Nse1, Nse2, and a novel subunit of the Smc5-Smc6 complex, Nse3, play a crucial role in meiosis. *Mol Biol Cell* **15**(11): 4866-76.
- Pedersen, T. (1970). Follicle kinetics in the ovary of the cyclic mouse. *Acta Endocrinol (Copenh)* **64**(2): 304-23.
- Pei, L. i Melmed, S. (1997). Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol* **11**(4): 433-41.
- Peters, H. (1970). Migration of gonocytes into the mammalian gonad and their differentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **259**(828): 91-101.
- Pietras, D.F., Bennett, K.L., Siracusa, L.D., Woodworth-Gutai, M., Chapman, V.M., Gross, K.W., Kane-Haas, C. i Hastie, N.D. (1983). Construction of a small Mus musculus repetitive DNA library: identification of a new satellite sequence in Mus musculus. *Nucleic Acids Res* **11**(20): 6965-83.
- Pittman, D.L., Cobb, J., Schimenti, K.J., Wilson, L.A., Cooper, D.M., Brignull, E., Handel, M.A. i Schimenti, J.C. (1998). Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* **1**(5): 697-705.
- Pogribny, I., Raiche, J., Slovack, M. i Kovalchuk, O. (2004). Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes. *Biochem Biophys Res Commun* **320**(4): 1253-61.
- Prieto, I., Pezzi, N., Buesa, J.M., Kremer, L., Barthelemy, I., Carreiro, C., Roncal, F., Martinez, A., Gomez, L., Fernandez, R., Martinez, A.C. i Barbero, J.L. (2002). STAG2 and Rad21 mammalian mitotic cohesins are implicated in meiosis. *EMBO Rep* **3**(6): 543-50.
- Prieto, I., Suja, J.A., Pezzi, N., Kremer, L., Martinez, A.C., Rufas, J.S. i Barbero, J.L. (2001). Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol* **3**(8): 761-6.
- Prieto, I., Tease, C., Pezzi, N., Buesa, J.M., Ortega, S., Kremer, L., Martinez, A., Martinez, A.C., Hulten, M.A. i Barbero, J.L. (2004). Cohesin component dynamics during meiotic prophase I in mammalian oocytes. *Chromosome Res* **12**(3): 197-213.
- Prosser, J.S., Moquet, J.E., Lloyd, D.C. i Edwards, A.A. (1988). Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res* **199**(1): 37-45.
- Putkey, F.R., Cramer, T., Morphew, M.K., Silk, A.D., Johnson, R.S., McIntosh, J.R. i Cleveland, D.W. (2002). Unstable kinetochore-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E. *Dev Cell* **3**(3): 351-65.
- Rabitsch, K.P., Petronczki, M., Javerzat, J.P., Genier, S., Chwalla, B., Schleiffer, A., Tanaka, T.U. i Nasmyth, K. (2003). Kinetochore recruitment of two nucleolar proteins is required for homolog segregation in meiosis I. *Dev Cell* **4**(4): 535-48.
- Radman, M. (2001). Fidelity and infidelity. *Nature* **413**(6852): 115.
- Ramalho, A., Sunjevaric, I. i Natarajan, A.T. (1988). Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-ray-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes: comparison of two methods. *Mutat Res* **207**(3-4): 141-6.
- Rao, C.R. i Chakravarti, I.M. (1956). Some small sample tests of significance for a Poisson distribution. *Biometrics*(12): 264-282.

- Reik, W. i Dean, W. (2001). DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis* **22**(14): 2838-43.
- Reik, W., Dean, W. i Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**(5532): 1089-93.
- Reik, W. i Walter, J. (2001). Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* **2**(1): 21-32.
- Roeder, G.S. (1997). Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev* **11**(20): 2600-21.
- Roeder, G.S. i Bailis, J.M. (2000). The pachytene checkpoint. *Trends Genet* **16**(9): 395-403.
- Roemer, I., Reik, W., Dean, W. i Klose, J. (1997). Epigenetic inheritance in the mouse. *Curr Biol* **7**(4): 277-80.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. i Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**(5): 905-16.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. i Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**(10): 5858-68.
- Romanienko, P.J. i Camerini-Otero, R.D. (2000). The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell* **6**(5): 975-87.
- Russo, A. (2000). In vivo cytogenetics: mammalian germ cells. *Mutat Res* **455**(1-2): 167-89.
- Russo, A., Priante, G. i Tommasi, A.M. (1996). PRINS localization of centromeres and telomeres in micronuclei indicates that in mouse splenocytes chromatid non-disjunction is a major mechanism of aneuploidy. *Mutat Res* **372**(2): 173-80.
- Sassone-Corsi, P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* **296**(5576): 2176-8.
- Sassoon, I., Severin, F.F., Andrews, P.D., Taba, M.R., Kaplan, K.B., Ashford, A.J., Stark, M.J., Sorger, P.K. i Hyman, A.A. (1999). Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* kinetochores by the type 1 phosphatase Glc7p. *Genes Dev* **13**(5): 545-55.
- Savage, J.R. (1988). A comment on the quantitative relationship between micronuclei and chromosomal aberrations. *Mutat Res* **207**(1): 33-6.
- Savage, J.R.K. (1970). Sites of radiation-induced chromosomes exchanges. *Curr. Top. Radiat. Res.*(6): 129-154.
- Scherthan, H. (2001). A bouquet makes ends meet. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(8): 621-7.
- Schleiermacher, E. i Schmidt, W. (1973). The local control of mammalian spermatogenesis. *Humangenetik* **19**(1): 75-98.
- Schmid, T.E., Lowe, X., Marchetti, F., Bishop, J., Haseman, J. i Wyrobek, A.J. (2001). Evaluation of inter-scorer and inter-laboratory reliability of the mouse epididymal sperm aneuploidy (m-ESA) assay. *Mutagenesis* **16**(3): 189-95.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutat Res* **31**(1): 9-15.
- Schuler, M., Rupa, D.S. i Eastmond, D.A. (1997). A critical evaluation of centromeric labeling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage in vitro. *Mutat Res* **392**(1-2): 81-95.
- Schwacha, A. i Kleckner, N. (1997). Interhomolog bias during meiotic recombination: meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway. *Cell* **90**(6): 1123-35.

- Sega, G.A. (1979). Unscheduled DNA synthesis (DNA repair) in the germ cells of male mice--its role in the study of mammalian mutagenesis. *Genetics* **92**(1 Pt 1 Suppl): s49-58.
- Sega, G.A. (1991). Molecular targets, DNA breakage, and DNA repair: their role in mutation induction in mammalian germ cells. *Banbury Report 34: biology of mammalian germ cell mutagenesis*. NY, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory: 79-91.
- Sega, G.A., Alcota, R.P., Tancongco, C.P. i Brimer, P.A. (1989). Acrylamide binding to the DNA and protamine of spermiogenic stages in the mouse and its relationship to genetic damage. *Mutat Res* **216**(4): 221-30.
- Sgura, A., Antocchia, A., Ramirez, M.J., Marcos, R., Tanzarella, C. i Degrassi, F. (1997). Micronuclei, centromere-positive micronuclei and chromosome nondisjunction in cytokinesis blocked human lymphocytes following mitomycin C or vincristine treatment. *Mutat Res* **392**(1-2): 97-107.
- Shah, J.V., Botvinick, E., Bonday, Z., Furnari, F., Berns, M. i Cleveland, D.W. (2004). Dynamics of centromere and kinetochore proteins; implications for checkpoint signaling and silencing. *Curr Biol* **14**(11): 942-52.
- Sharpe, R.M. (1994). Regulation of spermatogenesis. *The Physiology of Reproduction*. E.K.a.J.D. Neill, Raven Press. **2**: 1363-1434.
- Shin, H.J., Baek, K.H., Jeon, A.H., Park, M.T., Lee, S.J., Kang, C.M., Lee, H.S., Yoo, S.H., Chung, D.H., Sung, Y.C., McKeon, F. i Lee, C.W. (2003). Dual roles of human BubR1, a mitotic checkpoint kinase, in the monitoring of chromosomal instability. *Cancer Cell* **4**(6): 483-97.
- Shonn, M.A., McCarroll, R. i Murray, A.W. (2000). Requirement of the spindle checkpoint for proper chromosome segregation in budding yeast meiosis. *Science* **289**(5477): 300-3.
- Shonn, M.A., Murray, A.L. i Murray, A.W. (2003). Spindle checkpoint component Mad2 contributes to biorientation of homologous chromosomes. *Curr Biol* **13**(22): 1979-84.
- Silva, M.J., Carothers, A., Dias, A., Luis, J.H., Piper, J. i Boavida, M.G. (1994). Dose dependence of radiation-induced micronuclei in cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutat Res* **322**(2): 117-28.
- Sloter, E., Nath, J., Eskenazi, B. i Wyrobek, A.J. (2004). Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents. *Fertil Steril* **81**(4): 925-43.
- Smith, K.N., Penkner, A., Ohta, K., Klein, F. i Nicolas, A. (2001). B-type cyclins CLB5 and CLB6 control the initiation of recombination and synaptonemal complex formation in yeast meiosis. *Curr Biol* **11**(2): 88-97.
- Snowden, T., Acharya, S., Butz, C., Berardini, M. i Fishel, R. (2004). hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday Junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol Cell* **15**(3): 437-51.
- Somers, C.M., McCarry, B.E., Malek, F. i Quinn, J.S. (2004). Reduction of particulate air pollution lowers the risk of heritable mutations in mice. *Science* **304**(5673): 1008-10.
- Somers, C.M., Yauk, C.L., White, P.A., Parfett, C.L. i Quinn, J.S. (2002). Air pollution induces heritable DNA mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 15904-7.

- Sotomayor, R.E. i Segal, G.A. (2000). Unscheduled DNA synthesis assay in mammalian spermatogenic cells: an update. *Environ Mol Mutagen* **36**(4): 255-65.
- Storchova, Z. i Pellman, D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(1): 45-54.
- Straus, D.S. (1981). Somatic mutation, cellular differentiation, and cancer causation. *J Natl Cancer Inst* **67**(2): 233-41.
- Strom, L., Lindroos, H.B., Shirahige, K. i Sjogren, C. (2004). Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair. *Mol Cell* **16**(6): 1003-15.
- Strom, L. i Sjogren, C. (2007). Chromosome segregation and double-strand break repair - a complex connection. *Curr Opin Cell Biol* **19**(3): 344-9.
- Sudakin, V., Chan, G.K. i Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* **154**(5): 925-36.
- Tanaka, T.U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M.J. i Nasmyth, K. (2002). Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell* **108**(3): 317-29.
- Tang, Z., Bharadwaj, R., Li, B. i Yu, H. (2001). Mad2-Independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev Cell* **1**(2): 227-37.
- Taylor, S.S., Ha, E. i McKeon, F. (1998). The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol* **142**(1): 1-11.
- Taylor, S.S. i McKeon, F. (1997). Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* **89**(5): 727-35.
- Thierens, H., Vral, A., de Ridder, L., Touil, N., Kirsch-Volders, M., Lambert, V. i Laurent, C. (1999). Inter-laboratory comparison of cytogenetic endpoints for the biomonitoring of radiological workers. *Int J Radiat Biol* **75**(1): 23-34.
- Torres-Rosell, J., Machin, F., Farmer, S., Jarmuz, A., Eydmann, T., Dalgaard, J.Z. i Aragon, L. (2005). SMC5 and SMC6 genes are required for the segregation of repetitive chromosome regions. *Nat Cell Biol* **7**(4): 412-9.
- Toth, A., Rabitsch, K.P., Galova, M., Schleiffer, A., Buonomo, S.B. i Nasmyth, K. (2000). Functional genomics identifies monopolin: a kinetochore protein required for segregation of homologs during meiosis I. *Cell* **103**(7): 1155-68.
- Touil, N., Elhajouji, A., Thierens, H. i Kirsch-Volders, M. (2000). Analysis of chromosome loss and chromosome segregation in cytokinesis-blocked human lymphocytes: non-disjunction is the prevalent mistake in chromosome segregation produced by low dose exposure to ionizing radiation. *Mutagenesis* **15**(1): 1-7.
- Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Akasu, R. i Noce, T. (2003). Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11457-62.
- Trasler, J.M. (1998). Origin and roles of genomic methylation patterns in male germ cells. *Semin Cell Dev Biol* **9**(4): 467-74.

- Tucker, J.D., Strout, C.L., Christensen, M.L. i Carrano, A.V. (1986). Sister chromatid exchange induction and persistence in peripheral blood and spleen lymphocytes of mice treated with ethylnitrosourea. *Environ Mutagen* **8**(3): 345-55.
- Tusell, L., Latre, L., Ponsa, I., Miró, R., Egozcue, J. i Genescà, A. (2004). Capping of radiation-induced DNA breaks in mouse early embryos. *J Radiat Res (Tokyo)* **45**(3): 415-22.
- Uhlmann, F. i Nasmyth, K. (1998). Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr Biol* **8**(20): 1095-101.
- Ullrich, R.L. i Ponnaiya, B. (1998). Radiation-induced instability and its relation to radiation carcinogenesis. *Int J Radiat Biol* **74**(6): 747-54.
- Uzawa, S., Samejima, I., Hirano, T., Tanaka, K. i Yanagida, M. (1990). The fission yeast cut1+ gene regulates spindle pole body duplication and has homology to the budding yeast ESP1 gene. *Cell* **62**(5): 913-25.
- Wang, X. i Dai, W. (2005). Shugoshin, a guardian for sister chromatid segregation. *Exp Cell Res* **310**(1): 1-9.
- Watanabe, Y. i Nurse, P. (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* **400**(6743): 461-4.
- Watanabe, Y., Yokobayashi, S., Yamamoto, M. i Nurse, P. (2001). Pre-meiotic S phase is linked to reductional chromosome segregation and recombination. *Nature* **409**(6818): 359-63.
- Watson, R.E. i Goodman, J.I. (2002). Epigenetics and DNA methylation come of age in toxicology. *Toxicol Sci* **67**(1): 11-6.
- Weaver, B.A., Bonday, Z.Q., Putkey, F.R., Kops, G.J., Silk, A.D. i Cleveland, D.W. (2003). Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J Cell Biol* **162**(4): 551-63.
- Wong, A.K. i Rattner, J.B. (1988). Sequence organization and cytological localization of the minor satellite of mouse. *Nucleic Acids Res* **16**(24): 11645-61.
- Wouters-Tyrou, D., Martinage, A., Chevaillier, P. i Sautiere, P. (1998). Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* **80**(2): 117-28.
- Wu, H.Y. i Burgess, S.M. (2006). Two distinct surveillance mechanisms monitor meiotic chromosome metabolism in budding yeast. *Curr Biol* **16**(24): 2473-9.
- Wyrobek, A.J. (1993). Methods and concepts in detecting abnormal reproductive outcomes of paternal origin. *Reprod Toxicol* **7 Suppl 1**: 3-16.
- Wyrobek, A.J., Schmid, T.E. i Marchetti, F. (2005). Relative susceptibilities of male germ cells to genetic defects induced by cancer chemotherapies. *J Natl Cancer Inst Monogr*(34): 31-5.
- Xia, G., Luo, X., Habu, T., Rizo, J., Matsumoto, T. i Yu, H. (2004). Conformation-specific binding of p31(comet) antagonizes the function of Mad2 in the spindle checkpoint. *Embo J* **23**(15): 3133-43.
- Yamamoto, A., Guacci, V. i Koshland, D. (1996). Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **133**(1): 85-97.
- Yoshida, K., Kondoh, G., Matsuda, Y., Habu, T., Nishimune, Y. i Morita, T. (1998). The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell* **1**(5): 707-18.

- Yuan, L., Liu, J.G., Hoja, M.R., Wilbertz, J., Nordqvist, K. i Hoog, C. (2002). Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science* **296**(5570): 1115-8.
- Zhang, X., Horwitz, G.A., Prezant, T.R., Valentini, A., Nakashima, M., Bronstein, M.D. i Melmed, S. (1999). Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol* **13**(1): 156-66.
- Zijno, A., Marcon, F., Leopardi, P. i Crebelli, R. (1994). Simultaneous detection of X-chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked human lymphocytes by in situ hybridization with a centromeric DNA probe; implications for the human lymphocyte in vitro micronucleus assay using cytochalasin B. *Mutagenesis* **9**(3): 225-32.

Annex

Non-disjunction and Chromosome Loss in Gamma-Irradiated Human Lymphocytes: A Fluorescence *In Situ* Hybridization Analysis Using Centromere-Specific Probes

Immaculada Ponsa,^{a,1} Joan Francesc Barquinero,^b Rosa Miró,^a Josep Egozcue^a and Anna Genescà^a

^a *Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, and* ^b *Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain*

Ponsa, I., Barquinero, J. F., Miró, R., Egozcue, J. and Genescà, A. Non-disjunction and Chromosome Loss in Gamma-Irradiated Human Lymphocytes: A Fluorescence *In Situ* Hybridization Analysis Using Centromere-Specific Probes. *Radiat. Res.* 155, 424–431 (2001).

Centromere-specific DNA probes for chromosomes 4, 7 and 18 were used to simultaneously analyze chromosome loss, non-disjunction, breaks within the labeled region, and nucleoplasmic bridges induced by γ rays in binucleated human lymphocytes. The doses used were 0, 1, 2 and 4 Gy, and approximately 1000 cells were scored per dose. Micronucleus frequency increased in a linear-quadratic fashion. For chromosome loss, significant increases were observed at 2 and 4 Gy, whereas for non-disjunction significant increases were observed at 1 Gy; thus non-disjunction allowed us to detect the effects of radiation at a lower dose than chromosome loss. The use of centromere-specific probes allowed discrimination between the clastogenic and aneugenic effects of ionizing radiation. The analysis of chromosome loss, not taking fragmented signals into account, ensures the detection of an aneugenic effect, which was not possible using pancentromeric probes. The frequency of chromosome breakage within the labeled regions was higher in nuclei than in micronuclei, suggesting an increase in the engulfment of chromosomal material by nuclei as a consequence of the presence of cytochalasin B in the cultures. Chromatin filaments connecting main nuclei, the so-called nucleoplasmic bridges, were observed in irradiated samples, and are a manifestation of rearranged chromosomes producing anaphase bridges. © 2001 by Radiation Research Society

Society

INTRODUCTION

Aneuploidy is a condition in which the chromosome number of a cell or organism differs from an exact multiple of the haploid or diploid number. It is common in numerous pathological conditions such as spontaneous abortions,

¹ Author to whom correspondence should be addressed at Unitat de Biologia, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain.

birth defects and cancer. The most common changes in aneuploidy are monosomies and trisomies, and they are recognized as the basis of a number of human genetic syndromes (1). In view of the impact of aneuploidy on human health and of the possible etiological role of environmental agents, it is important that methods be developed to determine the potential of genotoxic agents to induce such changes.

There are two processes which give rise to aneuploidy in somatic cells: non-disjunction of chromosomes during anaphase, and chromosome loss. In the first process, one daughter cell becomes trisomic and the other monosomic, while in the second process the lost chromosome may form a micronucleus or may be randomly incorporated into either of the daughter nuclei. However, micronuclei do not arise only from whole chromosomes that lag at mitosis due to a damaged kinetochore or to a faulty mitotic apparatus (2–6). They can also originate from acentric fragments that fail to be incorporated into the daughter nuclei during cell division because of the lack of a kinetochore (2, 6–8), or from complex chromosomal rearrangements which encounter mechanical difficulties during anaphase (6, 9).

The cytokinesis block (10) and micronucleus flow sorting (11) techniques have been used to analyze spontaneous and chemically or physically induced non-disjunction and/or chromosome loss. In previous studies, analyses were done using antikinetochore antibodies (12–15), pancentromeric probes (13, 15–21), pancentromeric and pantelomeric probes (22), whole-chromosome painting probes (23, 24), pancentromeric and whole-chromosome painting probes (25), and pancentromeric probes (for chromosome loss) and chromosome-specific centromeric probes (for non-disjunction) (26–28). Some studies have been done using chromosome-specific centromeric DNA probes to evaluate spontaneous or chemically induced non-disjunction and chromosome loss (19, 20, 29–32), but none have analyzed the effect of ionizing radiation.

In the studies using centromeric probes, it is widely assumed that micronuclei harboring acentric chromosomal fragments will not be labeled by the probe, while micro-

nuclei harboring whole chromosomes will be positively labeled. However, the clastogenic effect of radiation is well known, so positively labeled micronuclei also contain dicentric chromosomes (6), centric fragments (6), and fragments with broken centromeres (15, 33, 34). However, these possibilities cannot be evaluated using pancentromeric probes or whole-chromosome painting probes, because they not allow differentiation of single chromosomes on interphase nuclei.

We report here the results of a study of cytokinesis-blocked human lymphocytes using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with chromosome-specific centromeric DNA probes to simultaneously detect non-disjunction and chromosome loss, as well as breakage within the labeled region, induced by various doses of γ radiation in the interphase nuclei of the same binucleated cell. Centromeric probes for chromosomes 4, 7 and 18 were used to study chromosome distributions. Since in some studies inter- and intraindividual variations of micronucleus levels (35, 36) as well as the potential spindle-damaging effect of cytochalasin B have been reported (13, 29), the present study was carried out using only one blood sample per individual. We also considered the respective background levels for all the end points analyzed. In this way, the significance of the effects has not been affected by these artifacts.

MATERIALS AND METHODS

Irradiation, Cell Culture and Harvest Protocol

Blood samples were taken by venipuncture from two healthy volunteers (a 32-year-old male and a 25-year-old female). Samples were irradiated with 1, 2 and 4 Gy γ rays using a cobalt source (Theratron-780) located at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona. Dose determinations were made by the unit of Radiophysics and Radioprotection of the hospital after calibration of the teletherapy unit with an electrometer (Farmer 2570); dose rates ranged from 52.86 to 51.70 cGy/min due to the decay of the cobalt. During the irradiations, the recommendations of the IAEA (37) were followed.

After irradiation, unexposed and irradiated blood cultures were set up by adding 0.3 ml of blood to 5 ml RPMI 1640 medium with glutamine and 25 mM Hepes buffer, supplemented with 20% fetal calf serum, 200 IU/ml penicillin, 200 μ g/ml streptomycin (all from Gibco), 20 IU/ml sodium heparin (ROVI), 2 mM glutamine, and 26 μ g/ml phytohemagglutinin A (PHA) (both from Gibco). After 44 h of incubation at 37°C, cytochalasin B (2 mg/ml stock solution in dimethylsulfoxide; Sigma) was added at a final concentration of 6 μ g/ml to block cytokinesis. Duplicate cultures were set up for all conditions.

Harvesting began 72 h after initiation of the cultures. The tubes were centrifuged at 200g for 8 min, the supernatant was carefully removed, and cells were resuspended in 5 ml of 0.075 KCl at 4°C. They were immediately centrifuged at 200g for 8 min and the supernatant was decanted. Cells were fixed by dropping methanol:acetic acid (3:1, v/v) followed by three drops of formaldehyde. The fixative was changed by centrifugation (at 200g for 8 min) and resuspension. This procedure was repeated several times, except for the formaldehyde, until the supernatant was clear. Cells were pelleted and resuspended in a minimal amount of fresh fixative to give a milky suspension. Several drops of suspension were gently spread onto slides. They were inspected and then maintained at -20°C until use.

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

FISH was performed using SpectrumGreen-conjugated centromere-specific DNA probes for chromosomes 4 (4p11-q11) and 7 (7q11.1-q11.1) and SpectrumOrange-conjugated probes for chromosomes 4 and 18 (18p11.1-q11.1) (Vysis Inc., Downers Grove, IL). The resulting signals were yellow for chromosome 4, green for chromosome 7, and red for chromosome 18. Before hybridization, the slides were pretreated with pepsin (5 μ g/ml, Sigma) in 10 mM HCl for 5 min at 37°C, washed in phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min and once in PBS + 50 mM MgCl₂ for 5 min at room temperature, fixed in 1% formaldehyde in PBS/50 mM MgCl₂ for 10 min at room temperature, and washed again in PBS at room temperature. The hybridization, washes and detection were carried out according to the probe manufacturer's protocol. Briefly, the slides were dehydrated in ethanol (70, 85 and 100%, 3 min each) and air-dried. The probes were denatured at 70°C for 5 min, then applied to slides in which the DNA had been denatured at 70°C for 5 min in 70% formamide/2 \times SSC (pH 7-8) and dehydrated in a 70, 85 and 100% ethanol series. The slides were covered with 22 \times 22-mm cover slips and sealed with rubber cement. Hybridization was performed overnight at 42°C in a moist chamber. The slides were washed three times with 50% formamide/2 \times SSC for 10 min each, 10 min in 2 \times SSC, and 5 min in 4 \times SSC/0.05% Tween 20 at 45°C. Finally, slides were dehydrated, mounted in antifade solution (Vector), and counterstained with 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

Scoring Criteria

The slides were coded and examined under an Olympus AX70 fluorescence microscope equipped with filter cubes for DAPI, FITC and rhodamine and a triple band-pass filter that allows the simultaneous observation of labeled chromosomes and counterstained material. First, cells were observed under the triple band-pass filter to detect the presence of binucleated cells with well-preserved cytoplasm and the spot distribution in daughter nuclei and micronuclei. Then they were observed under the DAPI filter to confirm the presence of micronuclei. The criteria of Fenech for identifying binucleated cytokinesis-blocked cells and micronuclei were used (38). To restrict the scoring to the first cell division after treatment and exclude technical artifacts, only binucleated cells showing four signals for each chromosome labeled, irrespective of their localization, were analyzed, except for those binucleated cells showing chromosome breakage within the labeled region. By using three chromosome-specific centromeric probes, different patterns could be observed (Fig. 1). Chromosome loss was detected when a micronucleus showed at least one whole centromeric signal (Fig. 1b) and was recorded as a centromere-positive micronucleus. Non-disjunction was detected when a daughter nucleus showed three centromeric signals for the same chromosome and the other nucleus showed only one (Fig. 1c). A micronucleus carrying an acentric fragment or an unlabeled chromosome (Fig. 1d) was recorded as a centromere-negative micronucleus. A chromosome break within the labeled region was considered when both fragments were located in the nucleus (Fig. 1e) or when one fragment was located in the nucleus and the other in the micronucleus (Fig. 1f). A chromatin filament connecting main nuclei (Fig. 1g) was recorded as a nucleoplasmic bridge. Approximately 1000 binucleated cells (500 per culture) were scored for each dose and donor. FISH-stained lymphocyte images were captured on a Cytovision Ultra Workstation (Applied Imaging Inc.).

Statistical Analysis

To check whether the distribution of micronuclei, centromere-positive micronuclei, and non-disjunction among cells for each dose followed a Poisson distribution, the dispersion index (variance/mean) and its normalized unit, the *U* test (39, 40), were used. Curves were fitted using the iteratively reweighted least-squares method. To compare the dose-effect curves obtained for each donor with that obtained using the pooled data, a weighted *F* test for identity of parameters was used (accepting a *P* value of <0.05 as significant). To compare the frequency of each end

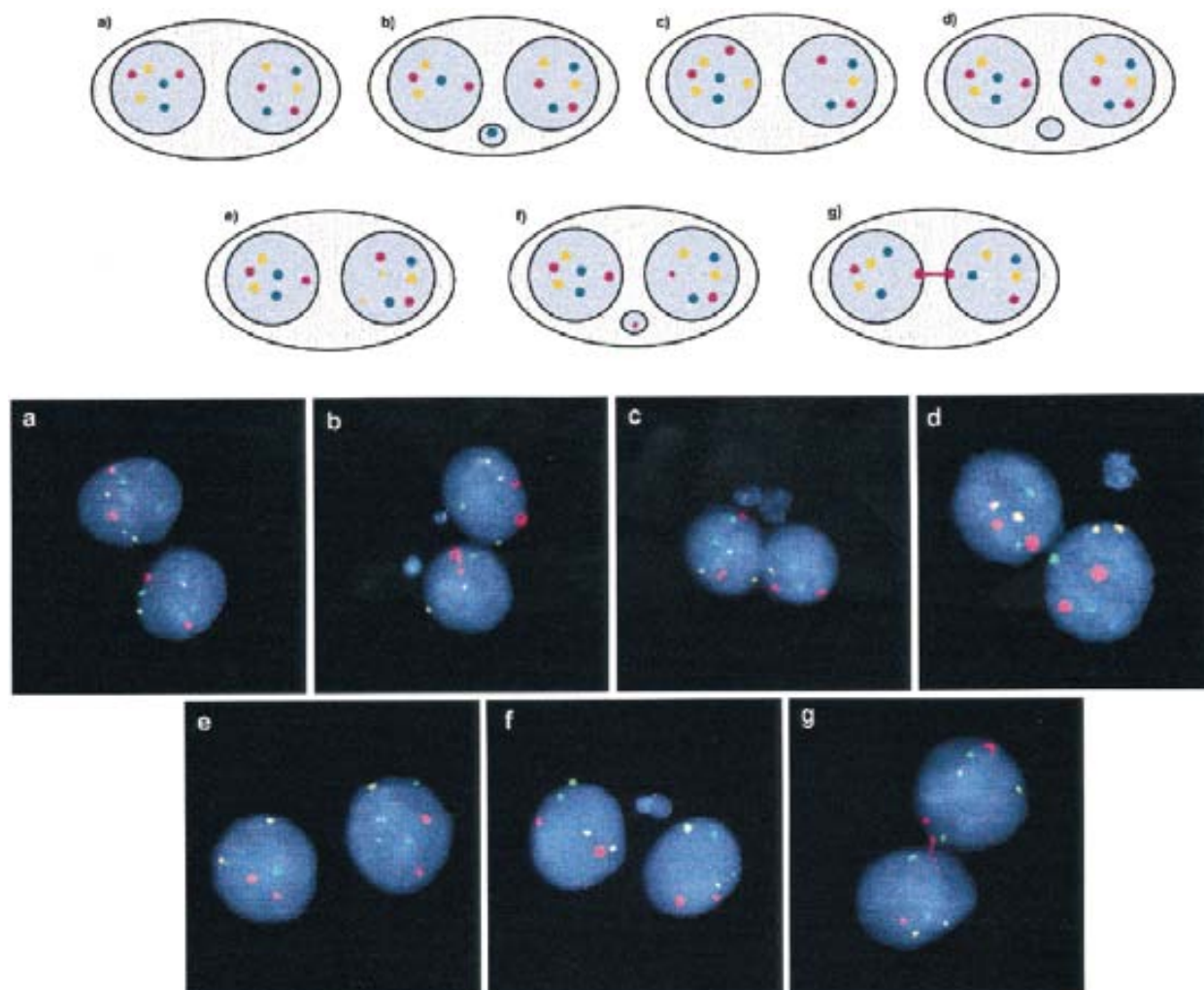


FIG. 1. Schematic representation and images of the possible events detectable using three chromosome-specific centromeric probes in binucleated lymphocytes. (a) Normal binucleated lymphocyte; (b) chromosome loss; (c) non-disjunction; (d) unlabeled chromosome or fragment loss; (e) breakage within the labeled region (both fragments in the nucleus); (f) breakage within the labeled region (one fragment in the nucleus and the other in the micronucleus); (g) nucleoplasmic bridge.

point in irradiated and control cultures, Student's *t* test was used, and for unequal variances, Satterthwaite's rule was applied. To compare binucleated cells with micronuclei, the χ^2 test was used.

RESULTS

The total number of micronuclei and their distribution among cells are shown for each donor in Table 1. For almost all doses, the micronucleus distribution follows a Poisson distribution; only for donor 2 at 2 and 4 Gy did the *U* values show overdispersion (values greater than +1.96). The background frequencies for both donors were similar ($P > 0.05$). However, after irradiation, the frequencies observed were different, and donor 2 showed higher values ($P < 0.05$). The individual values for each donor as well as the pooled data for both donors at different doses were fitted to the linear-quadratic model, $Y = C + \alpha D + \beta D^2$, where *Y* is the yield of micronuclei per cell, *C* the spontaneous frequency, *D* the dose in grays, and α and β

the linear and quadratic coefficients, respectively (Fig. 2). In spite of donor differences in the induced micronucleus frequencies, the dose-effect curve obtained when the data were pooled was not significantly different from those obtained for either donor ($P > 0.10$). The coefficients obtained with pooled data were $C = (2.71 \pm 0.97) \times 10^{-2}$, $\alpha = (3.45 \pm 2.46) \times 10^{-2}$, and $\beta = (4.92 \pm 0.80) \times 10^{-2}$. Similar results were obtained when binucleated lymphocytes with micronuclei were considered (Table 1). While donor 2 showed significantly higher frequencies at 1 and 2 Gy than donor 1 (in both cases $P < 0.04$), the dose-effect curve obtained using pooled data did not show differences from those for each donor ($P > 0.10$). The curve for pooled data was: $Y = (2.59 \pm 0.63) \times 10^{-2} + (6.51 \pm 1.40) \times 10^{-2} D + (1.99 \pm 0.39) \times 10^{-2} D^2$, where *Y* is the yield of binucleated lymphocytes with micronuclei per cell.

Table 2 shows the number of centromere-positive micronuclei and non-disjunctions for each dose of γ rays for the

TABLE 1
Micronucleus (MN) Frequency and Distribution in Binucleated Lymphocytes (BN) from Different Donors after Irradiation

Dose (Gy)	Donor	BN	BNMN ^a	MN distribution								MN/BN			<i>U</i>
				0	1	2	3	4	5	6	MN	BN	DI ^b		
0	1	1062	30	1032	30	0	0	0	0	0	0	30	0.03	0.97	-0.64
	2	1027	26	1001	26	0	0	0	0	0	0	26	0.03	0.98	-0.56
1	1	1040	95	945	88	7	0	0	0	0	0	102	0.10	1.04	0.92
	2	1022	124	898	115	9	0	0	0	0	0	133	0.13	1.01	0.14
2	1	1061	230	831	213	16	1	0	0	0	0	248	0.23	0.92	-1.84
	2	1015	283	732	223	53	6	1	0	0	0	351	0.35	1.09	2.12
4	1	1025	595	430	360	166	57	11	1	0	0	912	0.89	1.02	0.38
	2	1044	640	404	348	193	70	23	5	1	0	1067	1.02	1.11	2.63

^a Binucleated lymphocytes with micronucleus.

^b Dispersion index.

two donors and the pooled data. As expected, the frequency of chromosome loss and non-disjunction is lower than the total frequency of micronuclei, but there is also a clear increase with dose for both abnormalities. A statistically significant increase was observed in the pooled data for centromere-positive micronuclei at 2 ($P < 0.05$) and 4 Gy ($P < 0.005$) compared to 0 Gy. For non-disjunctions, statistically significant increases with respect to control values were observed for all doses ($P < 0.01$ at 1 Gy, $P < 0.005$ at 2 Gy, and $P < 0.001$ at 4 Gy). In spite of the increases observed, the low number of events made it difficult to determine the dose-effect relationships.

Table 2 also shows the observed breakages within the chromosomal region targeted by the probe. Two fragments constitute one break. Either these two fragments appeared together in the nucleus, or one was seen in the nucleus and

the other in the micronucleus, or both were present in the micronucleus. We classified breaks as being in the nuclei when both fragments were present in the nuclei and as being in the micronuclei when one or more fragments appeared in the micronuclei. In the pooled data, statistically significant increases were observed at 4 Gy ($P < 0.001$) for breakages found in the micronucleus and at 2 ($P < 0.05$) and 4 Gy ($P < 0.001$) for breakages in the nucleus.

Very thin chromatin filaments connecting both nuclei, the so-called nucleoplasmic bridges, were observed. These filaments were so thin that only those bridges partially or totally labeled with the centromeric probes could normally be observed; an unlabeled nucleoplasmic bridge was detected in only one case. These events were very rare, and the number and frequency of observations were 0 (0%), 2 (0.97%), 4 (1.93%) and 3 (1.45%) for 0, 1, 2 and 4 Gy, respectively. Although there was not a dose-response relationship, the observation of these bridges only in irradiated samples could indicate that their appearance could be related to the effects of ionizing radiation.

DISCUSSION

Even though heterogeneity was found in the micronucleus frequency for each dose of radiation except for the baseline, when the dose-response curves for each donor were compared with the curve for the pooled data, no significant differences were observed. The best-fitting curve for micronucleus induction was linear-quadratic, in agreement with other studies (8, 14, 41-46). The quadratic component is usually so small that either a linear fit (10, 47, 48) or a nonlinear fit (48, 49) is compatible with statistics.

The curve for micronucleus induction was compared with the curve for total acentrics (acentric chromosome fragments arising either from deletions or from the formation of dicentrics and rings) calculated from the data from a γ -ray calibration curve obtained previously after exposure of whole blood from donor 1 to 0-5 Gy of γ radiation (50). The γ -ray source and radiation protocol were identical to those used for quantifying γ -ray-induced micronuclei in the

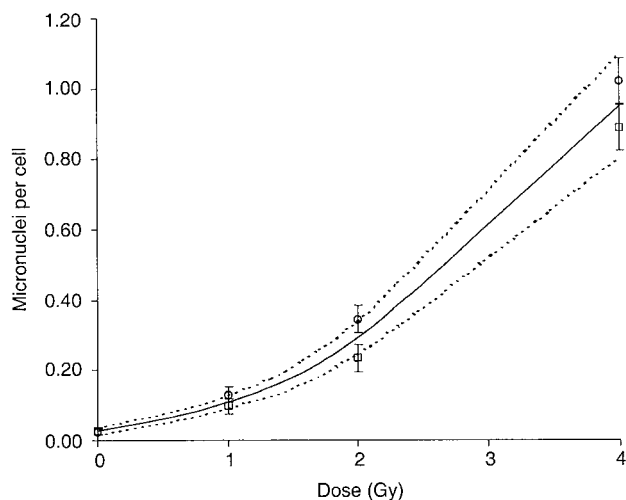


FIG. 2. Dose-effect curve for γ rays (solid line). The fitted values of the coefficients of the linear-quadratic function $Y = C + \alpha D + \beta D^2$ for the pooled data are: $C = (2.71 \pm 0.97) \times 10^{-2}$; $\alpha = (3.45 \pm 2.46) \times 10^{-2}$; $\beta = (4.92 \pm 0.80) \times 10^{-2}$. Dashed lines show the upper and lower limits of the dose-response curve taking the standard error into account. The observed frequencies of micronuclei per cell are represented by squares for donor 1 and circles for donor 2. Error bars represent the 95% confidence intervals.

TABLE 2
Centromere-Positive Micronuclei, Non-disjunction and Centromeric Breakages in Binucleated Lymphocytes from Different Donors after Irradiation

Dose (Gy)	Donor	Binucleated lymphocytes	Micronuclei	Centromere-positive micronuclei	Non-disjunction	Centromeric breakages	
						in micronuclei	in nucleus
0	1	1062	30	0	0	1	4
	2	1027	26	0	0	0	2
	T ^a	2089	56	0	0	1	6
1	1	1040	102	1	6	0	7
	2	1022	133	0	2	0	4
	T	2062	235	1	8	0	11
2	1	1061	248	3	9 (8) ^b	2 (1)	7
	2	1015	351	3	3	0	9 (7)
	T	2076	599	6	12 (11)	2 (1)	16 (14)
4	1	1025	912	4 (3)	14	5 (4)	19
	2	1044	1067	8 (7)	11	12 (8)	6
	T	2069	1979	12 (10)	25	17 (12)	25

^a Pooled data from both donors.

^b Numbers in parentheses represent the numbers of cells in which abnormalities were observed.

present study. We observed that the frequency of micronuclei at low doses was higher than that of acentrics, whereas at higher doses this relationship was inverted. Nevertheless, at low doses we cannot ensure whether the micronucleus frequency is always higher than that of acentrics or whether this difference is due to the background micronucleus frequency, because the lowest dose analyzed in the micronucleus study was 1 Gy. However, similar results were obtained by Prosser *et al.* (41), who hypothesized that at low doses micronuclei contain whole chromosomes in addition to acentric fragments, while at high doses there is a greater likelihood for two or more aberrations being in-

cluded in a single micronuclear membrane or being retained in the main nucleus so that they do not produce individual micronuclei (6, 8, 41, 45, 48, 51, 52). Support for this hypothesis is provided by our results, in which micronuclei with more than one centromeric signal were seen at high doses. The dose at when the two curves intersected was 0.7 Gy (Fig. 3). However, in our study we cannot prove that below this dose there are still micronuclei with centromeric signals, because the lowest dose analyzed was 1 Gy. Therefore, further studies with doses below 1 Gy are needed. An alternative hypothesis is that the likelihood of inclusion of micronuclei in either of the main daughter nuclei may also increase as a function of radiation dose (6, 52).

The analysis of centromere-positive micronuclei as an indicator of chromosome loss was done in those micronuclei showing an entire centromeric signal, not taking into account those with a fragmented signal, because in the latter case these micronuclei are the outcome of the clastogenic activity and not of the aneuploidogenic activity of ionizing radiation. However, the assumption that centromere-positive micronuclei contain whole chromosomes has not been proven, because micronuclei containing whole chromosomes cannot be differentiated from those containing centric fragments and rearranged chromosomes. Nevertheless, Cornforth and Goodwin (6) suggested that the formation of chromosome interchanges is not responsible for radiation-induced centromere-positive micronuclei since they found that, while the number of dicentric scored in metaphase cells decreased dramatically as the result of postirradiation incubation, the frequency of kinetochore-positive micronuclei remained unchanged. In our study, the frequency of centromere-positive micronuclei was calculated in relation to total binucleated cells analyzed (absolute frequency) instead of as a proportion of centromere-positive and centromere-negative micronuclei (relative frequency), because the absence of an increase in the proportions does

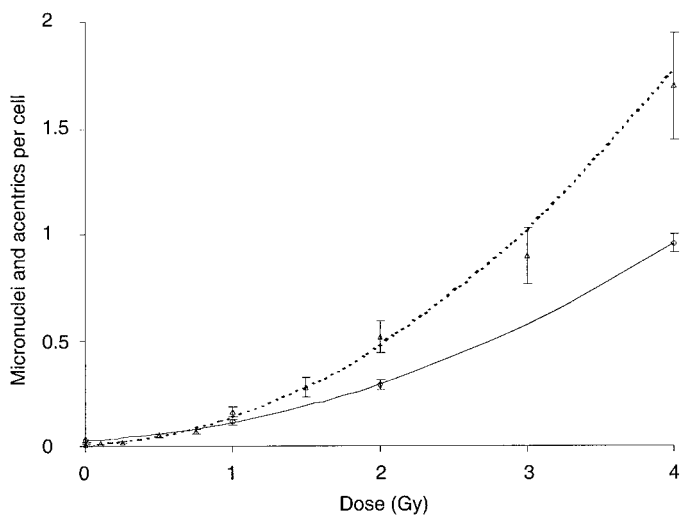


FIG. 3. Graph of micronuclei per binucleated cell (solid line) after γ irradiation for all donors, fitted to the linear-quadratic model, together with dose-response curve for total acentrics (50) [dashed line, $C = (0.74 \pm 0.16) \times 10^{-2}$; $\alpha = (2.63 \pm 1.16) \times 10^{-2}$; $\beta = (10.36 \pm 0.83) \times 10^{-3}$]. The observed frequencies of micronuclei per cell are represented by circles and the observed frequencies of acentrics per cell by triangles. Error bars represent the 95% confidence intervals.

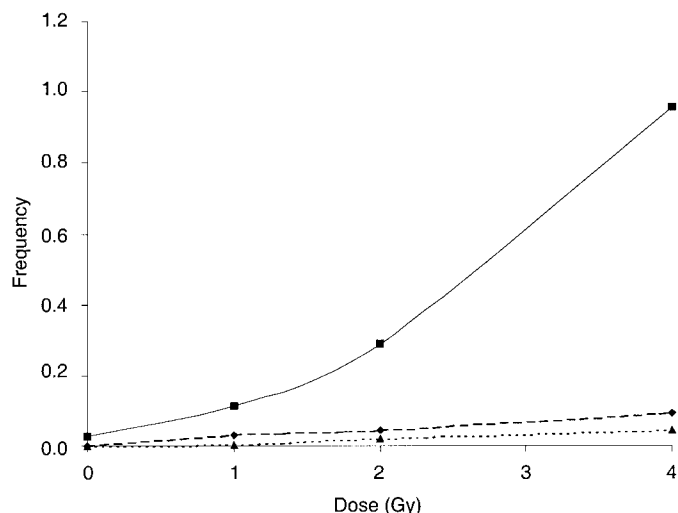


FIG. 4. Frequencies of total micronuclei (■), genomic non-disjunction (◆), and genomic chromosome loss (▲). The genomic frequencies were calculated by multiplying the observed frequencies of non-disjunctions and centromere-positive micronuclei by 46/6, assuming that both aberrations occur at random and independently for each chromosome.

not necessarily mean that there is no increase in the frequency of micronuclei containing a lagged chromosome (15). The results obtained with three centromere-specific probes show a slight but significant increase of centromere-positive micronuclei at the highest doses (2 and 4 Gy). To allow comparison with studies that have used pancentromeric probes to evaluate chromosome loss, and assuming that this event occurs randomly over the different chromosomes, a correction factor of 46/6 was applied to the observed frequencies of centromere-positive micronuclei to calculate the genomic frequency. The genomic frequency of chromosome loss in the present study was slightly lower than in previous studies (15, 21, 28) for all doses tested, but with a marked difference at the baseline frequency. This difference could be due to the impossibility of discriminating between breakages within the labeled region and whole signals using pancentromeric probes, which would not be so marked at the other doses because the majority of these fragments would be engulfed by the nuclei. This low baseline frequency was also observed in previous studies using some of the same chromosomes analyzed in the present study (19, 32).

The low frequency of chromosome loss made it difficult to establish a dose-effect curve, but based on the results obtained, this relationship would be linear. When comparisons were made between the curves obtained for the induction of total micronuclei and centromere-positive micronuclei, a clear difference was observed; the former was linear-quadratic while the latter was linear (Fig. 4). A possible explanation for the difference in the induction of total micronuclei and centromere-positive micronuclei could be related to acentric fragments accompanying dicentric and rings. These observations support the conclusion that ion-

izing radiation, although principally clastogenic, also has aneuploidogenic properties (5, 6, 12, 15, 21, 26, 28, 53).

Non-disjunction frequency for the three chromosomes was analyzed by scoring the distribution of these chromosomes between the main nuclei. A significant dose-dependent increase was observed for all doses. Applying the correction factor 46/6, the genomic frequency can be calculated assuming that this event is also random over all the chromosomes. The frequencies obtained were similar to the results of Touil *et al.* (28), except for 0 Gy, where the frequency was higher than in the present study; however, a lower value was also observed by Carere *et al.* (32). Non-disjunction frequency was higher than the frequency of centromere-positive micronuclei for all doses (Fig. 4), indicating that the main mechanism leading to radiation-induced aneuploidy is non-disjunction. Moreover, non-disjunction allows the detection of aberrations at lower doses than chromosome loss (28).

Since the clastogenic effect of ionizing radiation is well known, it is not surprising to find breaks within the labeled region. In our study, we observed these fragments in the main nuclei as well as in micronuclei, but the frequency was higher in the nuclei than in the micronuclei. This observation may support the hypothesis that there is engulfment of chromosomal material that otherwise would form micronuclei during the reformation of the nuclear membrane at the end of mitosis.

Nucleoplasmic bridges are the manifestation of anaphase bridges that result from a problem during the segregation of rearranged chromosomes. In mammalian cells, a dicentric chromosome may be oriented on the mitotic spindle in such a way that both centromeres of a single chromatid are drawn into a single daughter cell, a situation presenting no mechanical problem. However, dicentric chromatids produce anaphase bridges, and dicentric chromosomes in which there is a twist intervening between the two centromeres can become interlocked at anaphase and also give rise to anaphase bridges. The same situation occurs with rings that have an odd number of exchanges between their sister chromatids. Such nucleoplasmic bridges between daughter nuclei are generally observed in cells treated with free radical-generating systems such as ionizing radiation or hydrogen peroxide (54). The verification of this statement would be the presence of centromeres located at the end of such bridges, as observed in the present study. The presence of a centromeric signal in the bridge could be the result of a chromosome reorganization with a breakage near the labeled region.

In summary, the present study demonstrates that cytogenetic information on structural and numerical aberrations can be obtained using FISH with chromosome-specific centromeric probes. The use of this type of strategy allows simultaneous evaluation of non-disjunction and chromosome loss, which can be time consuming, but the information obtained is more accurate than that obtained with pancentromeric probes, because possible errors derived

from scoring breakages within the labeled region are avoided.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. J. Surrallés for his helpful advice on cytokinesis-block micronucleus assay, Dr. J. Savage for discussions on inclusion of micronuclei in main nuclei, Dr. M. Ribas for irradiating the blood samples, and À. Niubó for her technical assistance. We also acknowledge the predoctoral grant given by the Universitat Autònoma de Barcelona to I. Ponsa. This work was supported by the Consejo de Seguridad Nuclear (CSN, Spain) and Ministerio de Ciencia y Tecnología, PM99-0061 (Spain).

Received: April 4, 2000; accepted: October 25, 2000

REFERENCES

1. D. S. Straus, Somatic mutation, cellular differentiation and cancer causation. *J. Natl. Cancer Inst.* **67**, 233–241 (1981).
2. Z. Almassy, A. B. Krepinsky, A. Bianco and G. J. Koteles, The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. A* **38**, 241–249 (1987).
3. F. Degrassi and D. Tanzarella, Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: A new assay for the detection of aneuploidy. *Mutat. Res.* **203**, 339–345 (1988).
4. D. A. Eastmond and J. D. Tucker, Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* **13**, 34–43 (1989).
5. M. Fenech and A. A. Morley, Kinetochore detection in micronuclei: an alternative method for measuring chromosome loss. *Mutagenesis* **4**, 98–104 (1989).
6. M. N. Cornforth and E. H. Goodwin, Transmission of radiation-induced acentric chromosomal fragments to micronuclei in normal human fibroblasts. *Radiat. Res.* **126**, 210–217 (1991).
7. J. A. Heddle and A. Carrano, The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by γ -irradiation; evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutat. Res.* **44**, 63–69 (1977).
8. L. G. Littlefield, A. M. Sayer and E. L. Frome, Comparisons of dose-response parameters for radiation-induced acentric fragments and micronuclei observed in cytokinesis-arrested lymphocytes. *Mutagenesis* **4**, 265–270 (1989).
9. S. C. Hall and J. Wells, Micronuclei in human lymphocytes as a biological dosimeter: Preliminary data following beta irradiation *in vitro*. *J. Radiat. Prot.* **8**, 97–102 (1988).
10. M. Fenech and A. A. Morley, Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* **147**, 29–36 (1985).
11. M. Nüsse and J. Kramer, Flow cytometric analysis of micronuclei found in cells after irradiation. *Cytometry* **5**, 20–25 (1984).
12. J. D. Tucker and D. A. Eastmond, Use of antikinetochores antibody to discriminate between micronuclei induced by aneuploidogens and clastogens. In *Mutation and the Environment, Part B*, pp. 275–284. Wiley-Liss, New York, 1990.
13. H. Norppa, L. Renzi and C. Lindholm, Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochores staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis* **8**, 519–525 (1993).
14. M. J. Silva, A. Carothers, A. Dias, J. H. Luis, J. Piper and M. G. Boavida, Dose dependence of radiation-induced micronuclei in cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutat. Res.* **322**, 117–128 (1994).
15. M. Schuler, D. S. Rupa and D. A. Eastmond, A critical evaluation of centromeric labeling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage *in vitro*. *Mutat. Res.* **392**, 81–95 (1997).
16. P. Becker, H. Scherthan and H. Zankl, Use of centromere-specific DNA probe (p82H) in nonisotopic *in situ* hybridization for classification of micronuclei. *Genes Chromosomes Cancer* **2**, 59–62 (1990).
17. R. Huber, K. Salassidis, U. Kulka, H. Braselmann and M. Bauchinger, Detection of centromeres in vinblastine- and radiation-induced micronuclei of human lymphocytes using FISH with an α satellite pan-centromeric DNA probe. *Environ. Mol. Mutagen.* **27**, 105–109 (1996).
18. G. Falck, J. Catalán and H. Norppa, Influence of culture time on the frequency and contents of human lymphocyte micronuclei with and without cytochalasin B. *Mutat. Res.* **392**, 71–79 (1997).
19. A. Sgura, A. Antoccia, M. J. Ramírez, R. Marcos, C. Tanzarella and F. Degrassi, Micronuclei, centromere-positive micronuclei and chromosome non-disjunction in cytokinesis blocked human lymphocytes following mitomycin C or vincristine treatment. *Mutat. Res.* **392**, 97–107 (1997).
20. J. Catalán, K. Autio, E. Kuosma and H. Norppa, Age-dependent inclusion of sex chromosomes in lymphocyte micronuclei of man. *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 1464–1472 (1998).
21. H. Thierens, A. Vral, L. de Ridder, N. Touil, M. Kirsh-Volders, V. Lambert and C. Laurent, Inter-laboratory comparison of cytogenetic endpoints for the biomonitoring of radiological workers. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 23–34 (1999).
22. B. M. Miller, T. Werner, H. U. Weier and M. Nüsse, Analysis of radiation-induced micronuclei by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) simultaneously using telomeric and centromeric DNA probes. *Radiat. Res.* **131**, 177–185 (1992).
23. J.-A. Walker, D. R. Boreham, P. Unrau and A. M. V. Duncan, Chromosome content and ultrastructure of radiation-induced micronuclei. *Mutagenesis* **11**, 419–424 (1996).
24. K. Wuttke, C. Streffer and W.-U. Müller, Detection of chromosome 2 and chromosome 7 within X-ray or colchicine-induced micronuclei by fluorescence *in situ* hybridization. *Mutagenesis* **12**, 55–59 (1997).
25. C. Fimognari, S. Sauser-Nehls, H. Braselmann and M. Nüsse, Analysis of radiation-induced micronuclei by FISH using a combination of painting and centromeric DNA probes. *Mutagenesis* **12**, 91–95 (1997).
26. M. Kirsch-Volders, I. Tallon, C. Tanzarella, A. Sgura, T. Hermine, E. M. Parry and J. M. Parry, Mitotic non-disjunction as a mechanism for *in vitro* aneuploidy induction by X-rays in primary human cells. *Mutagenesis* **11**, 307–313 (1996).
27. M. J. Ramírez, J. Surrallés, P. Galofré, A. Creus and R. Marcos, Radioactive iodine induces clastogenic and age-dependent aneuploid effects in lymphocytes of thyroid cancer patients as revealed by interphase FISH. *Mutagenesis* **12**, 449–455 (1997).
28. N. Touil, A. Elhajouji, H. Thierens and M. Kirsch-Volders, Analysis of chromosome loss and chromosome segregation in cytokinesis-blocked human lymphocytes: non-disjunction is the prevalent mistake in chromosome segregation produced by low exposure to ionizing radiation. *Mutagenesis* **15**, 1–7 (2000).
29. A. Zijno, F. Marcon, P. Leopardi and R. Crebelli, Simultaneous detection of X-chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked human lymphocytes by *in situ* hybridization with a centromeric DNA probe; implications for the human lymphocyte *in vitro* micronucleus assay using cytochalasin B. *Mutagenesis* **9**, 225–232 (1994).
30. R. R. Marshall, M. Murphy, D. J. Kirkland and K. S. Bentley, Fluorescence *in situ* hybridisation with chromosome-specific centromeric probes: A sensitive method to detect aneuploidy. *Mutat. Res.* **372**, 233–245 (1996).
31. A. Zijno, P. Leopardi, F. Marcon and R. Crebelli, Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: Application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutat. Res.* **372**, 211–219 (1996).
32. A. Carere, A. Antoccia, A. Cimini, R. Crebelli, F. Degrassi, P. Leopardi, F. Marcon, A. Sgura, C. Tanzarella and A. Zijno, Analysis of chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked lymphocytes of 24 male subjects. *Mutagenesis* **14**, 491–496 (1999).
33. D. A. Eastmond and D. Pinkel, Detection of aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in situ* hybridization with chromosome specific DNA probes. *Mutat. Res.* **234**, 303–318 (1990).
34. M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, E. Cundari and P. Van Hummenlen,

- The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat. Res.* **392**, 19–30 (1997).
35. R. Huber, H. Braselmann and M. Bauchinger, Screening for inter-individual differences in radiosensitivity by means of the micronucleus assay in human lymphocytes. *Radiat. Environ. Biophys.* **28**, 113–120 (1989).
 36. R. Huber, H. Braselmann and M. Bauchinger, Intra- and inter-individual variation of background and radiation-induced micronucleus frequencies in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* **61**, 655–661 (1992).
 37. D. Beninson, D. C. Lloyd, A. T. Natarajan, G. Obe, R. J. Preston and M. S. Sasaki, *Biological Dosimetry: Chromosomal Aberrations Analysis for Dose Assessment*. Technical Reports Series 260, IAEA, Vienna, 1986.
 38. M. Fenech, The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* **285**, 35–44 (1993).
 39. C. R. Rao and I. M. Chakravarti, Some small sample tests of significance for a Poisson distribution. *Biometrics* **12**, 264–282 (1956).
 40. J. R. K. Savage, Sites of radiation-induced chromosome exchanges. *Curr. Top. Radiat. Res.* **6**, 129–154 (1970).
 41. J. S. Prosser, J. E. Moquet, D. C. Lloyd and A. A. Edwards, Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* **47**, 423–432 (1988).
 42. C. Kormos and G. J. Köteles, Micronuclei in X-irradiated human lymphocytes. *Mutat. Res.* **199**, 31–35 (1988).
 43. A. N. Balasem and A. S. K. Ali, Establishment of dose–response relationships between doses of Cs-137 γ -rays and frequencies of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.* **259**, 133–138 (1991).
 44. T-K. Lee, A. L. Wiley, J. D. Esinhart and L. D. Blackburn, Radiation dose-dependent variation of micronuclei production in cytochalasin B-blocked human lymphocytes. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **14**, 1–12 (1994).
 45. G. Köksal, D. Ö. Dalcı and F. S. Pala, Micronuclei in human lymphocytes: the Co-60 gamma-ray dose-response. *Mutat. Res.* **359**, 151–157 (1996).
 46. W-U Müller, M. Nüsse, B. M. Miller, A. Slavotinek, S. Viaggi and C. Streffer, Micronuclei: A biological indicator of radiation damage. *Mutat. Res.* **366**, 163–169 (1996).
 47. M. Fenech and A. A. Morley, Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of *in vivo* ageing and low dose X-radiation. *Mutat. Res.* **161**, 193–198 (1986).
 48. A. Ramalho, I. Sunjevaric and A. T. Natarajan, Use of frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-ray-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes: Comparison of two methods. *Mutat. Res.* **207**, 141–146 (1988).
 49. J-C. Mitchell and A. Norman, The induction of micronuclei in human lymphocytes by low doses of radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **52**, 527–535 (1987).
 50. J. F. Barquinero, L. Barrios, M. R. Caballín, R. Miró, M. Ribas, A. Subias and J. Egozcue, Establishment and validation of a dose–effect curve for γ -rays by cytogenetic analysis. *Mutat. Res.* **326**, 65–69 (1995).
 51. R. Huber, S. Streng and M. Bauchinger, The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. *Mutat. Res.* **111**, 185–193 (1983).
 52. J. R. K. Savage, A comment on the quantitative relationship between micronuclei and chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* **207**, 33–36 (1988).
 53. A. T. Natarajan, Z. Farooqi, F. Darroudi, A. S. Balajee, J. J. Boei, L. H. F. Mullenders and J. A. Gossen, *In vivo* assays for detection and evaluation of aneuploids. In *Chromosome Segregation and Aneuploidy* (B. K. Vig, Ed.), pp. 263–376. NATO ASO Series 72, Springer, Berlin, 1993.
 54. M. Fenech, The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat. Res.* **392**, 11–18 (1997).