

**Inestabilitat cromosòmica  
transgeneracional i  
radioprotecció  
en rata**

**Núria Camats Tarruella**

**Tesi doctoral**



**Inestabilitat cromosòmica  
transgeneracional i radioprotecció  
en rata**

**Núria Camats Tarruella**

**Tesi doctoral**

**Gener de 2009**



# **Inestabilitat cromosòmica transgeneracional i radioprotecció en rata**

Memòria presentada per  
**Núria Camats Tarruella**

per optar al grau de  
**doctora en Biologia Cel·lular**

Tesi realitzada sota la direcció de les doctores  
Montserrat Garcia Caldés  
i  
Francisca García Haro

a l'Institut de Biotecnologia i de Biomedicina  
de la Universitat Autònoma de Barcelona  
i  
a la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica  
del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia.  
Facultat de Medicina  
Universitat Autònoma de Barcelona

Dra. Montserrat Garcia Caldés

Dra. Francisca García Haro

Núria Camats Tarruella

Bellaterra, gener de 2009



Als meus pares



Al meu germà





*Un home no sap mai de què és capaç fins que no ho intenta*

Charles Dickens



**Índex**



<b>ÍNDEX.....</b>	<b>I</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>1</b>
1.1. ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES .....	3
1.1.1. Alteracions cromosòmiques numèriques .....	3
1.1.2. Alteracions cromosòmiques estructurals .....	3
Discontinuitats de la seqüència.....	3
Reordenacions de la seqüència .....	4
Reorganitzacions intracromosòmiques .....	5
Reorganitzacions intercromosòmiques .....	6
1.1.3. Origen de les alteracions cromosòmiques estructurals .....	7
1.1.4. Tipus de lesions del DNA i reparació.....	7
1.2. RADIACIÓ IONITZANT .....	10
1.2.1. Efectes biològics de la radiació ionitzant .....	10
1.2.2. Radioteràpia: radiosensibilitat cel·lular i gonadal.....	12
1.3. INESTABILITAT GENÒMICA I CROMOSÒMICA.....	14
1.3.1. Inestabilitat genòmica radioinduída .....	14
1.4. LLOCS FRÀGILS .....	17
1.5. SEQÜÈNCIES TELOMÈRIQUES INTERSTICIALS .....	19
1.6. ESPÈCIE ESTUDIADA: LA RATA ALBINA.....	21
1.7. OOGÈNESI.....	24
1.7.1. Meiosi.....	24
1.7.2. Fol·liculogènesi .....	25
1.7.3. Ovulació .....	25
1.7.4. Cos luti .....	26
1.7.5. Reservori fol·licular i atrèsia .....	26
Refutant el dogma: 'eggs forever?' .....	27
1.8. HORMONA ALLIBERADORA DE GONADOTROFINES.....	28
1.9. ANÀLEGS DE L'HORMONA ALLIBERADORA DE GONADOTROFINES .....	30
1.9.1. Anàlegs agonistes de l'hormona alliberadora de gonadotrofines.....	30
1.9.2. Efectes dels anàlegs agonistes enfront de la radioteràpia .....	31
<b>2. OBJECTIUS.....</b>	<b>33</b>
<b>3. MATERIALS I MÈTODES.....</b>	<b>37</b>
3.1. MATERIAL BIOLÒGIC.....	39
3.1.1. Les mares .....	39
3.1.2. Els fetus .....	39

3.1.3. Les cèl·lules .....	39
3.1.4. Els ovaris i l'úter .....	39
3.2. MÈTODES .....	43
3.2.1. Manipulació de les femelles .....	43
Tractament de les femelles amb un anàleg agonista de l'hormona alliberadora de gonadotrofines .....	43
Tractament de les femelles amb raigs X .....	43
Encreuament, seguiment de la gestació i eutanàsia .....	44
Obtenció del material biològic: ovaris, úter i fetus .....	44
Protocol d'obtenció dels òrgans genitals interns: ovaris i úter .....	44
Protocol d'obtenció dels fetus .....	49
3.2.2. Establiment dels cultius primaris de cèl·lules fetals .....	50
Protocol per a fetus de 14–17 dies de gestació .....	50
Protocol per a fetus de menys de 14 dies de gestació .....	52
Protocol per a fetus de 18 dies de gestació o més .....	53
3.2.3. Cultius primaris de cèl·lules fetals .....	53
Tractament dels cultius primaris: obtenció de subcultius .....	56
En fetus de 14–17 dies de gestació .....	56
En fetus de menys de 14 i de més de 17 dies de gestació .....	56
Tractament dels cultius primaris amb afidicolina .....	56
Preparació de la solució d'afidicolina .....	56
Inducció de fragilitat als cultius .....	57
Extracció dels cultius primaris .....	57
Condicions òptimes per a fer l'extracció .....	57
Extracció i obtenció de metafases .....	57
Avaluació del rendiment del cultiu .....	58
Extensions cel·lulars .....	59
3.2.4. Les metafases .....	59
Tècniques de citogenètica clàssica .....	59
Tinció uniforme .....	61
Tècnica de bandes G .....	61
Tècnica de bandes C .....	62
Anàlisi de les imatges .....	63
Paràmetres citogenètics estudiats .....	63
Microscòpia i suport informàtic emprats .....	63
Anàlisi de les metafases i dels punts de trencament .....	63
Hibridació <i>in situ</i> fluorescent amb sondes telomèriques .....	64
Preparació de la sonda .....	65
Preparació dels portaobjectes i desnaturalització del DNA cromosòmic .....	66
Hibridació .....	67



Posthibridació: detecció i amplificació del senyal d'hibridació .....	67
Anàlisi de les metafases i localització de les seqüències telomèriques	
intersticials .....	67
3.2.5. Paràmetres reproductius.....	68
3.2.6. Anàlisi estadística .....	68
<b>4. RESULTATS.....</b>	<b>71</b>
4.1. TREBALL I .....	73
<i>Genomic instability in rat: breakpoints induced by ionising radiation and interstitial telomeric-like sequences</i>	
N. Camats, A. Ruiz-Herrera, J. J. Parrilla, M. Acien, P. Payá, E. Giulotto, J. Egozcue, F. García, M. Garcia.	
Mutation Research (2006) 595:156–166	
4.2. TREBALL II .....	89
<i>Trans-generational radiation-induced chromosomal instability in the females enhances the action of chemical mutagens</i>	
N. Camats, F. García, J. J. Parrilla, J. Calaf, M. Martín, M. Garcia Caldés	
Mutation Research (2008) 640:16–26	
4.2 TREBALL III .....	105
<i>The GnRH analogue triptorelin confers ovarian radio-protection to adult female rats</i>	
N. Camats, F. García, J. J. Parrilla, J. Calaf, M. Martín-Mateo, M. Garcia Caldés	
Mutation Research (2009) (Accepted)	
4.4. TREBALL IV .....	135
Cromosomes i bandes cromosòmicament inestables en <i>Rattus norvegicus</i>	
RESULTATS.....	139
4.4.1. Inestabilitat cromosòmica i radioprotecció per l'anàleg agonista de l'hormona alliberadora de gonadotrofines .....	140
Els cromosomes .....	140
Les bandes cromosòmiques .....	140
4.4.2. Efectes de l'afidicolina a <i>Rattus norvegicus</i> .....	141
4.4.3. Llocs fràgils a <i>Rattus norvegicus</i> .....	142
DISCUSSIÓ .....	158
<b>5. DISCUSSIÓ.....</b>	<b>161</b>

<b>6. CONCLUSIONS</b> .....	<b>167</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>171</b>
<b>8. ABREVIATURES</b> .....	<b>193</b>
<b>AGRAÏMENTS</b> .....	<b>199</b>

# 1. Introducció

*Els grans coneixements engendren grans dubtes.*

Aristòtil



## 1.1. ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES

L'objecte i alhora l'eina d'estudi en citogenètica és el cromosoma. El nombre  $n$  correspon als diferents cromosomes d'una espècie, i la ploïdia, a la seva dotació cromosòmica. En general, les cèl·lules somàtiques tenen una dotació cromosòmica diploide ( $2n$ ) i les cèl·lules germinals són haploides ( $n$ ). La condició diploide implica l'existència de parells de cromosomes, que contenen una seqüència gènica homòloga, els quals reben el nom de cromosomes homòlegs.

El conjunt de cromosomes d'una espècie, d'un individu o d'una cèl·lula, ordenats per parells de cromosomes homòlegs segons la mida i segons la morfologia conformen el cariotip. L'idiograma n'és la representació idealitzada, que ens ajudarà a estudiar-lo. Les alteracions (o les aberracions) que es poden produir en els cromosomes poden ser numèriques i estructurals.

### 1.1.1. Alteracions cromosòmiques numèriques

Les alteracions cromosòmiques (AC) numèriques afecten el nombre cromosòmic normal de l'espècie ( $2n$ ) i inclouen les aneuploïdies i les poliploïdies.

Les aneuploïdies impliquen que hi ha més o menys cromosomes que el nombre diploide. Les monosomies, les trisomies i les tetrasomies són termes que indiquen diferents tipus d'aneuploïdies: la trisomia del cromosoma 21, altrament coneguda com la síndrome de Down ( $47,XX,+21$ ), o la síndrome de Turner ( $45,X$ ), que correspon a la monosomia del cromosoma X, per exemple. Les poliploïdies impliquen un nombre múltiple de la dotació haploide ( $n$ ), com la triploïdia ( $3n$ ) i la tetraploïdia ( $4n$ ).

### 1.1.2. Alteracions cromosòmiques estructurals

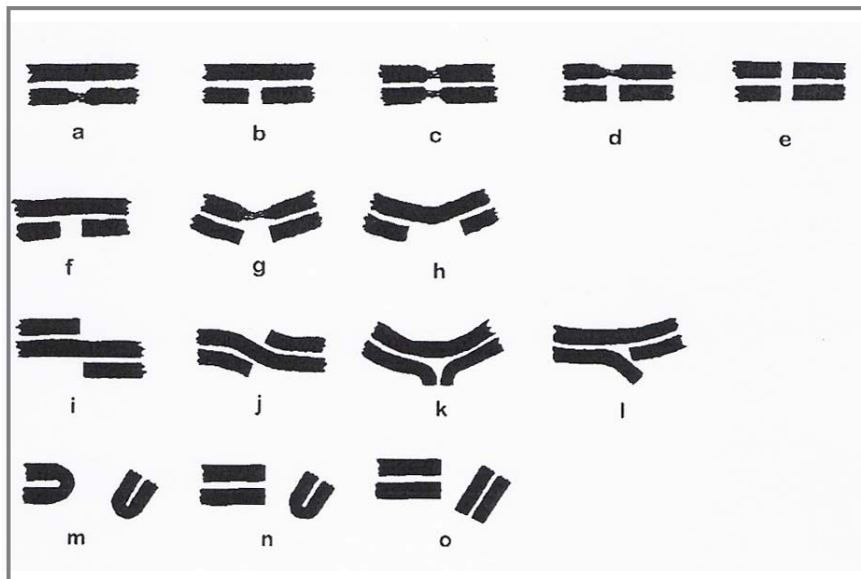
Les AC estructurals són el resultat d'una llarga cadena d'esdeveniments, entre els quals s'inclouen els trencaments, tant espontanis com induïts, en la seqüència de DNA. Les AC es poden produir en totes les fases del cicle cel·lular. Segons en quina fase del cicle s'hagi produït el trencament de la molècula del DNA, hi ha alteracions del tipus cromàtide, en què estarà afectada només una cromàtide; o tipus cromosoma, en què estan implicades ambdues cromàtides (Kimball, 1987). Si l'aberració es produeix durant l'estadi de presíntesi del DNA (pre-S, o  $G_1$ ) produirà majoritàriament AC tipus cromosoma, mentre que quan l'exposició succeeix durant l'estadi de postsíntesi del DNA (post-S, o  $G_2$ ), s'induiran AC tipus cromàtide, ja que el DNA ja està replicat (Kimball, 1987). Les AC estructurals poden significar tant una discontinuïtat com una reordenació de la seqüència del genoma.

#### **Discontinuitats de la seqüència**

Es classifiquen en:

(a) *Gap* o *lesió acromàtica*: és una regió molt poc o gens tenyida del cromosoma, que s'origina per un trencament. Es tracta d'una lesió cromosòmica d'amplada menor que el gruix d'una cromàtide. En alguns casos, fins i tot es pot observar un filament prim de cromatina que connecta tots dos extrems del gap i que confirma l'existència d'aquesta lesió acromàtica. Pot

ser de tipus cromàtide (chtg), o de tipus cromosoma (chsg). A vegades es pot confondre amb les constriccions secundàries cromosòmiques que poden arribar a complir els criteris dels *gaps* (**figura 1.1**; Savage, 2004).



**Figura 1.1.** El continu gap–trencament: (a) constricció de cromàtide; (b) gap de cromàtide; (c) constricció cromosòmica; (d) constricció/gap; (e) gap de cromosoma; (f–h) exemples de trencaments de cromàtide alineats; (i–l) exemples de trencaments de cromàtide desalineats; (m) trencament de cromosoma amb unió completa de cromàtides germanes; (n) trencament de cromosoma amb unió de cromàtides germanes incompleta; (o) trencament de cromosoma sense unió de cromàtides germanes (adaptada de Savage, 2004).

(b) *Trencament (break)*: s'origina, com el seu nom indica, per un trencament. Pot ser de tipus cromàtide (chtb), o de tipus cromosoma (chsb). Pot presentar diferents morfologies i en alguns casos, es pot confondre amb altres tipus d'alteracions. Es pot confondre amb un *gap* si hi ha discontinuïtat, però els extrems de l'alteració segueixen la mateixa direcció (**figura 1.1f**). En aquest cas, se segueix el criteri de classificar la lesió com un trencament si té una amplada igual o major que el gruix d'una cromàtide. També es pot confondre amb una deleció terminal quan el trencament és terminal i no s'identifica un fragment acèntric prop del cromosoma.

(c) *Deleció terminal*: s'origina per un trencament i consisteix en la pèrdua d'un fragment terminal del cromosoma. Pot ser de tipus cromàtide (del cht), o de tipus cromosoma (del chs).

La distinció d'aquest tipus de lesions entre si és controvertida i la naturalesa de la seva diferència encara no està clara. De fet, hi ha autors que defensen un continu gap–trencament (**figura 1.1**; Savage, 2004).

### **Reordenacions de la seqüència**

Les reordenacions de la seqüència poden succeir dins del mateix cromosoma (intracromosòmiques) o bé entre dos o més cromosomes (intercromosòmiques). També poden considerar-se estables/simètriques o inestables/asimètriques. Es consideren estables si es conserven al llarg del cicle cel·lular i en les successives generacions cel·lulars, i inestables, si

presenten conformacions que es van perdent a mesura que la cèl·lula es va dividint, amb tendència a la inestabilitat i/o a la pèrdua anafàsica. A causa d'aquestes reordenacions inestables es poden produir noves AC inestables.

#### Reorganitzacions intracromosòmiques

(a) *Inversió (inv)*: és una reorganització estable. S'origina per un o dos trencaments de la seqüència, el fragment generat es gira 180° i es forma un cromosoma amb una part de la seqüència invertida. La inversió pericèntrica succeeix quan hi ha un trencament a cada braç i, per tant, la nova seqüència inclou el centròmer. En la inversió paracèntrica, tots dos punts de trencament estan dins del mateix braç cromosòmic i, per tant, es conserva la morfologia del cromosoma.

(b) *Cromosoma en anell (ring, r)*: és una reorganització inestable. S'origina per dos trencaments de la seqüència, un a cada braç cromosòmic, seguits per una reassociació dels extrems pròxims (interns) i produint al final tres fragments/cromosomes que poden ser:

- el cromosoma en anell cèntric i dos fragments acèntrics, que poden fusionar-se o no
- el cromosoma en anell acèntric i un fragment cèntric (o dos fragments, l'un amb centròmer i l'altre, sense).

(c) *Fragment acèntric (ace)*: pot ser de cromosoma (ace cht) o de cromàtide (ace cht). És considerat inestable i s'origina per un trencament en la seqüència i la pèrdua posterior d'aquest fragment, que habitualment correspon a la part distal del trencament. S'origina tant per discontinuïtats com per trencaments de cromosoma i de cromàtide, formacions de cromosomes (o cromàtides) en anell, cromosomes dicèntrics, i altres reorganitzacions cromosòmiques més complexes, etc.

(d) *Deleció intersticial (del)*: s'origina per un doble trencament en un cromosoma o cromàtide, amb la posterior eliminació del segment del mig i la reassociació tots dos extrems. El segment del mig, segons la mida, pot arribar a formar un anell acèntric, o bé observar-se com a fragment acèntric.

(e) *Duplicació (dup)*: consisteix en l'addició d'un fragment del mateix cromosoma, com a resultat d'un intercanvi asimètric entre cromosomes homòlegs. Per tant, es produirà una duplicació en un cromosoma i una deleció intersticial de la seqüència en l'altre homòleg, o bé entre les cromàtides d'un mateix cromosoma. Normalment es produeixen en tàndem (repeticions de la seqüència seguides en el mateix sentit), o bé en tàndem invertit (quan la seqüència està en sentit oposat a la seqüència original). Si no és una seqüència molt gran, no es pot detectar per citogenètica clàssica.

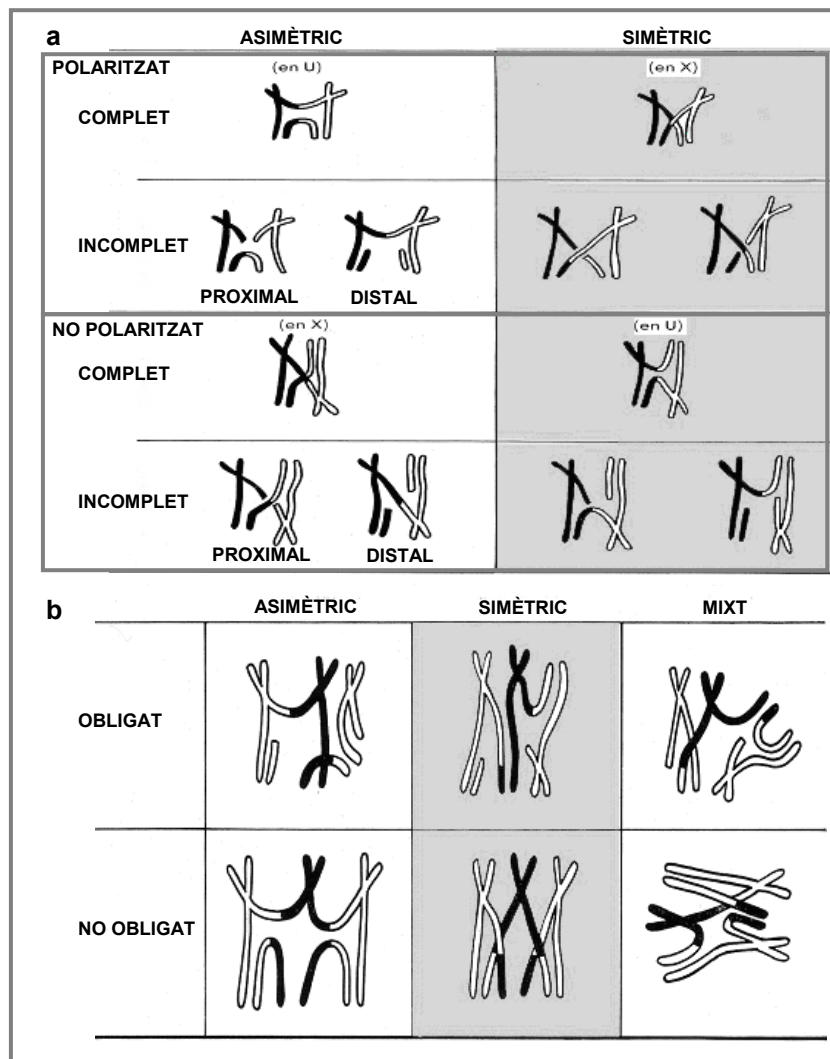
(f) *Isocromosoma (iso)*: cromosoma amb els dos braços iguals però amb la seqüència invertida. Es forma quan el punt de trencament és el centròmer, queden tots dos braços separats i es produeix una fisió. Llavors, un dels braços passaria per un procés de duplicació de la seqüència (formant un nou cromosoma, l'isocromosoma) i l'altre braç es perdria. És considerat estable perquè, en tenir centròmer, pot segregat durant la mitosi.



Reorganitzacions intercromosòmiques

Les reorganitzacions entre dos cromosomes s'originen per dos trencaments, un en cada cromosoma. Posteriorment, es produeix una fusió de fragments corresponents a ambdós cromosomes, que s'anomena translocació (o fusió) cromosòmica. Depenent del tipus de resultat, obtindrem:

(a) *Cromosomes translocats*, per una *translocació cromosòmica recíproca* (t): són estables, ja que cadascun posseeix un centròmer.



**Figura 1.2.** Intercanvis de cromàtide simples (a) i complexos (b) (adaptada d'Egozcue *et al.*, 1978).

(b) *Cromosoma dicèntric* (dic) + *fragment/s acèntric/s* (ace): Amdós són inestables, ja que el resultat final de la reorganització intercromosòmica produeix un cromosoma amb dos centròmers (fusió de dos fragments amb centròmer) i un fragment acèntric, corresponent a la fusió dels fragments restants, o dos fragments acèntrics, quan no es fusionen els dos fragments restants, o romanen separats.

(c) *Inserció* (ins): quan es trasllada un fragment/segment cromosòmic intersticial (doble trencament en un cromosoma) dins d'un altre cromosoma, que també ha patit doble trencament.

Quan es produeixen dos (o més) trencaments en dues (o més) cromàtides diferents de dos (o més) cromosomes diferents, homòlegs o no, i, posteriorment, hi ha un intercanvi de fragments es poden produir *intercanvis de cromàtide* entre els diferents cromosomes. També s'anomenen *figura radial* o *reorganització (inter)cromosòmica* (re). Són reorganitzacions cromosòmiques que no es poden incloure en cap de les anteriors classificacions (**figura 1.2**). Depenent del tipus d'intercanvi seran simètriques o asimètriques; estables o inestables; polaritzades o no polaritzades; completes o incompletes; obligades o no obligades; i simples (entre dos cromosomes) o complexes (entre més de dos cromosomes). En alguns casos poden arribar a ser "indesxifrables" (**figura 1.2**; Egozcue *et al.*, 1978).

Les reorganitzacions cromosòmiques simples són les que succeeixen entre dos cromosomes: es produeix un quadriradial (o quiasma mitòtic) (i) simètric, quan produeix dos cromosomes, o (ii) asimètric, quan produeix un cromosoma dicèntric i un fragment acèntric (**figura 1.2a**; Egozcue *et al.*, 1978). Les reorganitzacions cromosòmiques complexes succeeixen entre tres o més cromosomes, i produeixen figures radials/cromosòmiques complexes (**figura 1.2b**; Egozcue *et al.*, 1978).

### 1.1.3. Orígen de les alteracions cromosòmiques estructurals

La teoria de l'origen de les alteracions cromosòmiques estructurals actualment més acceptada és la *teoria del trencament i reunió* (*B&R theory*, Savage, 2004). Aquesta teoria considera que un agent genera trencaments en un cromosoma i deixa dos extrems oberts. Aquests trencaments poden seguir tres camins diferents: (a) que es reconstitueixi l'estructura cromosòmica original; (b) que hi hagi una unió ilegítima entre dos extrems provinents d'altres trencaments pròxims en l'espai i el temps, formant alteracions tipus intercanvi; o bé (c) que els extrems no es reuneixin i produeixin així delecions terminals (Savage, 2004).

Per tant, el que està implícit en aquesta teoria és que els *trencaments* visibles en la metafase són el *residu* de les lesions primàries que no s'han restablert (unions legítimes) o reajuntat (unions ilegítimes) i que el que estem veient al microscopi és el potencial progenitor d'alteracions d'intercanvi (Savage, 2004).

### 1.1.4. Tipus de lesions del DNA i reparació

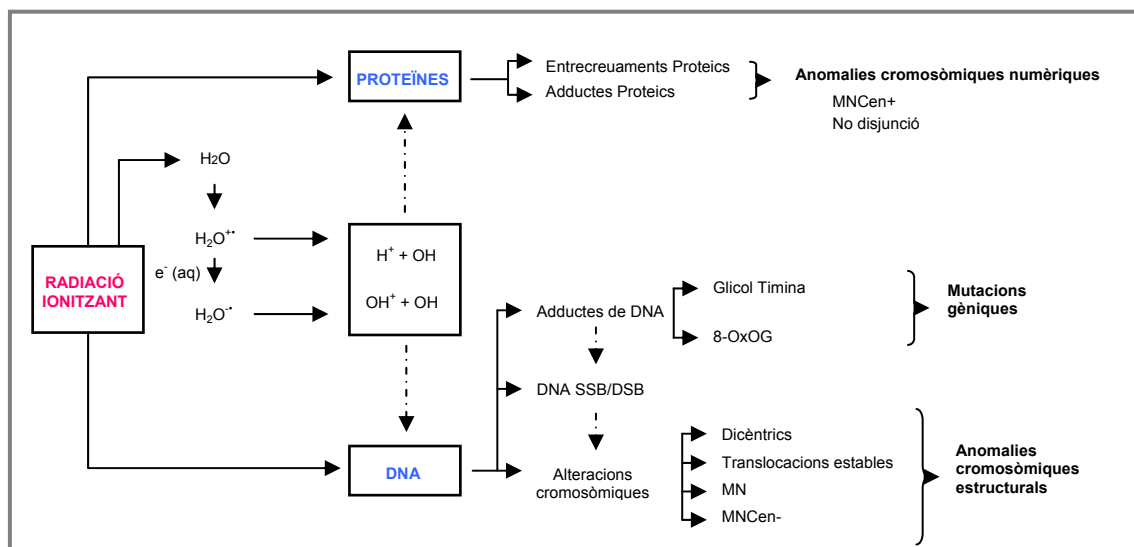
Una lesió en el DNA és una alteració de la estructura d'aquesta molècula capaç de produir un perjudici a la cèl·lula (Kauffmann i Paules, 1996) i que, per tant, més endavant pot arribar a causar una mutació. Aquestes lesions poden ser tant espontànies com induïdes. N'hi ha de tres tipus (Natarajan *et al.*, 1993):

(a) els *danys de base* (DB): que consisteixen en (i) unions covalents de bases adjacents que, com a conseqüència, formaran dímers; (ii) alteracions químiques d'una base; o

bé (iii) pèrdues d'alguna base. Poden originar una addició, deleció o substitució d'un nucleòtid per un altre.

(b) les unions creuades de cadenes de DNA o *unions DNA-DNA*, que són unions covalents entre cadenes de DNA no adjacents

(c) els *trencaments de la cadena del DNA*: que són una pèrdua de la continuïtat de la seqüència nucleotídica del DNA. Poden ser *trencaments de cadena senzilla (SSB)* quan afecten a una sola cadena; o *trencaments de doble cadena (DSB)*, si afecten totes dues cadenes, quan els punts de trencament estan com a màxim a tres nucleòtids de distància (**figura 1.3**).



**Figura 1.3.** Els efectes de la radiació ionitzant. La radiació ionitzant actua directament sobre les proteïnes i pot arribar a produir anomalies cromosòmiques numèriques. També actua directament i indirectament (mitjançant la radiòlisi de l'H<sub>2</sub>O) sobre el DNA. L'acció de les radiacions ionitzants sobre el DNA poden produir mutacions gèniques i alteracions cromosòmiques estructurals. e<sup>-</sup> (aq): electró hidratat reactiu; H<sub>2</sub>O<sup>+</sup>: aigua ionitzada; H<sub>2</sub>O<sup>-</sup>: ió d'aigua carregat negativament; MN: micronuclis; MNCen+: micronuclis amb centròmer; MNCen-: micronuclis sense centròmer (adaptada de Mateuca *et al.*, 2006).

El cicle cel·lular té una sèrie de punts de control integrants del sistema de reparació, que coordinen la cooperació entre la maquinària del cicle i els diferents processos bioquímics de resposta a les lesions del DNA (Hartwell i Kastan, 1994). En les cèl·lules, hi ha diferents mecanismes de resposta als agents mutagènics que inclouen processos de transducció de senyals i mecanismes de reparació del DNA. Aquests mecanismes de reparació són capaços de detectar i reparar el dany induït en el DNA, són molt eficaços i corregeixen la majoria de modificacions de la molècula. N'hi ha de diferents tipus en funció del tipus de lesió i el mecanisme pel qual reparen.

Mentre que els SSB i els danys de base es poden reparar fàcilment, ja que la cadena intacta es pot utilitzar com a motlle per restaurar la informació original, això no passa en els DSB. La seva reparació es fa mitjançant processos de recombinació genètica, basant-se en l'intercanvi de seqüències de DNA amb altres zones del genoma que guarden certa homologia amb el punt lesionat (reparació per recombinació homòloga i reparació per unió de fragments no homòlegs).

En algunes ocasions, podria haver-hi una ineficàcia d'aquests mecanismes de reparació. Això succeix, per exemple, quan hi ha dany massiu; quan les lesions són molt complexes; quan alguna proteïna reparadora és defectuosa; o bé quan s'utilitzen mecanismes amb tendència a l'error, que es creu que intervindrien en situacions de saturació dels mecanismes lliures d'error (Carr i Hoekstra, 1995).

## 1.2. RADIACIÓ IONITZANT

A la natura, hi ha agents que poden interaccionar de manera directa o indirecta amb la molècula del DNA i lesionar-la. Aquests agents, denominats *mutàgens*, poden ser exògens o endògens als éssers vius. Els agents exògens es poden classificar en físics, químics, biològics i minerals, depenent del seu origen i composició. Entre els agents físics, hi trobem la radiació ultraviolada i la radiació ionitzant (RI).

La RI interacciona amb la matèria alliberant energia i excitant el receptor, i es produeix la ionització (resultat de l'expulsió d'un electró) dels àtoms i molècules que constitueixen el medi material per on ha penetrat. N'hi ha de dos tipus: les radiacions corpusculars i les ones electromagnètiques (**figura 1.3**).

Les radiacions corpusculars (les partícules subatòmiques  $\alpha$ ,  $\beta$  i els neutrons) tenen massa i càrrega (positiva, negativa o neutra) i tenen un poder de penetració baix (només uns quants mil·límetres). Són emeses per isòtops radioactius i per reaccions nuclears. En canvi, les ones electromagnètiques, en què s'inclouen els raigs X i  $\gamma$ , són pertorbacions del camp electromagnètic, no tenen ni càrrega ni massa, i alliberen la seva energia en forma de fotons. Tenen un gran poder de penetració i poden arribar als diferents teixits dels éssers vius.

La dosi de radiació absorbida (D) és la magnitud dosimètrica fonamental de la RI i ens indica l'energia dipositada (absorbida per la matèria) per unitat de massa (del material receptor de la radiació). La seva unitat és el Gray (Gy), que equival a un Joule (J) per kg. Aquesta magnitud és quantitativa i independent de l'efecte causat a la matèria. Una irradiació entre 2 i 10 Gy és considerada una dosi elevada de radiació (UNSCEAR, 1986).

### 1.2.1. Efectes biològics de la radiació ionitzant

Diem que la RI té un efecte biològic directe sobre la molècula de DNA si la ionització o l'excitació es produeix directament en el DNA. En canvi, si la ionització o l'excitació es produeix en altres molècules, principalment en l'aigua, aquesta genera radicals lliures que posteriorment poden danyar el DNA i les proteïnes. En aquest cas, diem que es produeix un efecte indirecte de la RI sobre el DNA (**figura 1.3**). De fet, el DNA constitueix un percentatge molt petit de la composició cel·lular i, per tant, els àtoms que s'ionitzen de manera preferent són els que estan en més proporció (l'oxígen i l'hidrogen de l'aigua, com a component majoritari de les cèl·lules).

S'ha de tenir en compte que els mutàgens (parlant genèricament) poden induir canvis al genoma, tant pel fet d'incidir directament sobre el DNA, com de manera indirecta, quan afecten proteïnes implicades en el manteniment de la integritat genòmica (**figura 1.3**; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

Les AC induïdes per la RI són el resultat d'una llarga cadena d'esdeveniments: la lesió premutacional en el DNA (associacions DNA-DNA i/o DNA-proteïnes, SSB, DSB), la no-reparació del dany i la fixació de la mutació (**figura 1.3**). Actualment està majoritàriament acceptat que els SSB i sobretot els DSB constitueixen la majoria de lesions del DNA produïdes per la RI (Natarajan, 1984; Vyas *et al.*, 1991). Aquestes lesions premutacionals poden produir diferents tipus d'alteracions al genoma, des de mutacions gèniques fins a AC estructurals o

numèriques (Witt i Bishop, 1996). Els DSB són els principals responsables de l'aparició de les AC (**figura 1.3**; Savage, 1990; Natarajan, 1993). També s'ha de tenir en compte que les cèl·lules exposades a la RI poden desenvolupar una inestabilitat genòmica o patir apoptosi (Kadhim *et al.*, 1995). De fet, la RI pot arribar a ser causa de malalties genètiques i càncer en l'individu que la pateixi.

La RI pot afectar tant les cèl·lules somàtiques com les cèl·lules germinals. Si afecta les cèl·lules somàtiques, l'alteració resultant tindrà conseqüències, més o menys greus, en l'individu. Ara bé, quan en són afectades les cèl·lules germinals, tant les cèl·lules mare prèvies als gàmetes (oogònies, espermatogònies) com els gàmetes (oòcits i espermatozoides), el dany podrà comprometre la reproducció d'aquest individu. A més, aquest dany es podrà transmetre a la seva descendència, i a les generacions següents.

Els efectes citogenètics de la RI s'han estudiat majoritàriament mitjançant raigs X i  $\gamma$ . En l'espècie humana, la majoria d'aquests estudis s'han fet en casos de radiació accidental o en pacients amb càncer tractats amb radioteràpia.

Les anàlisis citogenètiques amb tècniques de patró de bandes per a la localització dels trencaments cromosòmics i les reorganitzacions són escasses. Diversos estudis han demostrat que els raigs X produeixen trencaments i reorganitzacions que no es produeixen a l'atzar, sinó que s'acumulen en punts específics del genoma, la qual cosa expressa que hi ha regions en el genoma més propenses a trencar-se després de ser tractades. Aquesta distribució no a l'atzar de trencaments per raigs X ha estat provada en estudis citogenètics previs en primats (Borrell *et al.*, 1998a; 1998b; Ruiz-Herrera *et al.*, 2002a), incloent-hi l'espècie humana (Barrios *et al.*, 1989).

També s'ha descrit la correspondència citogenètica entre punts de trencament per la RI i llocs fràgils, protooncogenes, punts de trencament implicats en reorganitzacions en càncer i punts de trencament implicats en l'evolució cromosòmica i en seqüències telomèriques intersticials (Yunis, 1983; Yunis and Soreng, 1984; Le Beau i Rowley, 1984; Heim i Mitelman, 1987; Miró *et al.*, 1987; Barrios *et al.*, 1989; Álvarez *et al.*, 1993; Fernández *et al.*, 1995; Ruiz-Herrera *et al.*, 2002a; 2002b; 2005a; 2005b).

Pel que fa als rosegadors, hi ha molt pocs estudis dels efectes citogenètics de la RI en la línia germinal (ratolí: Tease and Fisher, 1991; Johansson *et al.*, 1994; Tease and Fisher, 1996a; 1996b; rata: Pujol *et al.*, 1996; 1997; Martínez-Flores, 1997; Martínez-Flores *et al.*, 1998; 2000).

Entre els factors que determinen el tipus de lesió i el seu efecte final, n'hi ha de físics, de químics i de biològics. Els factors químics poden ser radiosensibilitzadors o bé radioprotectors. Els radiosensibilitzadors actuen augmentant la sensibilitat de l'individu si s'administren abans o durant l'exposició a la RI. En canvi, els radioprotectors disminueixen l'eficàcia de la dosi d'irradiació si són presents en el moment de l'exposició.

Els factors biològics estan relacionats amb el tipus de cèl·lula diana i la fase del cicle cel·lular en què es troba. Quan les cèl·lules són joves, més indiferenciades, o amb un ritme de divisió més ràpid, com en el cas de les cèl·lules tumorals, presenten més radiosensibilitat que quan les cèl·lules són velles, diferenciades, o amb un ritme de divisió més lent. Quant a la fase del cicle cel·lular en què ha actuat la RI, la fase S tardana i la G<sub>2</sub> són més resistents que la fase G<sub>1</sub> i la S primerenca.

### 1.2.2. Radioteràpia: radiosensibilitat cel·lular i gonadal

Pel que fa a la radiosensibilitat dels individus tractats, la RI té efectes adversos en la funció gonadal a totes les edats. L'habilitat de recuperació i la fertilitat relativa en els supervivents de diferents tipus de càncer varia considerablement segons el sexe, la localització del càncer, el tipus de tractament (Byrne *et al.*, 1987) i la dosi total administrada (Damewood i Grochow, 1986).

En estudis clínics durant els anys 80 del segle passat, es va observar que nenes tractades amb radioteràpia eren menys vulnerables al dany gonadal que dones adultes sotmeses al mateix tractament (Whitehead *et al.*, 1982). Al mateix temps, nombroses noies joves prepuberals tractades per leucèmia infantil tenien una prognosi excel·lent pel que feia a la progressió puberal normal i a la funció reproductiva (Siris *et al.*, 1976), la qual cosa indica que el tractament i l'ocurrència de la leucèmia en estadis anteriors a la pubertat tenien un efecte menys advers que si la malaltia aparegués durant la pubertat o després de la menarquia (Siris *et al.*, 1976). Així doncs, des de fa més de 30 anys, es té la certesa que el grau de desenvolupament puberal en el moment del tractament inicial és un factor molt important en la preservació del funcionament normal de l'eix hipotàlem-hipòfisi-ovari (Siris *et al.*, 1976); i que un estat prepúber, induït o no, faria que la gònada fos menys sensible a l'acció citotòxica de la radioteràpia (Waxman, 1987).

Altrament, la susceptibilitat a la mort cel·lular induïda per la RI depèn de l'estadi de desenvolupament de la cèl·lula germinal i del temps d'exposició (Damewood i Grochow, 1986). L'ovari no és tan sensible a la RI com el testicle, ja que en els testicles hi ha una divisió mitòtica i meiòtica constant, que contrasta amb l'activitat meiòtica (que no mitòtica) dels oòcits en cada cicle menstrual (Damewood i Grochow, 1986). Tal com ja és ben sabut, les cèl·lules en divisió són molt més sensibles a la quimioteràpia i a les radiacions.

En mascles, les espermàtides són quaranta vegades més radioresistents que les espermatogònies (en divisió continuada); mentre que aquestes, i en particular les de tipus B, són les cèl·lules més radiosensibles. (Damewood i Grochow, 1986). En una femella, la radiosensibilitat és alta en l'oogònia proliferant. En l'espècie humana, a mesura que l'oòcit va passant per les diferents fases de la profase I meiòtica, la radioresistència va augmentant (Damewood i Grochow, 1986). En els ovaris, els oòcits estan en un estat semblant a la *quiescència* durant molt temps, encara que sí que hi ha mitosis pel que fa a la resta de les cèl·lules que formen el fol·licle en creixement. Pel que fa a la dosi, aquesta afecta la proporció



d'òocits degenerats. En estudis amb models animals, dosis suficients per a destruir fol·licles primaris no han afectat els òocits dels fol·licles de Graaf (Damewood i Grochow, 1986).

En els rosegadors, la sensibilitat de l'òocit depèn en gran mesura del seu estadi fol·licular. Durant l'etapa prenatal, les oogònies són especialment sensibles a la RI, sobretot durant la darrera divisió premeiòtica, i s'incrementa la seva radioresistència a mesura que l'òocit va passant per les etapes de la meiosi I. Pel que fa als òocits I dels fol·licles primordials, sembla que són els més sensibles a la RI en relació amb la inducció de mort cel·lular, però al mateix temps resistents a la inducció de mutacions, ja que no estan protegits per les cèl·lules fol·liculars de la granulosa, que en estadis posteriors reben l'impacte de la RI i ofereixen major resistència a l'òocit (Tateno i Mikamo, 1989). En contrast amb aquest resultat, altres estudis indiquen que els estadis preovulatoris de l'òocit propers a la metafase I són els més sensibles a la inducció de lesions per RI (Tease i Fisher, 1996a; 1996b; per revisar aquest tema, veieu Garcia Caldés *et al.*, 2006).

En funció de l'edat, el grau i l'eficàcia de reparació van disminuint, tant pel que fa a dosis altes com a dosis baixes de RI (Tease i Fisher, 1991). També hi ha diferències de sensibilitat entre espècies. En els primats, incloent-hi l'espècie humana, els fol·licles en creixement són més sensibles que els fol·licles primordials, especialment pel que fa a la mort cel·lular, cosa que podria explicar l'esterilitat temporal observada posteriorment a la irradiació, en la qual s'eliminarien principalment fol·licles madurs però no els immadurs. En ratolins femella, s'observa una esterilitat permanent, ja que les cèl·lules danyades serien els òocits immadurs (Tateno i Mikamo, 1989).

Dades del nostre grup (Pujol *et al.*, 1996; Martínez-Flores *et al.*, 1998) indiquen que en femelles de rata (fetus, prepúber i adultes), la genotoxicitat heretada provocada per RI es manifesta en l'etapa prenatal per una disminució de les cèl·lules germinals en fetus, mentre que en l'etapa postnatal hi ha una disminució d'embrions vius en la primera generació postirradiació.

Estudis en poblacions humanes exposades a molta radiació (catàstrofes nuclears, en particular, amb bombes atòmiques), indiquen unes taxes altíssimes d'avortaments, no-nats i complicacions durant la gestació. El risc de mortalitat dins de les dues primeres generacions postirradiació és molt alta. No obstant això, i de manera esperançadora, les generacions posteriors d'individus tractats amb quimioteràpia o radioteràpia mostren incidències d'avortament espontani i d'anormalitat fetal iguals a la població control (Damewood i Grochow, 1986).

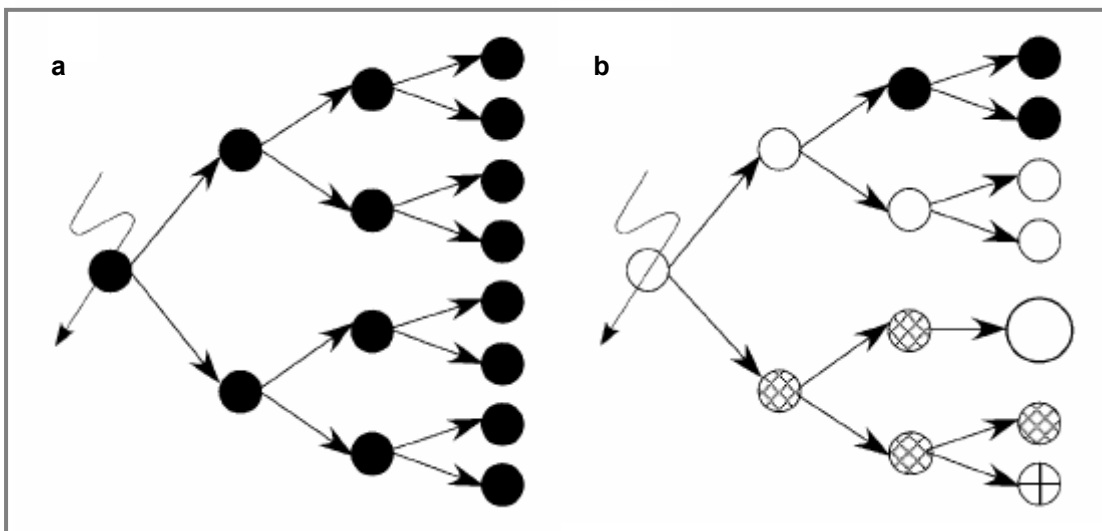
### 1.3. INESTABILITAT GENÒMICA I CROMOSÒMICA

La inestabilitat genòmica (GI), terme utilitzat des de l'última dècada del segle XX (Marder i Morgan, 1993), descriu l'increment de la taxa d'adquisició d'alteracions en el genoma (Barber i Dubrova, 2006). Pot ser produïda tant per la RI (**figures 1.4 i 1.5**) com per mutàgens químics i es creu que el seu desenvolupament és, potencialment, un dels processos més importants en el desenvolupament del càncer.

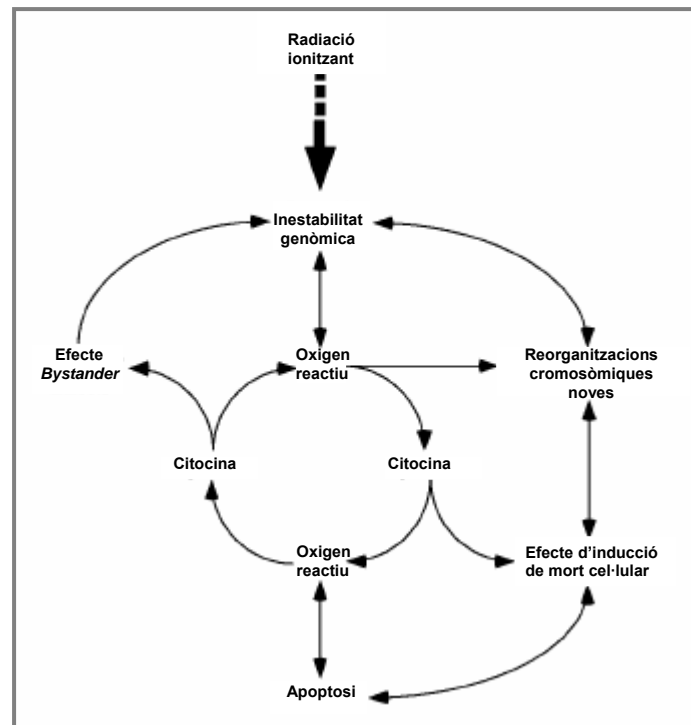
En els estudis de la GI amb marcadors citogenètics s'utilitza el terme d'inestabilitat cromosòmica (CI, Marder i Morgan, 1993; Kovacs *et al.*, 1994; Durante *et al.*, 1996; Tease i Fisher, 1996a; 1996b; Limoli *et al.*, 1997; Kadhim i Wright, 1998; Morgan *et al.*, 1998; Mothershill *et al.*, 2000; Limoli *et al.*, 2001; Devi i Satyamitra, 2005; Krishnaja i Sharma, 2006).

#### 1.3.1. Inestabilitat genòmica radioinduïda

La inestabilitat genòmica radioinduïda (RIGI) es manifesta en les successives divisions cel·lulars després del primer moment d'exposició a la RI (**figures 1.4 i 1.5**, Morgan, 2003). Se n'ha demostrat l'existència en diferents espècies: en mosques (Kanao *et al.*, 2003), en peixos (Shimada i Shima, 2004), en rosegadors, com la rata i el ratolí (Martínez-Flores *et al.*, 1998; 2000; Vorobtsova, 2000; Barber *et al.*, 2002; Kropáčová *et al.*, 2002; Slovinská *et al.*, 2004, Wu *et al.*, 2006), i en l'espècie humana (Byrne *et al.*, 1998; Dickinson i Parker, 2002; Dubrova, 2003a; 2003b). S'ha observat majoritàriament en mascles (Barber *et al.*, 2002; Dubrova i Plumb, 2002; Barber i Dubrova, 2006; Nomura, 2006; Wu *et al.*, 2006), i també en femelles (Tease i Fisher, 1996a; 1996b; Martínez-Flores *et al.*, 1998; 2000; Nomura, 2006); en cèl·lules somàtiques (Devi i Satyamitra, 2005) i en cèl·lules germinals (Barber *et al.*, 2006); i també en sistemes *in vitro* i *in vivo* (Barber *et al.*, 2002).



**Figura 1.4.** (a) *Paradigma convencional* pel que fa als efectes de la radiació ionitzant. L'energia es diposita al nucli de la cèl·lula irradiada, el dany es *fixa* i es transmet a les cèl·lules descendents d'aquesta cèl·lula. (b) Inestabilitat genòmica radioinduïda. Apareixen efectes retardats en la descendència de la cèl·lula irradiada, per exemple, una mutació retardada (en negre), reorganitzacions cromosòmiques (línies en diagonal), mort cel·lular (creu) i/o aneuploidia (cèl·lula més gran) (adaptada de Morgan, 2003).



**Figura 1.5.** Model proposat per a la perpetuació de la inestabilitat genòmica radioinduïda (adaptada de Morgan, 2003).

En el cas de l'estudi de la RIGI en individus provinents de línia germinal irradiada, des de la fase de zigot fins a individus de la  $F_1$  ja nascuts (Tateno i Mikamo, 1989; Tease i Fisher, 1996a; 1996b; Martínez-Flores *et al.*, 1998; Barber *et al.*, 2002; Dubrova i Plumb, 2002; Barber i Dubrova, 2006; Martínez-Flores *et al.*, 2000; Devi i Satyamitra, 2005; Dubrova, 2003b; Slovinská *et al.*, 2004; Streffer, 2004; Barber *et al.*, 2006; Nomura, 2006), es va observar l'existència de RIGI en la descendència, tant en el cas de l'exposició del pare (Barber *et al.*, 2002; Dubrova i Plumb, 2002; Slovinská *et al.*, 2004; Barber i Dubrova, 2006; Nomura, 2006; Wu *et al.*, 2006) com de la mare (Tease i Fisher, 1996a; 1996b; Nomura, 2006). D'aquesta manera s'ha conclòs que aquesta RIGI pot ser induïda molt de temps després de l'exposició a la RI i a través del desenvolupament prenatal i postnatal de la  $F_1$ , com també en les següents generacions dels animals irradiats (Barber *et al.*, 2002; Dubrova i Plumb, 2002; Dubrova, 2003b). És el que s'anomena *RIGI transgeneracional*.

Tot i aquestes conclusions en models animals, els resultats dels estudis transgeneracionals en poblacions humanes, la majoria d'ells relacionats amb processos de càncer, encara no són concloents (Dickinson i Parker, 2002; Dubrova, 2003a; Morgan, 2003; Barber i Dubrova, 2006; Nomura, 2006).

Amb la finalitat d'avaluar la RIGI transgeneracional, els estudis han mesurat paràmetres genètics i cel·lulars: les AC, la formació de micronuclis, les mutacions gèniques, els canvis en les taxes de mutació, la transformació cel·lular, les amplifícacions gèniques, l'heterogeneïtat clonal, els índexs d'apoptosi, la fragmentació del DNA i l'eficiència dels cultius en placa (Vorobtsova, 2000; Kropáčová *et al.*, 2002; Morgan, 2003; Pogribny *et al.*, 2004; Slovinská *et al.*, 2004; Barber i Dubrova, 2006; Niwa, 2006; Wu *et al.*, 2006). També s'han mesurat com a

paràmetres la durada de la vida, la mortalitat, els índexs de fertilitat i la incidència tumoral de la descendència (Lyon i Renshaw, 1988; Mohr *et al.*, 1999; Nomura, 2003; Dasenbrock *et al.*, 2005; Nomura, 2006).

Els estudis del nostre grup sobre els efectes transgeneracionals de la RI (raigs X) en la funció gonadal de la rata femella (Sprague Dawley) utilitzant com a marcador citogenètic el complex sinaptonemal han conclòs que els oòcits I remanents no presenten ni GI ni cap alteració constitucional (Martínez-Flores *et al.*, 1998; 2000), malgrat que hi ha una inducció de l'apoptosi en els oòcits I dels fetus de la F<sub>1</sub> (Martínez-Flores *et al.*, 1998). Altrament, els estudis en ratolins femella irradiats mostren un increment de les AC (guanys cromosòmics i mosaicismes) en l'anàlisi de les cèl·lules somàtiques i un increment de fetus portadors d'AC (Tease i Fisher, 1996a; 1996b).

#### 1.4. LLOCS FRÀGILS

Els llocs fràgils (LLF) són punts en regions específiques dels cromosomes que s'expressen com a *gaps* o trencaments quan les cèl·lules s'exposen a condicions específiques de cultiu o a determinats agents químics (Sutherland, 1979).

Actualment, es considera que els LLF són una característica universal i inherent al genoma dels mamífers (Sutherland i Richards, 1999). Aquests s'expressen com una regió no tenyida de gruix variable que pot implicar una o totes dues cromàtides del cromosoma (Sutherland, 1979). També és possible observar-ne l'expressió en un o tots dos cromosomes homòlegs en una mateixa cèl·lula, però sempre estan localitzats en el mateix punt del cromosoma de les cèl·lules examinades d'un mateix individu o família (Sutherland, 1979). S'hereten de forma mendeliana codominant i el seu grau d'expressió depèn de les condicions de cultiu utilitzades, de l'individu i del tipus cel·lular analitzat.

Els LLF es classifiquen majoritàriament en LLF comuns i LLF rars. Els LLF comuns, o constitutius, estan presents homozigòticament en tots els individus, i, per tant es considera que són un component de l'estructura cromosòmica normal (Glover *et al.*, 2005), encara que la seva freqüència d'expressió pot variar entre individus i entre tipus cel·lulars. Els LLF rars tenen una freqüència d'expressió baixa (Sutherland i Richards, 1999).

Els LLF s'han descrit en moltes espècies de mamífers diferents: en l'espècie humana, en primats no humans (Ruiz-Herrera *et al.*, 2002a; 2005a; 2005b) i en rosegadors (Robinson i Elder, 1987; Elder i Robinson, 1989; McAllister i Greenbaum, 1997).

Els LLF comuns són regions llargues (de 150 Kb a 1 Mb), on es poden produir DSB. Són regions de replicació tardana, riques en AT i amb pocs gens. Fins ara no s'ha trobat cap característica en la seqüència que en justifiqui la fragilitat. Això no obstant, les característiques estructurals (conformacionals) de la mateixa seqüència en podrien ser la causa. S'ha postulat que aquestes regions poden formar estructures de DNA amb alta flexibilitat i baixa estabilitat (relacionades amb la inducció de l'expressió gènica i amb la recombinació homòloga) i podrien interferir en la correcta replicació i condensació/organització de la cromatina, induint la fragilitat en aquestes regions cromosòmiques (Mishmar *et al.*, 1998; Mangelsdorf *et al.*, 2000; Morelli *et al.*, 2002; Limongi *et al.*, 2003).

Els LLF comuns s'indueixen majoritàriament sota l'acció de l'afidicolina. Aquesta substància és una inhibidora específica de la subunitat  $\alpha$  de la DNA polimerasa i, per tant, bloqueja la propagació de la forquilla de replicació i interfereix en la unió dels fragments de DNA intermediaris.

Els mecanismes moleculars responsables de l'expressió citogenètica dels LLF encara no estan clars, encara que se n'han presentat diversos models (Glover *et al.*, 2005). De moment, el que es pot dir és que l'expressió citogenètica d'un LLF és la manifestació de la seva inestabilitat genètica, generada per les característiques de la seqüència de DNA (Sutherland i Richards, 1999) i de la seva estructura (Mishmar *et al.*, 1998; Mangelsdorf *et al.*, 2000; Morelli *et al.*, 2002; Limongi *et al.*, 2003) en aquests *loci*.

Els LLF es poden considerar marcadors de la inestabilitat genòmica. Des de mitjan del segle passat, els LLF s'han relacionat amb l'amplificació gènica (Coquelle *et al.*, 1997), amb la recombinació, amb fenòmens d'intercanvi de cromàtides germanes (Glover i Stein, 1987) i amb punts d'integració de genomes virals (Wilke *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1998; Mishmar *et al.*, 1998; Thorland *et al.*, 2000).

Treballs recents relacionen la inestabilitat genòmica que caracteritza els LLF amb la predisposició a patir determinats tipus de càncer. Això voldria dir que l'expressió de LLF pot incrementar la probabilitat d'iniciació i progressió de processos tumorals (Ribas *et al.*, 1999; Ried *et al.*, 2000). De tota manera, només tres dels més de 100 LLF humans estan implicats directament en malalties humanes.

Altrament, els trencaments implicats en reorganitzacions cromosòmiques evolutives s'haurien concentrat en aquestes regions (LLF), a més de conservar-se en regions cromosòmiques homòlogues en diferents espècies (Smeets i Van de Klundert, 1990; Ruiz-Herrera *et al.*, 2005a; 2005b).

## 1.5. SEQÜÈNCIES TELOMÈRIQUES INTERSTICIALS

Les seqüències telomèriques intersticials (ITS) són repeticions de tipus telomèric  $(TTAGGG)_n$ , que ocupen regions no terminals en els cromosomes de diferents espècies d'eucariotes (Moyzis *et al.*, 1988; Meyne *et al.*, 1989). Fins a l'actualitat, s'ha detectat la presència d'ITS en moltes espècies, tant vegetals com animals. Aquestes últimes comprenen des d'artròpodes i peixos, fins a rosegadors (Bertoni *et al.*, 1996; Fagundes i Yonenaga-Yassuda, 1998; Silva i Yonenaga-Yassuda, 1997; 1998b; Castiglia *et al.*, 2002) i primats (Meyne *et al.*, 1989; Hirai, 2001; Ruiz-Herrera *et al.*, 2002a), incloent-hi l'espècie humana (Azzalin *et al.*, 1997). Això no obstant, des del seu descobriment, la seva presència en els cromosomes està lluny de ser totalment entesa (Lin i Yan, 2008).

La formació de les ITS es pot explicar per diferents mecanismes, no excloents entre si, segons l'organització de la seva seqüència, les seves seqüències flanquejants i la naturalesa fràgil d'aquestes seqüències.

En vertebrats, les ITS es localitzen preferentment en regions pericentromèriques i en regions d'heterocromatina constitutiva. Se n'han identificat quatre tipus (tres d'aquests en l'espècie humana), segons l'organització de la seva seqüència, la seva localització cromosòmica i la seva seqüència flanquejant (Azzalin *et al.*, 2001; Lin i Yan, 2008):

(a) Les *ITS curtes (short ITS)*. Consisteixen en repeticions curtes i exactes de l'hexanucleòtid (TTAGGG). N'hi ha de diversos tipus segons els elements que les flanquegen. (Azzalin *et al.*, 2001, Nergadze *et al.*, 2004) i podrien arribar a considerar-se com una classe de DNA microsatèl·lit hexamèric (Lin i Yan, 2008)

(b) Les *ITS subtelomèriques (subtelomeric ITS)*. Són repeticions de mida més gran de l'hexanucleòtid (TTAGGG) acompanyades de repeticions degenerades i localitzades en les regions subtelomèriques de tots els cromosomes.

(c) Les *ITS resultants de fusions ancestrals (fusion/inverted ITS)*. Consisteixen en dues extensions llargues de repeticions telomèriques orientades cap a cap derivades de fusions telòmer-telòmer. Se n'ha detectat dues fins al moment en el genoma humà: HSA2q13 (Ijdo *et al.*, 1991) i HSA1q41, i es creu que ambdues deriven d'una fusió telomèrica ancestral (Ijdo *et al.*, 1991; Azzalin *et al.*, 1997; 2001).

(d) Les *ITS pericentromèriques*. Són repeticions molt llargues (blocs d'ITS) que s'estenen en centenars de quilobases i es constitueixen en la major part per seqüències de tipus satèl·lit. S'han trobat en espècies vertebrades com per exemple en l'hàmsster xinès i en l'espècie vegetal aràbidopsi, però no en l'espècie humana (Meyne *et al.*, 1989).

És ben conegut que les ITS presenten variants polimòrfiques tant en el nombre de còpies com en la seqüència (Mondello *et al.*, 2000; Lin i Yan, 2008). A més, com que les ITS semblen microsatèl·lits, es proposa també que ambdós tipus de seqüències tenen propietats comunes. Per tant, s'ha proposat que les ITS podrien emprar-se com a marcadors en estudis genètics de lligament, en aplicacions forensiques, i en la detecció d'inestabilitat genètica en tumors.



Nombrosos estudis han demostrat la participació de les ITS en la inestabilitat genòmica i cromosòmica, actuant com a punts calents (Hastie i Allshire, 1989; Pluta i Zakian, 1989; Day *et al.*, 1998; Mondello *et al.*, 2000; Kilburn *et al.*, 2001; Lin i Yan, 2008). Les ITS poden afavorir trencaments i reorganitzacions cromosòmiques espontànies (Bertoni *et al.*, 1994) i induïdes (Álvarez *et al.*, 1993; Fernández *et al.*, 1995; Slijepcevic *et al.*, 1996). També es correlacionen estretament amb els llocs fràgils (Farr *et al.*, 1991; Musio *et al.*, 1996; Musio i Mariani, 1999; Lin i Yan 2008) i amb punts calents per la recombinació (Katinka i Bourgain, 1992; Azzalin *et al.*, 2001; Lin i Yan, 2008) i per l'amplificació (Bertoni *et al.*, 1994; Simi *et al.*, 1998; Lin i Yan, 2008). S'ha demostrat també que les ITS són substrat d'enzims de restricció (Balajee *et al.*, 1996) i que participen en la integració cromosòmica d'elements extracromosòmics (Cherry i Blackburn, 1985; Kilburn *et al.*, 2001; Lin i Yan, 2008).

Diferents autors han suggerit que les ITS podrien participar en la patogènesi de malalties (Park *et al.*, 1992; Vermeesch *et al.*, 1997), en alguns casos com a conseqüència de diferents factors clastogènics (Lin i Yan, 2008), i també en neoplàsies (Lin i Yan., 2008; Mondello *et al.*, 2000; Kashima *et al.*, 2006). Altrament, s'ha considerat que estan directament implicades en reorganitzacions cromosòmiques que han portat a l'evolució de les espècies (Ijdo *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1993; Vermeesch *et al.*, 1996; Azzalin *et al.*, 1997; Metcalfe *et al.*, 1997; 1998; Fagundes i Yonenaga-Yassuda, 1998; Pellegrino *et al.*, 1999; Go *et al.*, 2000; Finato *et al.*, 2000; Ruiz-Herrera *et al.*, 2002a; Lin i Yan, 2008).

De tota manera, alguns autors (Azzalin *et al.*, 2001; Faravelli *et al.*, 2002) proposen que les ITS simplement marcarien llocs de DSB, però que elles mateixes no serien llocs inestables i/o fràgils, sino la conseqüència d'aquesta inestabilitat en aquests *loci*. Seguint aquest raonament, les ITS curtes es podrien concebre com a relíquies d'antics trencaments dins de llocs fràgils i serien la conseqüència (i no la causa) de la inestabilitat.

No obstant això, hi ha estudis que no donen suport al fet que les ITS es comportin com a punts calents (Desmaze *et al.*, 2004). Avui en dia, es pensa que algunes de les ITS es podrien comportar com a seqüències inestables i altres no. De fet, per a alguns autors, hi hauria una sèrie de factors que contribuirien al fet que les ITS estiguessin destinades a ser seqüències estables o inestables. L'acumulació i el predomini d'alguns d'aquests factors portaria a la inestabilitat/estabilitat de les ITS (Lin i Yan, 2008). Com a factors que produirien un increment/decreixement de la inestabilitat genòmica, s'hi inclourien agents clastogènics (mutàgens químics i radiacions), la naturalesa de la seqüència (conservada o degenerada), el nombre (alt o baix) de repeticions de la seqüència, el tipus de cromatina (heterocromatina i eucromatina), l'estat epigenètic (metilació o desmetilació de la seqüència) i la presència o l'absència de la telomerasa i de proteïnes associades al telòmer (Lin i Yan, 2008).

## 1.6. ESPÈCIE ESTUDIADA: LA RATA ALBINA

La rata noruega, també anomenada albina, domèstica o de laboratori, (*Rattus norvegicus*, RNO) correspon a l'ordre *Rodentia* (rosegadors), al subordre *Myomorpha* i a la família dels múrids, *Muridae* (Pass i Freeth, 1993; Salvador, 2001). De la raça salvatge en van derivar dues poblacions: la rata Long Evans i les rates albinas Sprague-Dawley i Wistar. Les rates de la soca Sprague-Dawley (SD, Madison, Estats Units) es van originar en creuar femelles Wistar amb mascles híbrids d'origen desconegut. Són rates llargues, amb el cap estret i una cua més llarga que el cos (Salvador, 2001). Gairebé totes les soques modernes que s'usen avui en dia tenen el seu origen a l'Institut Wistar de Filadèlfia (Pass i Freeth, 1993).

La RNO és l'espècie d'experimentació més utilitzada en recerca biomèdica: nutrició, toxicologia, trasplantaments, genètica, càncer, fisiologia, farmacologia, ciències de l'envelliment, neurociències i conducta animal (Salvador, 2001).

Aquesta espècie té una esperança de vida de dos a tres anys, que acostuma a ser més llarga en les femelles (3,6 anys). El pes dels animals adults oscil·la entre 250 i 400 grams en mascles i entre 220 a 300 en femelles. Té una vida reproductiva de 12 a 24 mesos i pot arribar a tenir de 8 a 10 llodrigades d'entre 8 i 15 cries cadascuna (Salvador, 2001).

Les rates femella arriben a la pubertat entre els 40 i 60 dies d'edat. Les femelles són sexualment madures amb 6–8 setmanes de vida. L'inici d'aquesta maduresa sexual també varia segons una sèrie de factors com la soca, el ritme de creixement, la mida de la camada de procedència, el grau de nutrició i les condicions ambientals. La conducta sexual està controlada pel cicle estral, que comença després de la pubertat, i està influïda pel fotoperíode, la temperatura, la disponibilitat de l'aliment i les feromones.

Les femelles tenen un cicle molt regular, entre 4 i 5 dies de durada, en què el cos luti persisteix de 2 a 3 dies (Salvador, 2001). La rata és un mamífer polièstral, no estacional i amb ovulació espontània. Això vol dir que el cicle ovàric continua durant l'any (es poden creuar contínuament) i que l'ovulació no depèn d'estimulació nerviosa.

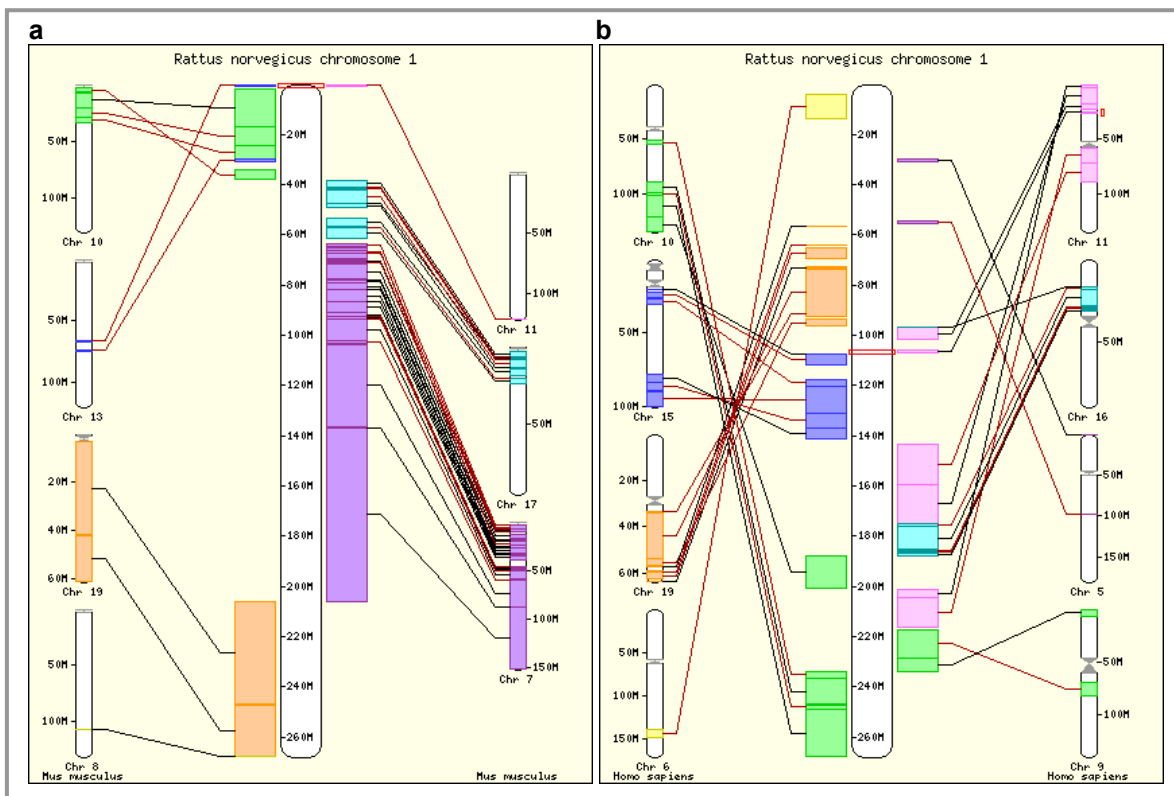
Les diferents etapes del cicle estral (proestre, estre, metaestre i diestre) es poden identificar observant la morfologia de l'epiteli vaginal amb extensions tenyides amb Giemsa, que és molt característica de cada etapa, o bé identificant l'estre mesurant la impedància de la mucosa vaginal (Salvador, 2001). La primera etapa del cicle és el proestre (d'unes hores). L'estre és el període receptiu de la femella (de 12 a 14 hores) i es produeix gairebé sempre de nit. L'ovulació (de 8 a 11 hores) succeeix després de l'inici de l'estre. El nombre mitjà d'òcits ovulats és de 10 (Salvador, 2001). Si no hi ha concepció, apareix el metestre o postestre (de 6 a 12 hores). Si hi ha concepció, apareix el diestre (48 i 72 hores), on les secrecions ovàriques preparen el tracte reproductiu per a rebre l'òcit fertilitzat just després de l'estre.

El temps d'implantació de l'embrió és de 5 dies i la durada de la gestació és de 21 a 23 dies. Les femelles són múltiples: diversos embrions es desenvolupen al mateix temps. Els embrions s'implanten i es desenvolupen en els cossos uterins (Salvador, 2001).

És una espècie genèticament ben caracteritzada de la qual, l'any 2004, se'n va seqüenciar tot el genoma (Kola, 2004; Rat Genome Sequencing Project Consortium (RGSP), 2004). El seu genoma és aproximadament de 2,75 Gb de llargada, amb 278 segments ortòlegs amb el de l'espècie humana i 105 d'ortòlegs amb el genoma de ratolí (Kola, 2004; **figura 1.6**).

El seu cariotip conté un nombre diploide de 42 cromosomes ( $2n = 42$ ). Els cromosomes de la rata són majoritàriament telocèntrics (RNO2, RNO4-RNO9, RNOX i RNOY), però també conté cromosomes metacèntrics, submetracèntrics i acrocèntrics (**figura 1.7**).

El genoma dels rosegadors en general està molt reorganitzat (Stanyon i col., 1999; Cavagna *et al.*, 2002). La taxa d'evolució genòmica (velocitat de canvi) en rosegadors (i més concretament en múrids) és la més elevada dels mamífers (Stanyon *et al.*, 1999; Cavagna *et al.*, 2002). Les nombroses reorganitzacions cromosòmiques des de la divergència cromosòmica de les línies de rata i ratolí (Grützner *et al.*, 1999) porten a cariotips força diferents, per ser de la mateixa subfamília, Murinae (**figura 1.6**). Tot això implica que sigui difícil tant de fer un estudi comparatiu dels cariotips de rosegadors entre ells, com fer-lo amb espècies d'altres grups taxonòmics.



**Figura 1.6.** Correspondència del cromosoma de *Rattus norvegicus* RNO1 amb cromosomes (a) de ratolí (*Mus musculus*) i (b) de l'espècie humana (*Homo sapiens*) (dades extretes de [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

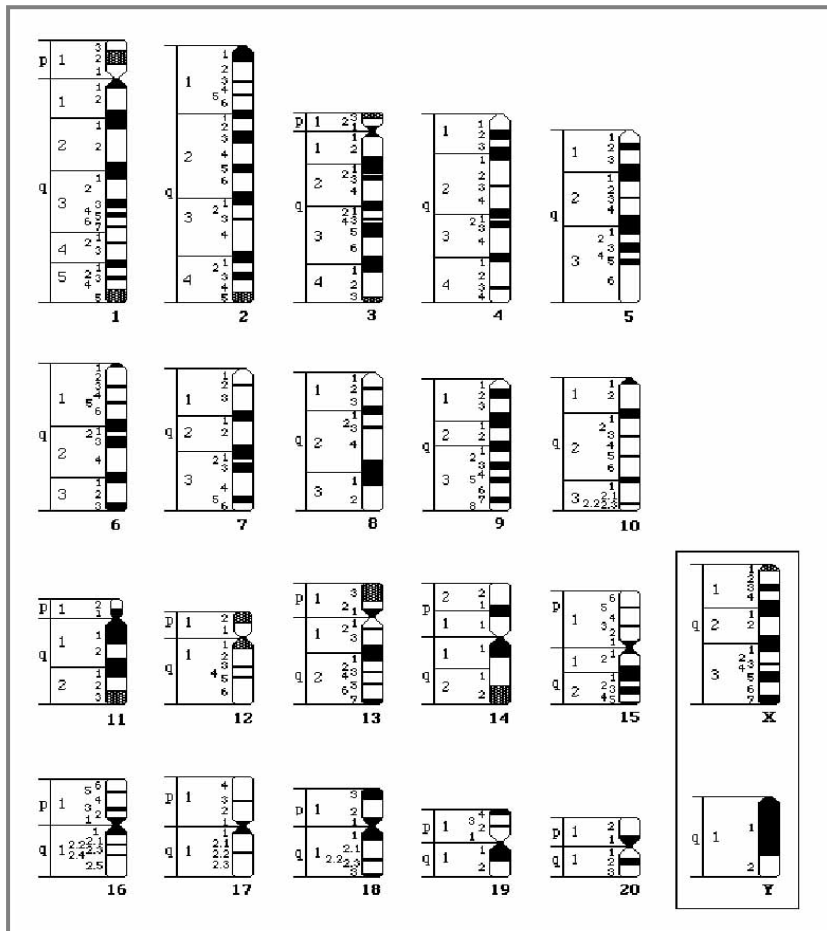
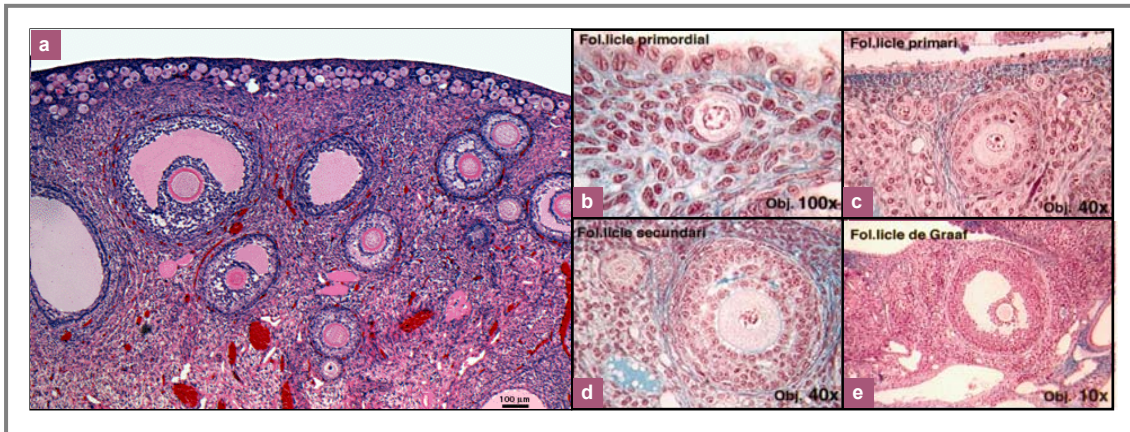


Figura 1.7. Idiograma de bandes G de *Rattus norvegicus* (Szpirer *et al.*, 1996; [ratmap.gen.gu.se](http://ratmap.gen.gu.se)).

## 1.7. OOGÈNESI

L'oogènesi és el procés pel qual les oogònies proliferatives es transformen en oòcits a través de la meiosi, seguida per la maduració fol·licular i la de l'oòcit (Byskov *et al.*, 2005). Aquest procés succeeix en gran part dins els fol·licles ovàrics i implica diverses etapes. La major part de la meiosi succeeix durant el cicle estral dins l'ovari.



**Figura 1.8.** (a) Tall histològic d'un ovari de mamífer. (b–e) Diferents tipus de fol·licles ovàrics de rata: (b) fol·licle primordial, (c) primari, (d) secundari i (e) de Graaf o antral (La imatge (a) ha estat adaptada d'[embryology.med.unsw.edu.au](http://embryology.med.unsw.edu.au) i les imatges (b–e) han estat cedides per M. Garcia).

### 1.7.1. Meiosi

La meiosi és el procés cel·lular pel qual el material genètic es redueix a la meitat. La cèl·lula passa de dotació cromosòmica diploide ( $2n$ ) a haploide ( $n$ ). Els gàmetes, oòcits, són haploides amb la finalitat de tornar a tenir doble dotació cromosòmica ( $n+n$ ) en el zigot en produir-se la fecundació.

La meiosi és una font de variabilitat genètica dins l'espècie, gràcies a la recombinació meiótica entre cromosomes homòlegs i també a la segregació a l'atzar dels cromosomes homòlegs. És un procés bastant conservat al llarg de l'evolució dels eucariotes, des dels llevats fins a l'espècie humana.

Consta d'una fase de síntesi de DNA en l'etapa S premeiótica i, posteriorment, de dues divisions seguides, sense període de síntesi de DNA enmig. La primera divisió meiótica implica una divisió amb la reducció del nombre de cromosomes a la meitat (sense separació de cromàtides,  $2 \times \text{DNA}$ ), passant del nombre diploide de 42 cromosomes ( $2n = 42$ ,  $4 \times \text{DNA}$ ) a l'haploide de 21 ( $n = 21$ ,  $2 \times \text{DNA}$ ). La segona divisió meiótica consisteix en la separació de les cromàtides germanes dels cromosomes ( $n = 21$ ,  $1 \times \text{DNA}$ ), i és semblant al procés de mitosi. Aquesta última fase només finalitza en el moment de la fecundació. Quan s'uneixen les dotacions genètiques d'ambdues cèl·lules sexuals s'obté un altre cop la dotació diploide ( $n + n$ ) en el zigot.

Durant el període fetal, l'oòcit progressa per la profase I de la meiosi i arriba al dictiotè (*resting stage*) al cap de quatre dies després de néixer. L'oòcit es queda en aquest dictiotè fins que és seleccionat per a la maduració durant un dels proestres de l'etapa adulta (Freeman, 1988).

Poques hores abans de l'ovulació, gràcies i durant l'onada preovulatoria de l'hormona luteïnitzant (LH), es reinicia la meiosi I que progressa fins a la metafase II, incloent-hi la primera divisió meiòtica. Es trenca la vesícula germinal, desapareix la membrana nuclear i els cromosomes es condensen. Això succeeix alhora a uns 10 oòcits fol·liculars de la femella. Durant la metafase I els cromosomes s'aparellen en la placa metafàsica, enganxats als seus respectius centròmers per fibres del fus. A l'anafase I, els cromosomes es comencen a separar, amb el resultat que la meitat del material cromosòmic es perd formant part d'un corpuscle polar (I), que s'extrudeix durant la telofase I, entre proestre i estre. Començada la receptivitat, a la matinada de l'estre, succeeix l'ovulació i, amb aquesta, la meiosi encara continua fins a l'etapa de metafase II (Freeman, 1988).

L'oòcit ovulat està a metafase II, amb els cromosomes un altre cop en placa metafàsica amb un corpuscle polar extruït. Es troba a la part superior de l'oviducte i ja està a punt per a la fecundació. A partir d'aquí, si l'oòcit és fecundat, la segona divisió meiòtica continua, però, si no hi ha fecundació, apareix el diestre, l'oòcit degenera i un nou grup d'oòcits intrafol·liculars tornen a començar la maduració en un nou proestre.

### 1.7.2. Fol·liculogènesi

Un fol·licle ovàric és un conjunt més o menys gran de cèl·lules derivades de l'estroma ovàric que embolcallen l'oòcit. Els fol·licles ovàrics reben diferents noms depenent de l'estadi de desenvolupament fol·licular, o fol·liculogènesi, en què es troben. Aquest procés fol·licular s'esdevé paral·lelament a l'oogènesi. Els fol·licles creixen de manera seqüencial i continuen fent-ho fins que s'atrèsien o ovulen (oociten). Al cap de quatre dies després de néixer totes les oogònies de la femella de rata ja s'han transformat en oòcits I i aquests estan en el dictiotè de la profase I (Freeman, 1988).

El fol·licle primordial, en repòs o que no creix, es caracteritza morfològicament per la presència d'un oòcit I de mida petita envoltat d'una capa de cèl·lules d'epiteli simple escamós, sense receptors per la l'hormona estimuladora del fol·licle (FSH, Freemann, 1988). Durant el cicle estral, els fol·licles primordials comencen el creixement i passen per diferents estadis (fol·licles primaris, secundaris, antrals i preovulatoris) fins al procés de selecció d'uns quants fol·licles en creixement per a l'ovulació (**figura 1.8**).

En la rata, el creixement fol·licular un cop iniciat és continu fins que succeeix l'atrèsia o bé hi ha l'ovulació. La velocitat de creixement dels fol·licles depèn de l'estadi (els petits creixen més lentament) i l'edat de l'animal (més ràpid en animals joves). Un fol·licle tarda una mitjana de dinou dies des que comença a créixer fins que arriba al desenvolupament complet. Els fol·licles continuen creixent, a velocitat menor, durant la gestació, fins que degeneren o ovulen en l'estre següent al postpart.

### 1.7.3. Ovulació

En ser estimulats, els ovaris secreten estrògens que, en arribar a un llindar, produeixen un fort increment de la secreció d'LH. Aquest augment provoca el trencament dels fol·licles

preovulatoris, l'alliberament dels oòcits madurs continguts en els ovaris (ovulació) i la formació del cos luti.

Tant l'esdeveniment com el seu control és generalitzable a la majoria dels mamífers. El procés es completa al cap d'una hora i mitja. El nombre de fol·licles que s'oocita en cada cicle és constant i característic per a cada espècie. En el cas de la rata, s'oociten deu oòcits com a mitjana i tenen una viabilitat d'unes 10–12 h. Els factors responsables de la iniciació d'aquest pic preovulatori de l'LH en rosegadors són els ritmes fotoperiòdics, els estímuls olfactoris i l'augment dels estrògens secretats pels ovaris (estradiol, *feedback* positiu). Això inicia els estadis finals de la maduració de l'oòcit, reinstaura la meiosi, inhibeix la secreció i les mitosis de les cèl·lules de la granulosa, estimula la luteïnització d'aquesta granulosa i estimula la síntesi de prostaglandines, essencials per al trencament fol·licular.

#### 1.7.4. Cos luti

En la rata, la formació del cos luti es produeix després de l'ovulació. El cos luti sorgeix de les cèl·lules de la granulosa i de la teca del fol·licle preovulatori. El metestre i el diestre corresponen a la fase lútia. Durant el cicle estral de la rata hi ha diverses generacions de cossos lutis en l'ovari, provinents de cicles ovulatoris anteriors, distingibles a partir de la mida, la vascularitat i les característiques de tinció.

Les cèl·lules lúties secreten progesterona. El manteniment dels cossos lutis nous depèn sobretot de l'LH (**figura 1.9**) i també de la prolactina. En absència de l'estimulació luteotrófica, que s'inicia amb l'acoblament, aquesta secreció declina durant el diestre i una nova ovulació tindrà lloc poc temps després. D'aquesta manera, la fase lútia en rates és atípica, ja que és curta (base dels cicles curts en rosegadors) mentre que en altres mamífers, com l'espècie humana, és llarga (11–14 dies). Si hi ha fecundació, la fase lútia persistirà durant tot l'embaràs, ja que la placenta secreta una gonadotrofina que manté el cos luti fins al final de la gestació.

Es creu que la regressió del cos luti és producte de la manca de suport tròfic i també que el mateix úter podria secretar luteolisines que accelerarien aquesta mort lútia. Primerament hi ha una ràpida disminució de la seva capacitat secretora, per la disminució del suport luteotrópic hipofisari i les concentracions creixents de prostaglandines i estradiol. En una segona fase, es produeix una degeneració del teixit, amb disminució de la seva capacitat esteroïdogènica i del flux sanguini. Al final, apareixerà ja només com una cicatriu en la superfície ovàrica que es coneixerà com a *corpus albicans*.

#### 1.7.5. Reservori fol·licular i atrèsia

Els fol·licles primordials o en repòs conformen un reservori (*pool*) que iniciarà el seu creixement d'una forma continuada, en cada cicle estral, encara que la majoria de fol·licles degenera en algun estadi del seu desenvolupament. Així doncs, de tots els oòcits presents en l'ovari en el moment del naixement de l'animal (uns 35.000), en quedarà una tercera part pocs dies després (Freeman, 1988). D'aquesta manera, no tots el fol·licles de l'ovari en el moment del naixement estan destinats a ovular. Mentre que en el període immadur (0–35 dies postpart)

domina el procés de degeneració o atrèsia com a responsable de la disminució del nombre de fol·licles en l'ovari madur, el descens es correspon bastant bé amb el nombre de fol·licles que inicien el creixement, en cada cicle estral (la degeneració és de fins al 50 % en el primer mes i molt més lenta després).

### ***Refutant el dogma: 'eggs forever?'***

Un dels dogmes centrals de la biologia reproductiva femenina, és justament el fet que la oogènesi s'aturi al voltant del naixement en la majoria dels mamífers i que la reserva d'òcits en quedi fixada i, per tant, no hi ha, de cap manera, renovació del reservori d'òcits (Zuckerman, 1951; Gougeon, 2005). En el cas de l'espermatogènesi succeeix el contrari. Aquest dogma va néixer fa més de 50 anys (Zuckerman, 1951).

Tot i això, un estudi recent en ratolins femella (Johnson *et al.*, 2004; 2005a) ha proposat que existiren oogònies actives en l'ovari adult que s'encarregarien de mantenir la fertilitat de l'individu (Johnson *et al.*, 2004). Aquestes dades han estat confirmades després per un altre estudi del mateix grup (Johnson *et al.*, 2005a) i per un estudi independent (Kerr *et al.*, 2006).

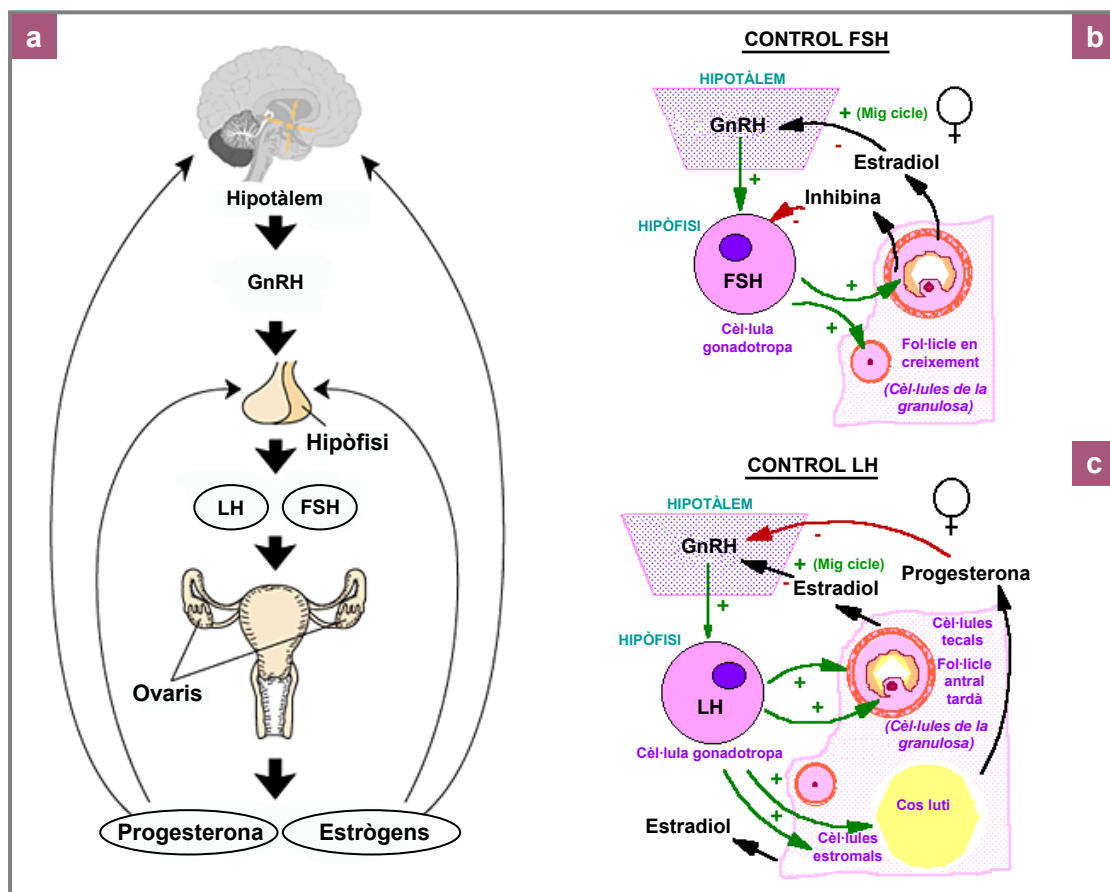
Aquests treballs (Johnson *et al.*, 2005a; 2005b) han generat una gran controvèrsia (Byskov *et al.*, 2005; Gougeon, 2005) i fins i tot una "lluïta aferrissada" d'aquests autors (Johnson *et al.*, 2005b; Skaznik-Wikiel *et al.*, 2007), per a justificar i validar els seus resultats enfront l'escepticisme generat i general (Byskov *et al.*, 2005; Gougeon, 2005), citant antics estudis que ja apuntaven a aquesta regeneració germinal femenina.

Fins i tot, en un segon estudi, Johnson *et al.* (2005a) proposen que el reservori de les cèl·lules germinals, en els ratolins femella, estaria en la medul·la òssia, i que aquestes s'alliberarien a la circulació sanguínia perifèrica per tal d'arribar als ovaris i començar unes noves oogènesi i fol·liculogènesi (Johnson *et al.*, 2005a; 2005b). Aquesta nova proposta sembla que ha estat confirmada per un estudi independent també en ratolins femella (Lee *et al.*, 2007). El debat resta obert.



## 1.8. HORMONA ALLIBERADORA DE GONADOTROFINES

En els mamífers, l'hipotàlem actua com a centre regulador neuroendocrí de control i de direcció de tota la fisiologia reproductora (**figura 1.9**). L'hormona alliberadora de les gonadotrofines (*gonadotropin releasing hormone*, GnRH) és secretada de manera pulsativa per l'hipotàlem. Aquesta hormona és un component indispensable per al bon funcionament de l'eix hipotàlem-hipòfisi-gònada. La seva funció principal és el control neurohormonal de la reproducció pel fet d'estimular (afavorint i induint) la síntesi i l'alliberament de les gonadotrofines (Gn). Això fa que, al mateix temps, es promogui el desenvolupament de les funcions gonadals com són la producció i l'alliberament dels esteroides sexuals i la gametogènesi (**figura 1.9**).



**Figura 1.9.** (a) Eix hormonal hipotàlem-hipòfisi-ovari. (b) Control i acció de l'hormona estimuladora del fol·licle (FSH) i (c) control i acció de l'hormona luteïnitzant (LH) (adaptada d'[embryology.med.unsw.edu.au](http://embryology.med.unsw.edu.au)).

En ser estimulades per la GnRH, les cèl·lules gonadotropes de la hipòfisi secreten les Gn: l'FSH i l'LH. Aquestes dues Gn, amb un patró de secreció pulsatiu semblant, estimulen la secreció d'esteroides sexuals a l'ovari. L'FSH estimula el creixement dels fol·licles, principalment durant el proestre, amb un progressiu increment dels nivells estrogènics. L'LH indueix el trencament fol·licular i l'ovulació gràcies a un increment dels seus nivells en plasma (**figura 1.9**).

Dels esteroides produïts pels fol·licles, per les cèl·lules de la teca interna i de la granulosa, durant el cicle estral destaquen els estrògens. L'estrògen ovàric més important és l'estradiol. Els estrògens tenen un doble efecte de *feedback* negatiu i positiu sobre l'alliberament de les gonadotrofines, sobretot en l'àmbit hipotalàmic (**figura 1.9**), però també sobre el rinencèfal i el sistema límbic. L'acció sobre el sistema límbic es produeix per l'estimulació dels receptors olfactoris per part de les feromones i intervé en la conducta sexual. Les feromones poden exercir, a través d'aquesta via, un efecte estimulador sobre l'hipotàlem, i poden afavorir cicles més regulars, la gestació, l'estre o la pubertat.

Altrament, el control de l'alliberament de la GnRH el duen a terme altres molècules endògenes a més de l'estradiol: la melatonina i els neurotransmissors com l'adrenalina, la noradrenalina, la dopamina i els opiacis endògens.

El caràcter pulsatiu de la secreció de la GnRH hi és present des del naixement i té una amplitud i una freqüència molt precises. A la infància i durant el període prepúber, la secreció de Gn és molt baixa. De fet, durant aquest període prepúber, reapareix aquest patró pulsatiu i, a partir de la pubertat i en l'adult, la secreció pulsativa es manté durant tot el dia. Aquests polsos de secreció són diferents segons la fase del cicle estral. Es parla també d'un ritme circadià de secreció pulsatiu.

L'alliberament pulsatiu de la GnRH per part de l'hipotàlem porta a una estimulació eficient i sostinguda de la síntesi i l'alliberament de les Gn (estimulació intermitent). En canvi, l'exposició permanent a la GnRH, observat en algunes patologies, porta a un efecte contrari a la seva funció natural, ja que es produeix una ràpida abolicció d'ambdues respostes cel·lulars (Lerrant *et al.*, 1995; Janssens *et al.*, 2000).

## 1.9. ANÀLEGS DE L'HORMONA ALLIBERADORA DE GONADOTROFINES

La constatació de la doble funció de la GnRH: (a) la seva funció natural d'alliberament de les Gn en secreció pulsativa i (b) l'abolició d'aquest alliberament quan la seva secreció és continuada, va dur a la creació de molècules anàlogues per tal d'aprofitar-ne tot el potencial.

Hi ha dos tipus d'anàlegs de la GnRH: els agonistes i els antagonistes. El seu disseny es fonamenta en l'alteració de l'estructura peptídica primària de la GnRH, de manera més o menys complexa, per la deleció d'un o més aminoàcids i/o la substitució d'un o més aminoàcids per altres (Janssens *et al.*, 2000). Així, se n'augmenta l'afinitat pel receptor, se n'incrementa la vida mitjana i l'estímul del mecanisme postreceptor.

### 1.9.1. Anàlegs agonistes de l'hormona alliberadora de gonadotrofines

Els anàlegs agonistes de la GnRH (GnRHa) són nonapèptids i decapeptids que incrementen la potència d'acció de la GnRH de 40 fins a 200 vegades. Pel que fa a la triptorelina (D-Trp<sup>6</sup>-LHRH, Bokser *et al.*, 1989), un dels GnRHa més potents i utilitzats, l'única modificació de la molècula original és el canvi de l'aminoàcid glicina en la posició núm. 6 per un D-triptòfan.

La resposta de l'organisme a l'agonista de la GnRH (GnRHa) té dues fases ben diferenciades. Primerament, es fixa al receptor i això indueix una resposta positiva amb gran secreció de Gn. És la fase d'activació (*flare up*), la qual dura entre 7 i 14 dies (Blumenfeld, 2001). Després, en una segona fase, es produeix una neutralització hipofisiària que implica la regulació negativa dels receptors (*down regulation*), entre altres mecanismes. Per tant, l'efecte final dels agonistes és l'abolició de l'eix hipotàlem-hipòfisi-gònada, que es torna a recuperar en un temps variable en interrompre el tractament. D'aquesta manera, els GnRHa aconseguen la inhibició de la secreció de les Gn després d'un període d'exposició continuada (Kovacs i Schally, 2001). En rates femella, l'administració de GnRHa, produeix la interrupció del cicle estral i les femelles romanen en diestre persistent.

Segons diferents experiments (Ataya *et al.*, 1989; Yano *et al.*, 1997; Janssens *et al.*, 2000; Meior *et al.*, 2004), es pot concloure que hi ha una àmplia varietat d'efectes morfològics i funcionals de les dosis farmacològiques dels GnRHa en l'ovari. Es pensa que hi ha diversos factors que podrien estar implicats en aquest procés: el tipus, la dosi i els diferents règims d'administració del fàrmac agonista; l'estadi de l'ovari en el moment de l'exposició a l'agonista; el pretractament hormonal i l'espècie estudiada (Janssens *et al.*, 2000).

Els GnRHa tenen dos efectes possibles, cadascun amb aplicacions diferents en l'espècie humana. Pel que fa al seu efecte semblant a la GnRH, actualment, tenen indicacions: en càncers ginecològics (Furui *et al.*, 2000), en malalties i desordres ginecològics, (Weissman *et al.*, 1998; Mechsner *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2007; Kunz *et al.*, 2007) i en tractaments de fertilitat i de reproducció (Schally *et al.*, 1980; Biljan *et al.*, 1998; Check i Katsoff, 2008). Pel que fa al seu efecte d'inhibició de l'eix hipotàlem-hipòfisi-gonadal, se n'ha demostrat la seva utilitat i eficàcia com a protectors gonadals enfront la quimioteràpia i la radioteràpia en pacients de càncer (Parmar *et al.*, 1985a; 1985b; 1988a; 1988b; 1991). En línies cel·lulars humanes,

diversos estudis n'han demostrat l'efecte positiu (Emons i Schally, 1994; Emons *et al.*, 1998; von Alten *et al.*, 2006). Altrament, la triptorelina s'ha demostrat també beneficiosa en femella de rata (Jarrell *et al.*, 1987; Pour *et al.*, 1988).

### **1.9.2. Efectes dels anàlegs agonistes enfront de la radioteràpia**

Com ja és sabut, des del final dels anys 70 del segle XX per alguns estudis clínics, el ovaris de pacients prepúber i tractades amb anàlegs de la GnRH són més toxicoresistents que els de pacients adultes (Whitehead *et al.*, 1982; Damewood i Grochow, 1986). Així doncs, es pensa que hi pot haver protecció pel fet de no tenir en funcionament el cicle ovàric enfront de les agressions a tots els nivells de la radioteràpia (i també de la quimioteràpia).

Malgrat la necessitat teòrica de conèixer les bases biològiques d'aquest fet contrastat, són pocs els estudis, fins al moment, que han tingut com a objectiu l'anàlisi de la possible protecció dels anàlegs de la GnRH enfront dels efectes de la RI (radioteràpia, raigs X), i sempre amb resultats contradictoris en relació amb l'existència de radioprotecció. En aquests escassos estudis no s'han analitzat marcadors citogenètics, sinó que fan referència a dades clíniques, histològiques (Ataya *et al.*, 1989; Albarracín, 1996), morfològiques (Jarrell *et al.*, 1987), farmacològiques (Jarrell *et al.*, 1987) i gestacionals.

Com a resum, els efectes dels GnRHa, en quant a la protecció del dany gonadal, tant en humans (Blumenfeld *et al.*, 1996; Blumenfeld, 2001; Sugiyama *et al.*, 2003; Blumenfeld i Eckman, 2005; Elis *et al.*, 2006; Wirth *et al.*, 2007; Ishiguro *et al.*, 2007; Falorio *et al.*, 2008;) com en models animals (Jarrell *et al.*, 1987; Schally *et al.*, 1987; Ataya *et al.*, 1989; Jarrell *et al.*, 1991; Morris, 1993; Ataya *et al.*, 1995; Albarracín, 1996; Gosden *et al.*, 1997), poden ser positius i negatius, depenent del fàrmac agonista utilitzat, de l'espècie o del sexe de l'individu estudiat, així com de la dosi administrada.



## 2. Objectius

*The important thing is not to stop questioning.*

*Curiosity has its own reason for existing.*

Albert Einstein



Aquest treball segueix dues línies de investigació que, de forma paral·lela, s'han dut a terme en el nostre grup de recerca a la unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Els objectius d'aquestes línies són: (1) l'estudi citogenètic de l'oogènesi en l'espècie humana (Garcia, 1987; Garcia *et al.*, 1987; 1989; Roig *et al.*, 2005a; 2005b; Roig, 2005; Roig *et al.*, 2006; Robles *et al.*, 2007; Robles, 2008) i en un model experimental (*Rattus norvegicus*, Pujol *et al.*, 1988; 1996; 1997; Martínez-Flores *et al.*, 1998; 2000; 2001), i (2) l'anàlisi, també citogenètica, dels efectes hereditaris de les radiacions ionitzants en femella de mamífer (*Rattus norvegicus*, Pujol, 1994; Pujol *et al.*, 1996; 1997; Martínez-Flores, 1997; Martínez-Flores *et al.*, 1998; 2000).

A partir d'aquests antecedents, aquest treball de tesi doctoral se centra en l'anàlisi citogenètica de les cèl·lules somàtiques de la descendència de femelles adultes irradiades (*Rattus norvegicus*), per conèixer els possibles efectes hereditaris de la irradiació.

Altament, els antecedents, en relació amb la cerca de radioprotectors gonadals per tal de pal·liar els efectes de la radioteràpia, tant en l'espècie humana (Blumenfeld *et al.*, 1996; Blumenfeld, 2001; Sugiyama *et al.*, 2003; Blumenfeld i Eckman., 2005; Elis *et al.*, 2006; Falorio *et al.*, 2008) com en altres mamífers (Jarrell *et al.*, 1987; 1991; Ataya *et al.*, 1995; Gosden *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2005; Albarracín, 1996), són escassos i contradictoris. És en aquest context que el nostre laboratori va iniciar una col·laboració amb els grups dirigits pel Dr. Juan José Parrilla, cap del *Servicio de Ginecología y Obstetricia* de l'*Hospital Virgen de la Arrixaca*, i pel Dr. Joaquim Calaf, cap de Ginecologia i Obstetrícia de l'*Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau*.

L'objectiu d'aquesta col·laboració, apropant la recerca bàsica a la clínica, es concreta en el disseny d'un marc experimental en el qual, utilitzant femelles adultes de *Rattus norvegicus*, es determina el possible efecte radioprotector d'un anàleg agonista de l'hormona alliberadora de les gonadotrofines.

En aquest sentit, aquesta tesi té quatre objectius principals:

1. Analitzar els efectes de la radiació ionitzant en la descendència de femelles de rata irradiades.
2. Estudiar la possible interacció dels efectes citogenètics de la radiació ionitzant amb els efectes d'un mutagen químic (afidicolina).
3. Conèixer la possible modulació dels efectes radioinduits, tant citogenètics com reproductius, per part d'un anàleg agonista de l'hormona alliberadora de gonadotrofines (triptorelina).
4. Caracteritzar les bandes cromosòmiques implicades en les alteracions cromosòmiques radioinduides i relacionar-les amb altres regions cromosòmiques inestables de l'espècie: les bandes cromosòmiques afectades per un mutagen químic (afidicolina), els llocs fràgils i les seqüències telomèriques intersticials.





### 3. Materials i mètodes

*It is inexcusable for scientists to torture animals;  
let them make their experiments on journalists  
and politicians.*

Henrik Ibsen



### 3.1. MATERIAL BIOLÒGIC

#### 3.1.1. Les mares

Aquesta sèrie d'estudis s'ha dut a terme amb un total de 83 rates femella adultes de l'espècie *Rattus norvegicus* (rata noruega, RNO) de la soca Sprague-Dawley. Les rates femella utilitzades són adultes joves (pels volts de dos mesos de vida) i d'un pes mitjà de 250 g en començar l'experiment.

Aquests animals procedeixen i han estat tractats en dos centres: el *Servicio de Animales de Laboratorio* de la *Universidad de Murcia*, i el Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona.

La relació de totes les femelles utilitzades es presenta a la **taula 3.1**. Algunes de les femelles van ser utilitzades en diversos estudis, tal com es mostra a la **taula 3.2**.

#### 3.1.2. Els fetus

S'ha estudiat un total de 252 fetus. El moment òptim de sacrifici per tal d'obtenir el màxim nombre de cèl·lules és el dia 15. No obstant això, atès el volum de mostra i el disseny experimental, els sacrificis es van moure generalment entre els 14 i els 16 dies de gestació. Només en casos puntuals es va cultivar material fetal de menys de 13 i fins a 19 dies de gestació.

#### 3.1.3. Les cèl·lules

S'han utilitzat 26.281 fibroblasts provinents de cultius primaris de cèl·lules de fetus d'RNO per estudiar citogenèticament els efectes de la radiació ionitzant en la descendència, la possible radioprotecció d'un anàleg de la GnRH i els efectes d'un mutagen químic i per caracteritzar els llocs fràgils i les seqüències telomèriques intersticials en RNO.

#### 3.1.4. Els ovaris i l'úter

S'estudien els òrgans genitals interns de cada femella (els ovaris i l'úter) per a l'anàlisi gestacional de l'estudi de radioprotecció d'un anàleg de la GnRH.

**Taula 3.1.** Material analitzat en els diferents estudis classificats per objectius

Estudis	Mares	Fetus	Cèl·lules
<i>Objectiu 1</i>			
Efectes hereditaris de la radiació ionitzant			
I. <i>Genomic instability in rat: Breakpoints induced by ionising radiation and interstitial telomeric-like sequences</i>	17	52	4.803
II. <i>Trans-generational radiation-induced chromosomal instability in the female enhances the action of chemical mutagens</i>	17	46	4.806
III. <i>The GnRH analogue triptorelin confers ovarian radioprotection to adult female rats</i>	83 (a)	236	22.151
<i>Objectiu 2</i>			
Possible interacció dels efectes de la radiació ionitzant amb els efectes d'un mutagen químic			
II. <i>Trans-generational radiation-induced chromosomal instability in the female enhances the action of chemical mutagens</i>	17	46	4.806
<i>Objectiu 3</i>			
Radioprotecció de l'anàleg agonista de la GnRH			
III. <i>The GnRH analogue triptorelin confers ovarian radioprotection to adult female rats</i>	83 (a)	236	22.151
<i>Objectiu 4</i>			
Cromosomes i bandes cromosòmiques			
Cromosomes i bandes cromosòmiques implicades en les alteracions cromosòmiques radioinduídes			
IV. Cromosomes i bandes cromosòmiques genèticament inestables	65	236	22.151
Bandes cromosòmiques implicades en els efectes del mutagen químic afidicolina			
II. <i>Trans-generational radiation-induced chromosomal instability in the female enhances the action of chemical mutagens</i>	4	9	1.326
Caracterització dels llocs fràgils en RNO			
IV. Cromosomes i bandes cromosòmiques genèticament inestables	3	11	1.740
Caracterització de les seqüències telomèriques intersticials en RNO			
I. <i>Genomic instability in rat: Breakpoints induced by ionising radiation and interstitial telomeric-like sequences</i>	3	3	305

(a) 82 per a l'anàlisi reproductiva i 65 per a l'anàlisi citogenètica

Taula 3.2. Resum dels fetus analitzats en tots els experiments <sup>(1)</sup>

C			C+5			C+12			A			A+5			A+12		
C Ma	C Fe	MAn	C Ma	C Fe	MAn	C Ma	C Fe	MAn	C Ma	C Fe	MAn	C Ma	C Fe	MAn	C Ma	C Fe	MAn
S1 C.2	F1	97	S1 C+5.1	F1	69	S1 C+12.1	F2	99	S17 A.1	F2	100	S3 A+5.1	F1	106	S1 A+12.1	F1	119
S1 C.2	F2	106	S1 C+5.1	F3	115	S1 C+12.1	F3	105	S17 A.1	F3	100	S3 A+5.1	F2	125	S1 A+12.1	F2	36
S1 C.2	F3	118	S1 C+5.1	F4	103	S1 C+12.1	F4	97	S17 A.1	F4	102	S3 A+5.1	F3	109	S1 A+12.1	F3	106
S1 C.2	F4	87	S2 C+5.1	F1	108	S1 C+12.1	F5	101	S17 A.1	F6	100	S3 A+5.1	F4	138	S2 A+12.1	F1	124
S7 C.1	F2	108	S2 C+5.1	F2	105	S2 C+12.1	F1	112	S17 A.2	F1	100	S7 A+5.2	F5	102	S2 A+12.1	F2	115
S7 C.1	F3	123	S2 C+5.1	F3	128	S2 C+12.1	F2	105	S17 A.2	F2	100	S8 A+5.1	F1	112	S2 A+12.1	F3	102
S7 C.1	F4	111	S2 C+5.1	F4	102	S2 C+12.1	F3	99	S17 A.2	F4	100	S8 A+5.1	F2	104	S2 A+12.1	F4	106
S7 C.1	F6	233	S2 C+5.1	F5	100	S2 C+12.1	F4	99	S17 A.2	F6	100	S8 A+5.1	F4	107	S2 A+12.2	F1	102
S8 C.1	F1	105	S9 C+5.1	F1	107	S3 C+12.1	F1	41	S17 A.3	F1	100	S8 A+5.1	F6	103	S2 A+12.2	F2	100
S8 C.1	F3	106	S9 C+5.1	F2	273	S3 C+12.1	F2	11	S17 A.3	F5	100	S8 A+5.2	F2	16	S2 A+12.2	F3	103
S8 C.1	F4	111	S9 C+5.1	F3	116	S3 C+12.1	F4	24	S17 A.3	F6	100	S8 A+5.2	F3	100	S2 A+12.2	F4	101
S8 C.1	F5	102	S9 C+5.1	F4	107	S3 C+12.1	F5	119	S17 A.3	F8	100	S8 A+5.2	F5	15	S3 A+12.1	F2	101
S10 C.1	F1	101	S11 C+5.1	F2	100	S3 C+12.2	F1	102	S17 A.4	F1	100	S8 A+5.2	F6	105	S3 A+12.1	F3	103
S10 C.1	F2	102	S11 C+5.1	F3	100	S3 C+12.2	F2	112	S17 A.4	F2	100	S10 A+5.1	F1	102	S3 A+12.1	F4	114
S11 C.1	F1	102	S11 C+5.1	F4	101	S3 C+12.2	F3	115	S17 A.4	F3	100	S10 A+5.1	F2	101	S3 A+12.1	F5	112
S11 C.1	F2	101	S11 C+5.1	F5	103	S3 C+12.2	F4	102	S17 A.4	F4	100	S10 A+5.1	F3	106	S3 A+12.2	F2	118
S11 C.1	F4	101	S12 C+5.1	F1	100	S8 C+12.1	F2	103	S17 A.4	F8	100	S10 A+5.1	F4	101	S3 A+12.2	F3	13
S11 C.1	F5	103	S12 C+5.1	F2	100	S8 C+12.1	F4	117	S17 A.4	F3	100	S11 A+5.1	F1	101	S3 A+12.2	F4	20
S11 C.2	F1	100	S12 C+5.1	F3	100	S8 C+12.1	F5	104	S17 A.4	F4	100	S11 A+5.1	F2	101	S3 A+12.2	F5	13
S11 C.2	F2	101	S12 C+5.1	F4	101	S8 C+12.1	F6	104	S17 A.4	F3	100	S11 A+5.1	F3	101	S6 A+12.2	F2	97
S11 C.2	F3	100	S13 C+5.1	F1	100	S11 C+12.1	F1	100	S17 A.4	F4	100	S11 A+5.1	F5	100	S6 A+12.2	F3	102
S11 C.2	F6	100	S13 C+5.2	F1	100	S11 C+12.1	F5	27	S17 A.4	F4	100	S15 A+5.1	F3	100	S6 A+12.2	F4	110
S12 C.1	F1	100	S13 C+5.2	F2	100	S11 C+12.1	F6	136	S17 A.4	F4	100	S15 A+5.1	F4	100	S6 A+12.2	F5	14
S12 C.1	F2	100	S13 C+5.2	F3	100	S12 C+12.1	F1	101	S17 A.4	F3	100	S15 A+5.1	F5	100	S7 A+12.2	F1	126
S12 C.1	F4	100	S13 C+5.2	F5	100	S12 C+12.1	F2	100	S17 A.4	F3	100	S15 A+5.1	F6	100	S7 A+12.2	F2	24
S12 C.1	F6	100	S13 C+5.2	F6	221	S12 C+12.1	F3	100	S17 A.4	F4	100	S15 A+5.2	F1	102	S7 A+12.2	F3	55
C	F3	39	S15 C+5.1	F2	100	S12 C+12.1	F4	100	S17 A.4	F4	100	S15 A+5.2	F2	100	S7 A+12.2	F6	100
C	F7	53	S15 C+5.1	F3	100	S12 C+12.2	F2	100	S17 A.4	F4	100	S15 A+5.2	F3	100	S8 A+12.1	F2	110
C4	F1	199	S15 C+5.1	F5	100	S12 C+12.2	F4	100	S17 A.4	F4	100	S15 A+5.2	F4	100	S8 A+12.1	F3	110
C4	F3	280	S15 C+5.2	F1	100	S12 C+12.2	F5	100	S17 A.4	F4	100	S16 A+5.1	F2	102	S8 A+12.1	F5	106
C4	F4	105	S15 C+5.2	F2	100	S12 C+12.2	F6	100	S17 A.4	F4	100	S16 A+5.1	F3	100	S8 A+12.1	F6	107
C4	F6	106	S15 C+5.2	F4	100	S13 C+12.1	F1	102	S17 A.4	F4	100	S16 A+5.1	F4	100	S8 A+12.2	F1	107
C5	F1	102	S15 C+5.2	F6	200	S13 C+12.1	F3	101	S17 A.4	F4	100	S16 A+5.1	F6	100	S8 A+12.2	F2	105
C5	F4	204	S15 C+5.3	F2	100	S13 C+12.1	F6	100	S17 A.4	F4	100	S16 A+5.2	F2	100	S8 A+12.2	F3	110
C5	F5	363	S15 C+5.3	F4	100	S13 C+12.2	F2	100	S17 A.4	F4	100	S16 A+5.2	F3	100	S8 A+12.2	F5	106

(Peu de pàgina a la pàgina següent)

**Taula 3.2.** (cont.) Resum dels fetus analitzats en tots els experiments <sup>(1)</sup>

C			C+5			C+12			A+5			A+12		
C Ma	C Fe	MAn	C Ma	C Fe	MAn	C Ma	C Fe	MAn	C Ma	C Fe	MAn	C Ma	C Fe	MAn
C5	F6	104	S15 C+5.3	F5	100	S13 C+12.2	F3	100	S16 A+5.2	F4	100	S9 A+12.1	F1	104
C5	F7	185	S16 C+5.1	F2	100	S13 C+12.2	F5	100	S16 A+5.2	F5	100	S9 A+12.1	F2	105
			S16 C+5.1	F5	100	S14 C+12.1	F1	100	S16 A+5.4	F2	100	S9 A+12.1	F3	108
			S16 C+5.1	F6	100	S14 C+12.1	F4	100	S16 A+5.4	F3	100	S9 A+12.1	F5	111
			S16 C+5.2	F2	206	S14 C+12.1	F5	107	S16 A+5.4	F4	100	S10 A+12.1	F1	101
			S16 C+5.2	F4	103	S14 C+12.1	F6	100				S10 A+12.1	F2	101
			S16 C+5.2	F5	100	S15 C+12.1	F2	100				S10 A+12.1	F4	100
			S16 C+5.2	F6	103	S15 C+12.1	F3	100				S10 A+12.1	F6	102
			S16 C+5.3	F1	100	S15 C+12.1	F6	100				S11 A+12.1	F2	100
			S16 C+5.3	F2	100	S15 C+12.2	F2	100				S11 A+12.1	F3	103
			S16 C+5.3	F4	100	S15 C+12.2	F4	100				S11 A+12.1	F5	100
			S16 C+5.4	F1	100	S15 C+12.2	F5	100				S11 A+12.1	F6	103
			S16 C+5.4	F2	202	S15 C+12.3	F4	100				S11 A+12.2	F1	100
			S16 C+5.4	F4	100	S15 C+12.3	F5	100				S11 A+12.2	F2	100
			S16 C+5.4	F6	100	S15 C+12.3	F6	100				S11 A+12.2	F3	103
												S11 A+12.2	F4	100
												S12 A+12.1	F1	100
												S12 A+12.1	F3	100
												S12 A+12.1	F5	103
												S12 A+12.1	F6	100
												S12 A+12.2	F1	100
												S12 A+12.2	F3	100
												S12 A+12.2	F4	103
												S12 A+12.2	F6	100

(1) Es van analitzar quinze sèries d'animals, les sèries 4 i 5 no es van estudiar per problemes metodològics

C Ma Codi de la femella

C Fe Codi del fetus

MAn Metafases analitzades

Efectes de la radiació ionitzant (*objectiu 1*)

Anàlisi dels cromosomes i de les bandes cromosòmiques implicades en els efectes transgeneracionals de la radiació ionitzant (*objectiu 4*)

Efectes de les radiacions ionitzants i possible interacció dels efectes de la radiació ionitzant amb els efectes d'un mutagen químic (*objectius 1 i 2*)

Possible radioprotecció de l'anàleg de la GnRH (*objectiu 3*)

Anàlisi de les bandes cromosòmiques implicades en els efectes del mutagen químic afidicolina (*objectiu 4*)

Caracterització dels llocs fràgils (*objectiu 4*)

Caracterització de les seqüències telomèriques intersticials (*objectiu 4*)

### 3.2. MÈTODES

La manipulació de les femelles i els posteriors cultius cel·lulars es van fer en dos centres diferents: al *Servicio de Cultivo de Tejidos* (SCT) de la *Universidad de Murcia* i també al Servei de Cultius Cel·lulars de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB) de la UAB. La resta de procediments es van dur a terme majoritàriament a la UAB, a la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica de la Facultat de Medicina, a la Unitat de Biologia Cel·lular de Facultat de Biociències i al laboratori de Citogenètica de l'IBB. La tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) per a la detecció de seqüències telomèriques intersticials es va fer al laboratori de la Dra. E. Giulotto, al *Dipartimento di Genetica e Microbiologia Adriano Buzzati Traverso, Università degli Studi di Pavia* (Itàlia).

Els resums de tots els dissenys experimentals es mostren en les **figures 3.1, 3.2, 3.3 i 3.4**.

#### 3.2.1. La manipulació de les femelles

L'experimental es va dividir en quinze sèries, que contenien femelles control i femelles de la resta de grups de tractament.

#### ***Tractament de les femelles amb un anàleg agonista de l'hormona alliberadora de gonadotrofines***

L'anàleg agonista de la GnRH administrat és el principi actiu triptorelina (fàrmac Decapeptyl® 3,75 mg, Ipsen). Aquest fàrmac s'administra en tres dosis (a dia 0, a dia 28 i a dia 56) als diferents grups de tractament: A (control), A + 5 (irradiada a 5 Gy, dosi aguda) i A + 12 (irradiada a 12 Gy, dosi fraccionada) (**figura 3.1**).

El fàrmac s'administra amb una injecció intramuscular a la cara interna de la cuixa de l'animal amb una xeringa d'insulina (40 unitats en 1 ml), alternant l'extremitat dreta amb l'esquerra en les diferents administracions.

La dosi del fàrmac inoculada és de 0,05 ml per cada 100 g (0,094 mg/100 g). D'aquesta manera, s'injectarien 0,125 ml en un animal de 250 g. Les rates es pesen just abans d'administrar-los el fàrmac per ajustar-ne la dosi.

#### ***Tractament de les femelles amb raigs X***

El tractament amb raigs X es va dur a terme al *Servicio de Radiología de l'Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca* (Múrcia). S'anestesia l'animal amb el fàrmac Thalamonal (amb els principis actius droperidol i fentanil, Roche) amb una concentració de 0,1 cc/100 g de pes (1 ml per 10 kg). Es col·loca l'animal panxa amunt, s'immobilitza i es delimita la zona a irradiar, de 5 x 5 cm a la zona abdominal. S'irradia la zona delimitada amb irradiació amb font de cobalt (**figura 3.1**). Hi ha dos tipus de tractaments amb raigs X (**figura 3.1**):

- Dosi aguda de 5 Gy: 5 Gy durant 2,57 minuts, als grups de tractament C + 5 i A + 5.
- Dosi fraccionada de 12 Gy: 3 Gy durant 1,54 minuts i durant 4 dies consecutius, als grups de tractament C + 12 i A + 12.



**Encreuament, seguiment de la gestació i eutanàsia**

Prèviament als protocols que tot seguit es detallaran, hi ha un període de creuament de fins a dues setmanes amb mascles de la mateixa soca i de fertilitat reconeguda.

Posteriorment es fa un seguiment de la gestació de les femelles mitjançant la identificació d'un tap mucós (o diversos taps) a la vagina de la femella, que està format per les secrecions de les glàndules accessòries del mascle i les secrecions vaginals de la femella.

En arribar al dia 14-16 de gestació, se sacrifica de la femella gestant mitjançant el mètode eutanàsic d'inhalació de diòxid de carboni.

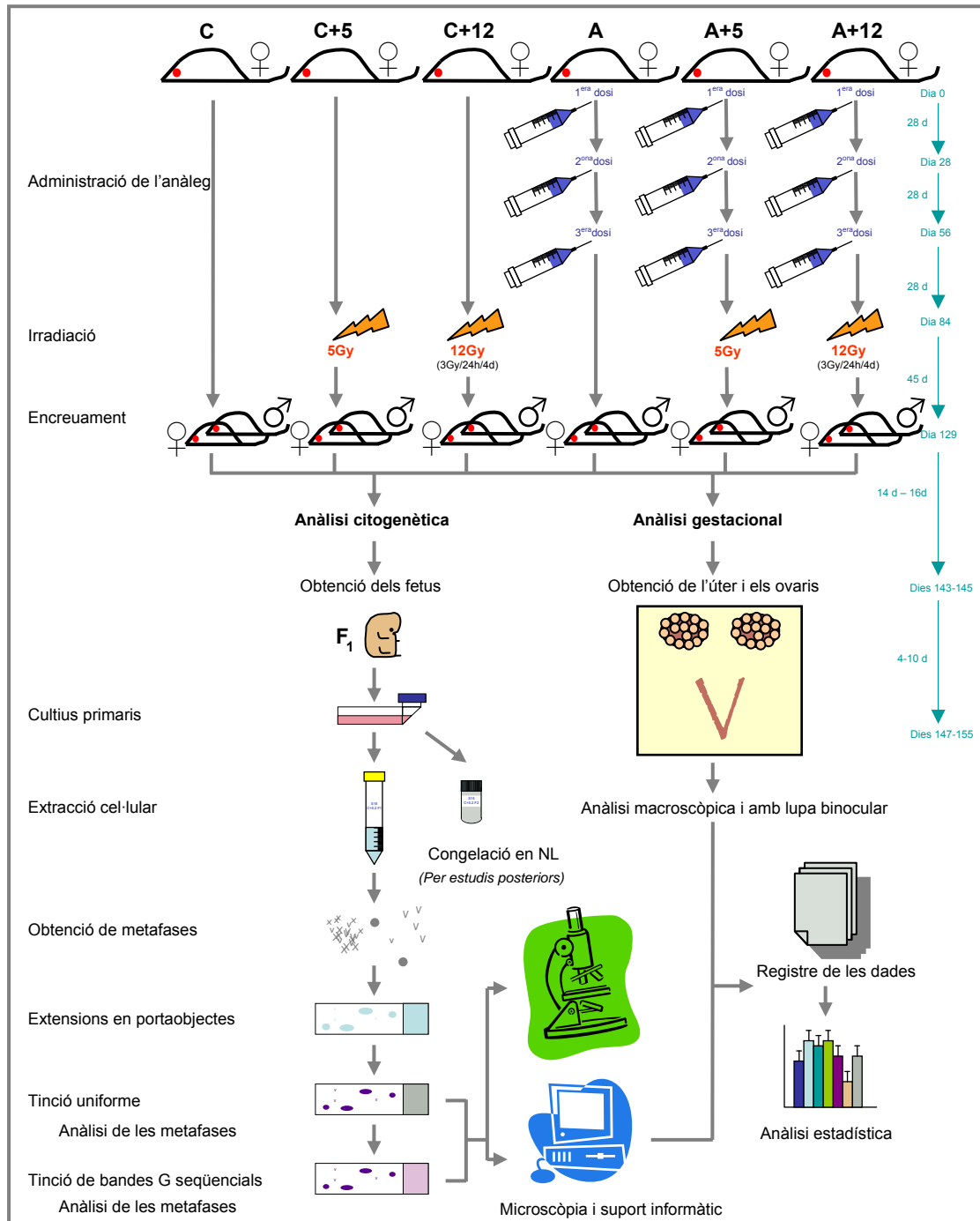
**Obtenció del material biològic: ovaris, úter i fetus**Reactius i equipament

- Material quirúrgic (Talmed, Watch, Braun):
  - Tisores quirúrgiques de punxa fina i rectes
  - Pinces quirúrgiques amb extrem rom
  - Pinces quirúrgiques amb dents
- Plaques de Petri estèrils de plàstic de 60 i 90 mm de diàmetre
- Vidre estèril
- PBS estèril
- Etanol al 70 % (70 etanol: 30 aigua MilliQ),
- Etanol al 96 % (Flucka)
- Flama o aparell esterilitzador
- Lupa binocular
- Llum freda
- Base de porexpan
- Agulles hipodèrmiques (12)
- Paper de filtre
- Cabina de flux laminar horitzontal

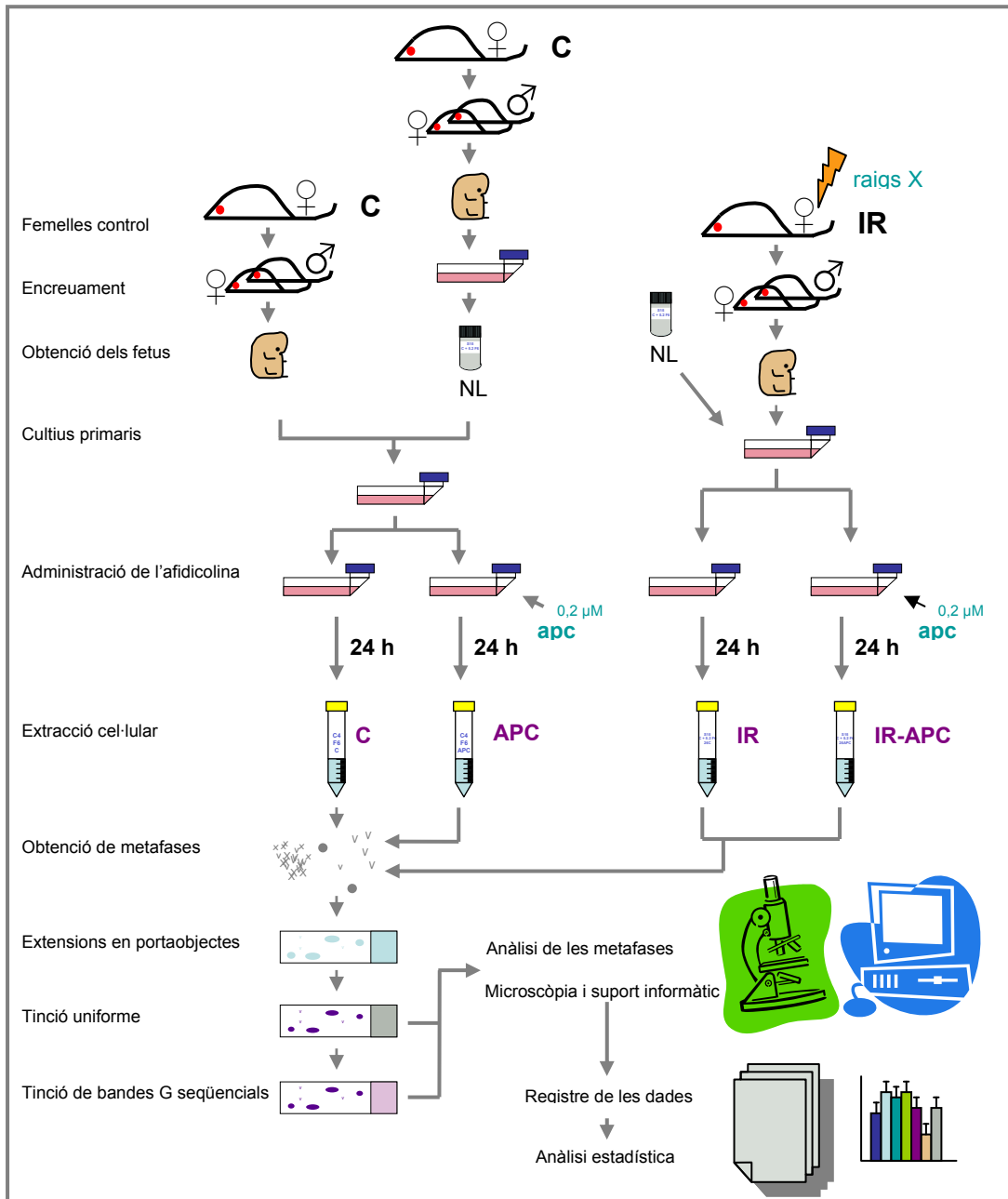
Protocol d'obtenció dels òrgans genitals interns: ovaris i úter

En la majoria dels casos, la manipulació de les femelles es va fer en una cabina de flux laminar horitzontal.

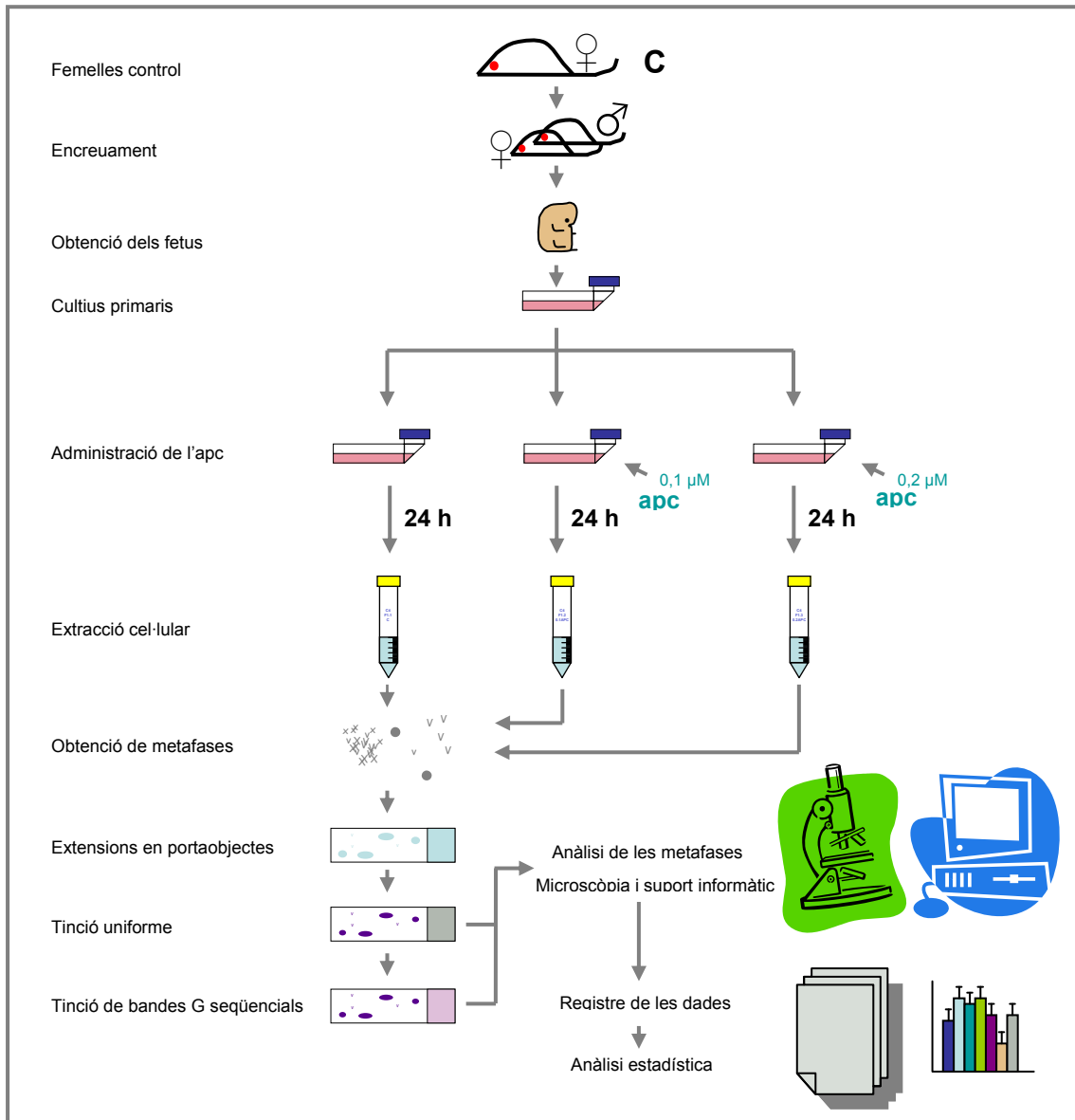
1. S'encén el flux laminar de la cabina i es deixa uns 10 minuts amb llum ultraviolada.
2. Es prepara una base de porexpan amb diversos papers de filtre doblegats sobre la base.
3. Es col·loca l'animal panxa amunt sobre la base de porexpan.
4. Se li subjecten les extremitats inferiors i superiors amb agulles hipodèrmiques (**figura 3.5a**).
5. S'esterilitza la zona ventral de l'animal amb etanol al 70 %: des de les costelles fins a la zona urogenital i s'esterilitza el material quirúrgic amb etanol al 96 % i flama, o bé amb un aparell esterilitzador (a partir de 200 °C).



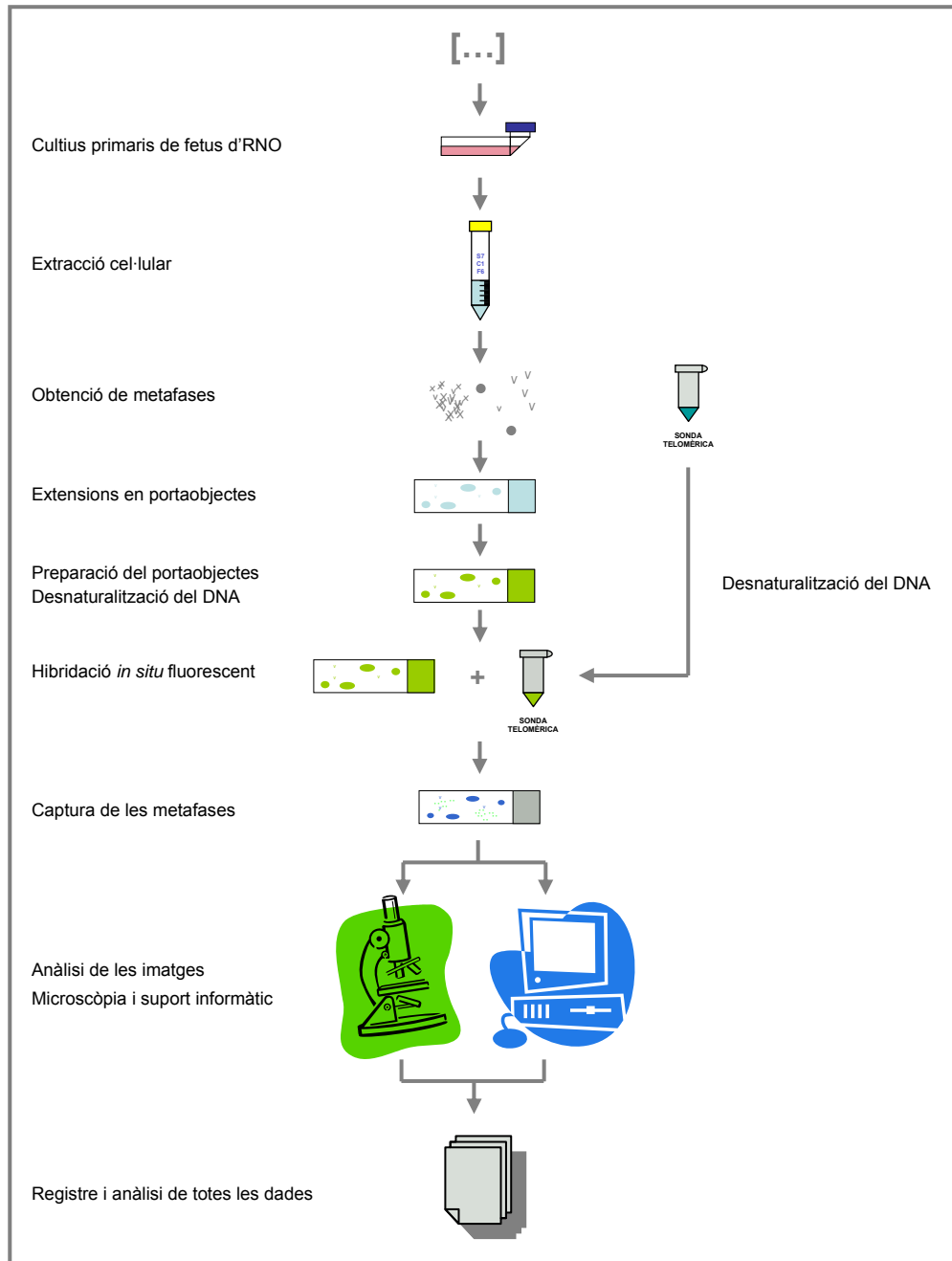
**Figura 3.1.** Disseny de l'experiment: "Estudi citogenètic i gestacional de la possible radioprotecció d'un anàleg de la GnRH i de l'efecte hereditari de les radiacions ionitzants en RNO". C: controls; C + 5: irradiades a 5 Gy; C + 12: irradiades a 12 Gy; A: tractades amb l'GnRH; A + 5: tractades amb l'GnRH i irradiades a 5 Gy; A + 12: tractades amb l'GnRH i irradiades a 12 Gy; d: dies; NL: nitrogen líquid.



**Figura 3.2.** Disseny de l'experiment: "Inestabilitat cromosòmica radioinduída transgeneracional en RNO i la seva relació amb l'acció dels mutàgens químics". C: controls; IR: irradiades; NL: nitrogen líquid; apc: afidicolina; h: hores; APC: cultius tractats amb afidicolina, IR-APC: irradiades i cultius tractats amb afidicolina.



**Figura 3.3.** Disseny de l'experiment: "Caracterització dels llocs fràgils en RNO". C: controls; apc: afidicolina; h: hores.



**Figura 3.4.** Disseny de l'experiment: "Caracterització de les seqüències telomèriques intersticials en RNO".

6. Es fa una incisió entre la pell i el múscul, amb les tisores de punxa fina i rectes, per separar ambdós teixits al llarg de la zona abdominal des de la vora de l'orifici vaginal fins a la zona del diafragma.
7. Se separa la pell del múscul amb l'ajut de les tisores i unes pinces.
8. Es va repelant i separant la pell i la capa muscular, aguantant la pell amb agulles, i es mostra la zona muscular.
9. Es torna a esterilitzar el material i es passa una mica de cotó fluix amb etanol al 70% per sobre de la superfície del múscul.
10. Es fa el mateix tipus d'incisions i separacions amb la capa muscular, deixant a la vista la cavitat abdominal (**figura 3.5a**).
11. S'aparten l'intestí i els òrgans que estan per sobre els ovaris i l'úter<sup>(1)</sup> amb les pinces.
12. Es dissequen els òrgans genitals interns (úter i ovaris) *in situ* i es procedeix a la seva extracció per separat.
13. Es posen en plaques de Petri amb PBS.
14. Si la rata és gestant, se separa suaument el greix de la mare i es posa en una placa gran amb PBS, per rentar-lo.
15. Es col·loca sobre un vidre estèril (o d'una placa de Petri de 90 mm de diàmetre), diferenciant el costat dret de l'esquerre (per al comptatge) i s'hi diposita PBS pel damunt perquè no s'assequi (**figura 3.5b i c**).
16. Es fa un recompte dels fetus i de les pèrdues postimplantacionals<sup>(2)</sup>, indicant-ne el tipus (primerenques i tardanes) per cada costat de l'úter.

#### Protocol d'obtenció dels fetus

17. Es fa una incisió al llarg de l'úter amb tisores i pinces. Observem els sacs gestacionals amb els embrions dins (**figura 3.5d**).
18. Se separen els sacs de la placenta amb les tisores i després s'estira el sac amb les pinces, trencant-lo (el fetus surt quasi bé tot sol).
19. Es van col·locant els fetus en una placa de Petri gran amb PBS, indistintament de si són de la part dreta o de l'esquerre de l'úter, a fi que el mostreig sigui a l'atzar (**figura 3.5e**).
20. Se'n separen sis fetus, per fer-ne els cultius.
21. Es fa el recompte dels cossos lutis<sup>(3)</sup> dels ovaris sota la lupa binocular.

<sup>(1)</sup> L'úter té forma d'V (bicorn) i els ovaris són al final de cada branca, embolcallats de teixit adipós (**fig. 3.5a, b i c**). Si la rata no és gestant, l'úter és petit i té una forma de V molt marcada, és rosat i irrigat. Si la rata és gestant, l'úter, d'un color granatós–lilós, està molt irrigat, desenvolupat i enroscat per tota la zona abdominal (**fig. 3.5a**). Té una morfologia semblant a un collaret de perles, en què les perles són els fetus (**fig. 3.5a, b i c**).

<sup>(2)</sup> Punt d'implantació on el fetus no ha evolucionat en el seu creixement i s'està reabsorbint; les pèrdues primerenques indiquen que hi ha hagut una implantació, però no s'hi observa embrió o fetus. En les pèrdues tardanes s'observa l'embrió o fetus.

<sup>(3)</sup> Els cossos lutis són bultets rosats o blanquinosos, irrigats, opacs i poden ser grans, mitjans o petits.

### 3.2.2. Establiment dels cultius primaris de cèl·lules fetals

#### Reactius i equipament

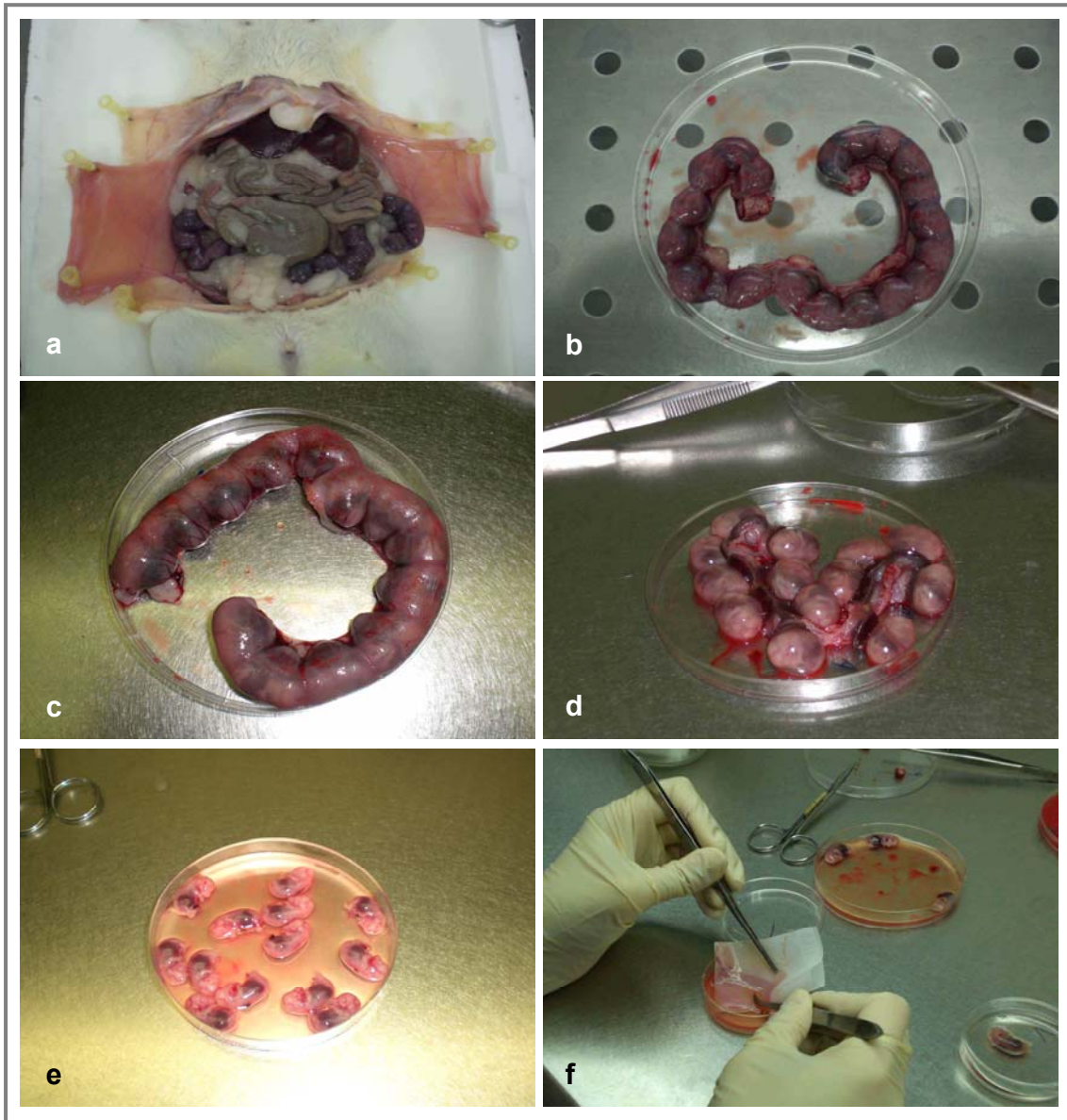
- Malles de fibra de *nylon* amb porus de 114 µm de diàmetre rentades i esterilitzades
- Pinceres quirúrgiques (Braun)
- Plaques de Petri estèrils de 60 mm de diàmetre (Nunc™)
- Tubs de fons cònic de 15 ml estèrils (TPP<sup>R</sup>, Falcon, nunc™)
- Flascons de cultiu de 25 cm<sup>2</sup> amb tap ventilat (Nunc™, Sarstedt, Corning)
- Plaques de Petri de 35 mm de diàmetre (Nunc™)
- Pipetes *Pasteur* llargues estèrils
- Xumet (per a l'aspirat amb pipetes *Pasteur*)
- Pipetes graduades de 5 i 10 ml estèrils (Brand)
- Pipetejador automàtic
- Etanol al 96 % (Fluka)
- PBS estèril a 37 °C
- Sèrum boví fetal (SBF, Sigma)
- Antibiòtic [penicil·lina (5.000 unitats/mL) i estreptomina (5 000 µg/mL), Gibco]
- Medi de cultiu estèril DMEM d'1 g de glucosa/L complementat amb L-glutamina 200 mM, amb SBF al 20 % i amb antibiòtic (1 mL/100 mL de medi) a 37 °C
- Retolador de vidre
- Flama
- Bomba de buit per a aspirar solucions
- Bany a 37 °C
- Incubador a 37 °C al 8 % de CO<sub>2</sub>
- Cabina de flux laminar vertical
- Centrífuga

L'edat òptima per a fer els cultius primaris és de 14–15 dies de gestació. No obstant això, s'han utilitzat diferents protocols en funció dels dies de gestació fetals, ja que la quantitat i la qualitat de la mostra són diferents. S'efectua un protocol amb malles per disgregar mecànicament el teixit fetal. Els cultius primaris fetals es duen a terme en una cabina de flux laminar vertical, per tal de garantir l'esterilitat del procés.

1. S'encén el flux de la cabina i es deixa uns deu minuts amb llum ultraviolada.
2. Es neteja la superfície de la cabina amb etanol al 70 % (mesures d'esterilitat). Es deixa el material necessari dins la cabina.
3. Es posa el PBS estèril i el medi de cultiu estèril en el bany a 37 °C.

#### **Protocol per a fetus de 14 fins a 17 dies de gestació**

4. Els fetus, acabats d'extreure, estan en PBS en una placa de Petri (**figura 3.5e**).



**Figura 3.5.** Procediment per a l'obtenció de cèl·lules fetals: (a) femella amb la cavitat abdominal oberta; (b) úter gestant amb fetus corresponents a 14 dies de vida i els ovaris al final de cada branca; (c–f) corresponen al mateix cas: (c) úter amb fetus corresponents a 16 dies de gestació; (d) úter obert amb els sacs gestacionals que contenen els fetus amb els discs placentaris corresponents; (e) tots els fetus recollits; (f) procediment d'obtenció de les cèl·lules fetals per al cultiu mitjançant disgregació mecànica.



5. Es numeren sis plaques de Petri (de 60 mm), es col·loquen l'una al costat de l'altra i es dipositen 5 ml de PBS dins de cada placa.
6. Es posa un fetus dins de cada placa.
7. Es preparen sis tubs de 15 ml amb fons cònic en una gradeta, es numeren i es deixen mig oberts.
8. Es flamegen les pinces amb etanol 96 %.
9. S'agafa una malla estèril.
10. S'obre una placa de Petri i s'agafa el fetus amb les pinces.
11. Amb l'altra pinça es té agafada la malla i es fa entrar el fetus dins.
12. Es recolza la malla dins la placa amb una de les pinces i amb l'altra pinça es va rasant perquè es vagin disgregant els teixits del fetus (**figura 3.5f**).
13. De tant en tant, es renta la punta de les pinces en el mateix PBS de la placa.
14. Amb una pipeta Pasteur es va traspasant el resultat de la disgregació a un tub estèril. Es repeteix el protocol per a cada fetus.
15. Quan ja s'han disgregat els teixits dels sis fetus, es tanquen els tubs i es posen a la centrífuga a 650 g durant 7 minuts.
16. Es neteja la superfície de treball de la cabina amb etanol 70 %.
17. S'agafen dos flascons de cultiu per cada fetus i es retolen com s'indica a continuació:  
Núm. de sèrie + tractament de la mare . núm. de rata + núm. de fetus . núm. de flascó.  
Per exemple: S12 A + 5.2 F3.1.
18. Es posen 2 ml de medi de cultiu a cada flascó.
19. S'elimina el sobrenedant de cada tub amb una pipeta *Pasteur* connectada a la bomba de buit.
20. Es desfà el pèl·let (botó cel·lular) en sec picant amb els dits.
21. Es posen 2 ml de medi de cultiu a cada tub.
22. Se separen els dos flascons pertanyents a cada fetus.
23. Amb una pipeta *Pasteur*, es resuspèn el contingut del tub (cèl·lules fetals en suspensió) i se n'aspira 1 ml (aproximadament fins a la meitat de la pipeta).
24. Es dispensa aquest volum dins del primer flascó.
25. Es fa el mateix amb el segon flascó.
26. Es posen els flascons en posició horitzontal i es mouen una mica perquè s'estengui la solució per la superfície del flascó.
27. Es deixen els flascons a l'incubador, a 37 °C i al 8 % de CO<sub>2</sub>, en repòs durant 48 hores per afavorir l'adhesió dels fibroblasts.

#### **Protocol per a fetus de menys de 14 dies de gestació**

En aquest cas, hi ha molt poc material fetal i s'ha d'ajustar el protocol. S'utilitzen plaques de Petri de 35 mm per fer els cultius primaris.

Se segueix el **protocol per a fetus de 14 fins a 17 dies de gestació** fins al pas núm. 16 per a cada fetus. A continuació:

17. Es rotula una placa de Petri per 35 mm de diàmetre per cada fetus.

18. S'aspira el sobrenedant i es desfà el pèl·let en sec picant amb els dits.
19. Es posa 1 ml o 1,5 ml de medi de cultiu dins de cada tub.
20. Amb una pipeta Pasteur, es resuspèn el contingut del tub.
21. Es traspasa amb cura la suspensió cel·lular a la placa i es tapa.
22. Es remou suaument, perquè la sol·lució s'estengui per tota la superfície.
23. Es deixen les plaques a l'incubador, a 37 °C i al 8 % de CO<sub>2</sub>, en repòs durant 48 hores, per afavorir l'adhesió dels fibroblasts.

### **Protocol per a fetus de 18 dies de gestació o més**

Els fetus ja són molt grans i estan molt desenvolupats: la pell és transparent i es diferencien els òrgans i les diferents parts anatòmiques. En aquest cas s'obté molt poc material i molts eritròcits. El millor és fer un cultiu del material de les vísceres, exceptuant-ne el fetge, que és molt eritrocitari. S'utilitzen plaques de Petri de 35 mm per fer els cultius primaris.

Se segueix el **protocol per a fetus de 14 fins a 17 dies de gestació** fins al pas núm. 8.

A continuació, es manipula cada fetus amb el material quirúrgic a fi de separar-ne el fetge, esterilitzant el material quirúrgic després de cada fetus.

A partir d'aquí, se segueix el **protocol per a fetus de 14 fins a 17 dies de gestació** (passos núm. 9 al núm. 16) per a cada fetus. A continuació:

17. S'aspira el sobrenedant i es desfà el pèl·let en sec picant amb els dits.
18. Es posen 2 ml de medi de cultiu a cada tub (que conté el pèl·let resuspès).
19. Amb una pipeta Pasteur, es resuspèn el contingut del tub.
20. Es traspasa amb cura la suspensió cel·lular amb una pipeta *Pasteur* de vidre en una placa de Petri de 35 mm.
21. Es deixen les plaques a l'incubador, a 37 °C i al 8 % de CO<sub>2</sub>, en repòs durant 24 hores, per afavorir l'adhesió dels fibroblasts.
22. Passades 24 hores, es renten els cultius amb PBS estèril, ja que hi ha molts eritròcits i trossos de teixit que no s'han enganxat.
23. S'hi afegeixen 2 ml de medi de cultiu.

Dels fetus per femella dels quals es fan cultius primaris, se'n congela un a l'atzar, atès el valor de les mostres. La congelació en condicions òptimes es fa quan el cultiu primari es troba en la fase exponencial al 90 % de confluència.

### **3.2.3. Cultius primaris de cèl·lules fetals**

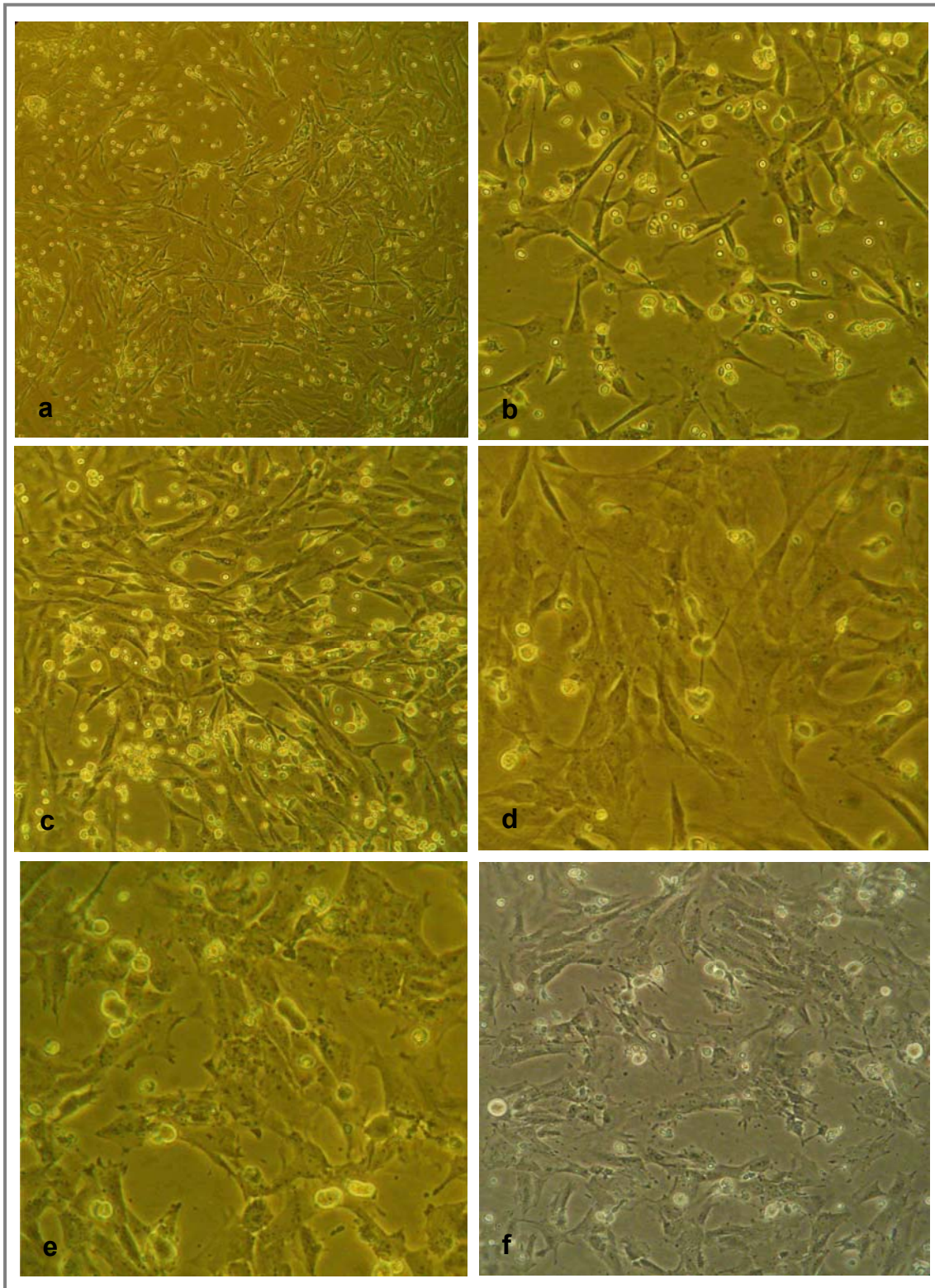
En els cultius primaris de cèl·lules fetals de *Rattus norvegicus* obtenim fibroblasts fetals. Els fibroblasts creixen en monocapa adherits a la superfície del flascó/placa (**figura 3.6**). El cultiu és de curt termini, d'un màxim de 10 dies, a fi que no es produeixin ni una diferenciació cel·lular ni canvis genètics.

#### Reactius i equipament

- Tubs de centrífuga de 15 ml estèrils i no estèrils (TPP<sup>R</sup>, Falcon, Nunc<sup>TM</sup>)

- Flascons de cultiu de 25 cm<sup>2</sup> amb tap ventilat (Nunc<sup>TM</sup>, Sarstedt, Corning)
- Plaques de Petri de 35 mm de diàmetre (Nunc<sup>TM</sup>)
- Gradeta per a tubs de 15 ml
- Pipetes *Pasteur* llargues estèrils i no estèrils
- Xumet (per a les pipetes *Pasteur*)
- Pipetes graduades de 5 i 10 ml estèrils (Brand)
- Pipetejador automàtic
- Pipeta de 200 µl
- Puntetes de pipeta de 200 µl estèrils
- Etanol al 70 % (Merck) en aigua destil·lada
- PBS estèril a 37 °C
- PBS no estèril a 37 °C
- Colcemid (colxicina, Gibco, Serva, 10 µg/ml)
- Incubador a 37 °C a 8 % d'atmosfera de CO<sub>2</sub>
- Bany a 37 °C
- Antibiòtic [penicil·lina (5.000 unitats/mL) i estreptomina (5.000 µg/mL), Gibco]
- Medi de cultiu estèril DMEM d'1 g de glucosa/L complementat amb L-glutamina 200 mM, SBF al 20 % i amb antibiòtic (1 mL/100 mL de medi) a 37° C
- Tripsina estèril: tripsina 0,2 mg/ml-EDTA 0,4 mg/ml (Gibco), a 37 °C
- Solució hipotònica: KCl 0,075M (Merck), a 37 °C (no estèril)
- Fixador: Carnoy [3 metanol (Merck): 1 àcid acètic (Merck)]
- Agitador (Scientific Industries, inc.)
- Campana d'extracció de gasos
- Cabina de flux laminar vertical
- Bomba de buit
- Portaobjectes en metanol, a – 20 °C; o bé portaobjectes preparats per a l'adhesió cel·lular (Knittel Glässer, O. Kindler GmbH & Co.)
- Metanol a – 20 °C (Merck)
- Microscopi òptic invertit amb contrast de fases
- Afidicolina (apc, C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>) liofilitzada (Sigma)
- Dimetilsulfòxid<sup>(4)</sup> (DMSO) (Sigma)
- Tubs d'1,5 ml estèrils (Eppendorf)
- Nevera a + 4 °C
- Congelador a – 20 °C
- Centrífuga
- Retolador de vidre

<sup>(4)</sup> El DMSO és un dissolvent de baixa toxicitat cel·lular i no interfereix en l'efecte causat per l'apc, en comparació amb altres dissolvents, com l'etanol.



**Figura 3.6.** Imatges de cultius primaris de cèl·lules fetals. (a) cultiu primari en expansió amb una confluència d'un 70 % (10x); (b) i (c) cultiu primari en expansió amb moltes cèl·lules en divisió (arrodonides i refringents) (20x); (d) cultiu amb diverses cèl·lules en divisió en diferents fases mitòtiques (40x); (e) (40x) i (f) (20x): aspecte dels cultius primaris posteriorment a l'addició de Colcemid.

**Tractament dels cultius primaris: obtenció de subcultius**

Quan el cultiu està en fase exponencial, i abans que arribi a la fase de *plateau*, cal fer-ne un subcultiu.

En fetus de 14–17 dies de gestació

1. S'aspira el medi de cultiu.
2. S'afegeix PBS i s'aspira.
3. S'afegeixen 2 ml de tripsina al flascó i es deixa actuar de 2 a 5 minuts a 37 °C.
4. S'inactiva la tripsina amb la mateixa quantitat de medi de cultiu.
5. Es passa el material al tub de centrifuga.
6. Se centrifuga a 650 g durant 7 minuts.
7. Se n'aspira el sobrenedant.
8. Es resuspèn el botó cel·lular amb medi de cultiu.
9. Se sembra la suspensió cel·lular en dos flascons amb 3 ml de medi cadascun.

En fetus de menys de 14 i de més de 17 dies de gestació

1. S'aspira el medi de cultiu.
2. Es renta la placa amb PBS estèril.
3. Se n'aspira el PBS.
4. S'afegeix 1 ml de tripsina a la placa i es deixa actuar de 2 a 5 minuts a 37 °C.
5. Amb una pipeta *Pasteur*, es va aspirant la tripsina juntament amb les cèl·lules de tota la superfície i es va deixant anar suaument, per ajudar a desenganxar les cèl·lules.
6. S'inactiva la tripsina amb la mateixa quantitat de medi de cultiu.
7. Es passa el material al tub de centrifuga.
8. Se centrifuga a 650 g durant 7 minuts.
9. Se n'aspira el sobrenedant.
10. Es resuspèn el botó cel·lular amb medi.
11. Se sembra la suspensió cel·lular en un flascó amb 3 ml de medi.

**Tractament dels cultius primaris amb afidicolina**Preparació de la solució d'afidicolina

Es resuspèn l'apc en DMSO per obtenir una concentració final de 2 mM (1 mg d'apc liofilitzada en 1.450 µl de DMSO).

1. Es resuspenen 10 µl d'afidicolina (apc, 2 mM) en 990 µl de medi de cultiu, i s'obté una concentració final de 0,02 mM d'apc.
2. S'aliquota la solució d'apc (0,02 mM) en tubs d'1,5 ml estèrils.
3. S'emmagatzemen les alíquotes a – 20 °C fins a la seva utilització.

### Inducció de fragilitat als cultius

Per a la inducció de fragilitat cromosòmica, aproximadament 24 hores abans de l'extracció dels cultius, es fan subcultius dels casos seleccionats per a tenir diversos flascons per a cada tractament i fetus (com a mesura de precaució). Aquests nous cultius es divideixen en controls (sense tractament amb apc), 0,1  $\mu\text{M}$  i 0,2  $\mu\text{M}$ . (En l'estudi dels efectes del mutagen químic, només s'han analitzat cèl·lules tractades amb apc amb concentració 0,2  $\mu\text{M}$ .) Es retolen els nous flascons.

1. En els cultius destinats a una concentració de 0,1  $\mu\text{M}$  d'apc, s'afegeixen 25  $\mu\text{l}$  d'apc (0,02 mM) al flascó, que ja conté 5 ml de medi de cultiu.
2. En els cultius destinats a una concentració de 0,2  $\mu\text{M}$  d'apc, s'afegeixen 50  $\mu\text{l}$  d'apc (0,02 mM) al flascó, que ja conté 5 ml de medi de cultiu.
3. S'incuben els cultius 24 hores a 37 °C i 8 % de  $\text{CO}_2$ .
4. Es fa l'extracció dels cultius primaris com s'explica a continuació.

### ***Extracció dels cultius primaris***

#### Condicions òptimes per a fer l'extracció

L'endemà d'haver fet els subcultius en el cas de 14–17 dies de gestació, es controla que els cultius estiguin en una fase exponencial (corresponents a un 80 % de confluència) i es fa l'extracció del cultiu. En el cas dels fetus fora d'aquestes edats gestacionals, s'ha de controlar la confluència cel·lular per cada placa/flascó i fer l'extracció dels cultius entre 60–80 % de confluència, tenint en compte el temps (dies) que porten les cèl·lules a l'incubador, ja que ambdós factors influeixen en l'eficiència final del cultiu.

#### Extracció i obtenció de metafases

1. S'afegeix el Colcemid (40  $\mu\text{l}/\text{ml}$  medi) als cultius.
2. Es deixa actuar a 37 °C, durant 3 hores, a l'incubador.  
A partir d'ara, es treballa fora de cabina de flux laminar vertical.
3. Una vegada transcorregut aquest temps, s'avalua el flascó al microscopi invertit amb contrast de fases, i es comprova que hi hagi mitosis (**figura 3.6e i f**).
4. Es posa la solució hipotònica (KCl 0,075M) al bany a 37 °C.
5. Es recull el medi de cada flascó en els tubs de centrifuga retolats per flascó.
6. Es renta cada flascó/placa amb 2 ml de PBS (ja no cal que sigui estèril).
7. Se n'aspira el PBS.
8. S'afegeixen 2 ml de tripsina al flascó.
9. Es deixa actuar la tripsina de 2 a 5 minuts a 37°C.
10. S'inactiva amb el medi de cultiu (recuperat dels tubs corresponents).
11. Es passa el material (cèl·lules en suspensió en el medi de cultiu) als tubs corresponents.
12. Se centrifuguen els tubs a 650 g durant 6 minuts.
13. Se n'elimina el sobrenedant per decantació.

14. S'afegeixen 8 ml de solució hipotònica a cada tub amb una pipeta *Pasteur*. Es va afegint primer gota a gota, fins a 1–1,5 ml, resuspenent amb els dits, i després més ràpidament amb l'agitador a velocitat baixa.
15. S'incuben les suspensions cel·lulars al bany maria a 37 °C durant 20 minuts, invertint suaument els tubs 2 o 3 vegades durant aquest temps.
16. Se centrifuguen els tubs a 650 g durant 6 minuts.
17. Se n'elimina el sobrenedant per decantació i es desfà el botó cel·lular picant en sec amb els dits.

A partir d'aquí, cal treballar en una campana d'extracció de gasos.

18. S'hi afegeixen 7 ml de fixador cel·lular, Carnoy (3 metanol : 1 àcid acètic), acabat de preparar: primerament gota a gota, resuspenent amb els dits, i després més ràpidament amb l'agitador a velocitat baixa.
19. Se centrifuguen els tubs a 650 g durant 6 minuts.
20. Se n'aspira el sobrenedant.
21. Es desfà el botó cel·lular en sec.
22. S'hi afegeixen 6 ml de Carnoy amb l'agitador (primer rentat).

A partir d'aquí, es podria parar el protocol, deixant els tubs amb les mostres a – 20 °C.

23. Se centrifuguen els tubs a 650 g durant 6 minuts.

En el cas que els tubs estiguessin a – 20 °C, es deixen a temperatura (T<sup>a</sup>) ambient durant 10 minuts.

24. Se n'aspira el sobrenedant.
25. Es resuspèn el botó cel·lular.
26. S'hi afegeixen 5 ml de Carnoy amb l'agitador (segon rentat).
27. Se centrifuguen els tubs a 650 g durant 6 minuts.
28. Se n'aspira el sobrenedant.
29. Es resuspèn el botó cel·lular.
30. S'hi afegeixen 4 ml de Carnoy amb l'agitador (tercer rentat).

A partir d'aquí, es pot aturar el protocol, deixant els tubs amb les mostres a – 20 °C.

#### Avaluació del rendiment del cultiu

En el cas que els tubs estiguessin a – 20 °C, es deixen temperar durant 10 minuts.

1. Se centrifuguen els tubs a 650 g durant 6 minuts.
2. Se n'aspira el sobrenedant.
3. Es resuspèn el botó cel·lular.
4. S'hi afegeixen unes gotes de Carnoy acabat de preparar proporcional a la mida del sediment cel·lular.
5. Es diposita una gota de suspensió cel·lular sobre un portaobjectes<sup>(5)</sup> com a control de l'extracció.

<sup>(5)</sup> S'utilitzen dos tipus de portaobjectes en aquests procediments:

(a): Preparats per a l'adhesió cel·lular, que no necessiten tractament previ.

(b): No preparats per a l'adhesió cel·lular, que es guarden en metanol a – 20 °C i es desengreixen prèviament assecant-los amb trapicel.

6. S'avalua la mida del botó cel·lular, per avaluar el material de què disposem per cada cas.
7. S'avaluen les extensions cel·lulars al microscopi invertit amb contrast de fases, mesurant com a paràmetres:
  - la quantitat de metafases
  - la morfologia dels cromosomes
  - la qualitat de les extensions
  - la quantitat de material (mida del botó cel·lular)
8. Es guarden els tubs i les extensions a – 20 °C.

### **Extensions cel·lulars**

9. Es tempera el tub del cas que ens interessa durant uns 10 minuts, deixant-lo a T<sup>a</sup> ambient.
10. Se centrifuga el tub a 650 g durant 6 minuts.
11. Se n'aspira el sobrenedant.
12. Es resuspèn el botó cel·lular amb Carnoy, acabat de preparar, proporcionalment a la mida del botó.
13. Amb una pipeta *Pasteur* llarga, es resuspèn un altre cop el botó.
14. Se n'aspiren unes gotes.
15. Es posa un portaobjectes<sup>(5)</sup> retolat inclinat uns 45° i es diposita una gota al mig del porta. La gota anirà lliscant i estenent-se per la superfície.
16. Es deixa el portaobjectes dret, recolzat i s'asseca a l'aire.
17. S'avalua com ha quedat l'extensió al microscopi de contrast de fases.
18. Es fan unes 8–10 extensions per fetus, en funció de la quantitat de material del cas, de les metafases que cal estudiar i de les diferents tècniques a realitzar.

A partir d'aquí, es fan tècniques de citogenètica clàssica o FISH immediatament, o bé, si es vol deixar per més endavant, es desen les preparacions a – 20 °C.

### **3.2.4. Les metafases**

#### ***Tècniques de citogenètica clàssica***

L'idiograma del cariotip d'RNO i la nomenclatura de bandes G es va establir d'acord amb la nomenclatura de Levan (1974), amb una resolució de 238 bandes per genoma haploide. La nomenclatura emprada per a la classificació d'alteracions cromosòmiques està basada en els criteris de l'*International System for Human Cytogenetic Nomenclature* 1995 (ISCN1995), fet per l'*International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*.

En tots els estudis presentats, es fa una anàlisi citogenètica amb tècniques clàssiques (tincions seqüencials). La caracterització del cariotip de RNO es va fer amb bandes G–C seqüencials i la detecció d'AC i dels seus respectius punts de trencament, amb tinció uniforme i amb bandes G seqüencials. (**figures 3.1-3.3**).



Amb la tècnica de tinció uniforme obtenim una tinció homogènia dels cromosomes. Ens permet fer un recompte dels cromosomes ( $2n = 42$ ) i visualitzar-ne la seva morfologia, en la qual distingim les dues cromàtides i altres estructures com els satèl·lits i les constriccions secundàries, la posició dels centròmers i, el que ens interessa més per a la nostra anàlisi: les discontinuïtats cromosòmiques.

La tècnica de bandes G ens permet veure un patró de tinció de diferents intensitats de coloració de la cromatina, que és característic de cada cromosoma i, més en general, de cada espècie. Gràcies a aquest patró, utilitzat en molts àmbits de la citogenètica, és possible identificar tots els cromosomes individualment, identificar-ne alteracions cromosòmiques numèriques i estructurals en un àmbit microscòpic i permet localitzar els punts de trencament en bandes cromosòmiques. La tècnica de bandes G utilitzada és adaptada de la descrita per Seabright (1971).

Podem observar un cariotip de rata amb bandes G a la **figura 5** de l'apartat 4.4 de Resultats.

La tècnica de bandes C ens permet veure la localització de l'heterocromatina constitutiva. És una tècnica amb la qual es pot detectar si les AC identificades estan localitzades en els centròmers o en les constriccions secundàries dels cromosomes. S'utilitza una adaptació del protocol descrit per Sumner (1972).

#### Reactius i equipament

- Colorant Leishman (Merck)
- Tampó Leishman, pH 6,8: concentrat (Merck), dil·luït en 1 L d'aigua destil·lada
- Sol·lució Leishman: colorant Leishman (Merck)/tampó Leishman pH 6,8 (Merck) en proporció 1:4
- Colorant Wright (Sigma) al 0,25 %: es dissolen 1,25 g del colorant Wright (en pols, Sigma) en 500 ml de metanol (Merck), es filtra i envelleix 3 dies a 37 °C. Es guarda a + 4°C.
- Tampó Sørensen pH 6,8: 5,94 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (Merck) i 4,54 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck) en 1 L d'aigua destil·lada
- Sol·lució Wright: colorant Wright (Sigma) amb tampó Sørensen pH 6,8 (Merck) en proporció 1:3
- 2xSSC [8,8 g de citrat sòdic (Merck) i 17,5 g de NaCl (Fluka) en 1 L d'aigua destil·lada milliQ]
- Sol·lució  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  al 2 % (Merck)
- Sol·lució HCl 0,3 N [1,6 ml HCl (Merck) en 100 ml d'aigua destil·lada]
- Xilol (Merck)
- Vas de precipitats de mida petita
- Cubetes de vidre
- Pipetejador
- Pipetes graduades de 5 o 10 ml no estèrils (Brand)

- Bany a 65 °C
- Estufa a 65 °C
- Pinces
- Recipient amb suport per col·locar-hi els portaobjectes (cubeta gran)
- Microscopi òptic de camp clar, amb objectius x10 i x100 (Olympus)
- Oli d'immersió (Merck)
- Etanol al 70 % (Et 70 %)
- Et 80 %
- Et 90 %
- Aigua destil·lada
- Paper de filtre
- Nevera a + 4 °C
- Congelador a – 20 °C
- Aigua corrent

#### Tinció uniforme

1. Es prepara un recipient amb suport i s'hi col·loquen els portaobjectes.
2. Es prepara la solució Leishmann (tampó Leishmann 4: colorant Leishmann 1) en un vas de precipitats. S'ha de preparar just al moment de la utilització perquè perd l'eficiència de tinció ràpidament.
3. Es dispensa la solució als portes i es deixa actuar 4-5 minuts.
4. Es passa aigua corrent per sobre els portes per eliminar-ne tot el colorant.
5. Es deixen assecar els portes o bé s'assequen amb molta cura amb paper de filtre.

#### Tècnica de bandes G

6. Es destenyeixen els portaobjectes, que estan en tinció uniforme, amb la bateria següent:  
Etanol (Et) 70 % → Et 80 % → Et 90 % → Et 80 % → Et 70 % → H<sub>2</sub>O destil·lada  
Se submergeix el portaobjectes durant un minut en cada cubeta d'etanols i dos minuts en la de l'aigua destil·lada.
7. Es deixa assecar.
8. S'envelleixen els portaobjectes a l'estufa a 65 °C durant 8 hores o durant tota la nit.
9. Es prepara el bany a 65 °C i s'hi posa una cubeta amb 2xSSC.
10. Se submergeix el portaobjectes en el 2xSSC durant 1–2 minuts.
11. Ràpidament, es treu el portaobjectes i es posa sota l'aixeta. S'ha de rentar ràpidament i el màxim possible perquè si queden restes de sals incrustades poden dificultar la tinció posterior.
12. Es deixen assecar els portes o s'assequen amb molta cura amb paper de filtre.
13. Es prepara un recipient amb suports i s'hi col·loquen els portaobjectes.

14. Es prepara la solució de tinció Wright (tampó Sørensen 3: colorant Wright 1) en un vas de precipitats. S'ha de preparar en el moment d'utilització perquè perd eficiència de tinció molt ràpidament.
15. Es dispensa la solució als portes i es deixa actuar d'1 a 3 minuts, depenent del temps d'optimització.
16. Es passa aigua per sobre dels portes per eliminar-ne tot el colorant.
17. Es deixen assecar els portes, o bé s'assequen amb molta cura.
18. Es revisa la tinció amb el microscopi òptic de camp clar amb els objectius de x10 i x100 (amb oli d'immersió):
  - Si les bandes han quedat clares, s'ha de tenyir més el portaobjectes (uns quants segons, temps acumulatius).
  - Si les cromàtides es distingeixen molt, o són primes (morfologia de tinció uniforme), cal posar el portaobjectes més estona (uns quants segons) en 2xSSC i tornar a tenyir amb solució Wright el mateix període de temps del principi (temps no acumulatiu). Prèviament s'ha de treure l'oli d'immersió amb xilol de 3 a 5 minuts.
  - Si les cromàtides estan molt separades, els cromosomes són molt gruixuts o bé es veuen bombolles als cromosomes, els cromosomes s'han desnaturalitzat: ja no es pot arreglar.
19. Els portes es guarden a + 4 °C: les preparacions aguanten com a màxim unes quantes setmanes ben tenyides. Si triguem més temps a analitzar-les, és millor desar-les a – 20 °C.

#### Tècnica de bandes C

20. Es destenyeix la preparació, si és que s'hi han fet bandes G prèviament.
21. Es prepara en una cubeta amb Ba(OH)<sub>2</sub> (preparat al mateix moment) i una altra amb 2xSSC a un bany a 65 °C.
22. Se submergeix el portaobjectes en HCl (0,3 N) 1 minut a T<sup>a</sup> ambient.
23. Es posa el portaobjectes sota l'aixeta.
24. Es deixa assecar.
25. Se submergeix el portaobjectes en la cubeta amb Ba(OH)<sub>2</sub> a 65 °C a temps variable (d'1 segon a 1 minut).
26. Es passa per una cubeta amb aigua destil·lada.
27. Es passa per la cubeta amb HCl (0,3 N), a fi d'eliminar-ne restes de Ba(OH)<sub>2</sub>.
28. Es passa per una cubeta amb aigua destil·lada.
29. Es deixa assecar.
30. Es posa la preparació en 2xSSC a 65 °C a temps variable (1 segon a 1 minut).
31. Immediatament, es treu el portaobjectes i es posa sota l'aixeta. S'ha de rentar ràpidament i el màxim possible perquè hi queden restes de sals incrustades que dificultaran la posterior tinció.
32. Es deixa assecar.

33. Es prepara un recipient amb suport i s'hi col·loca el portaobjectes.
34. Es prepara la solució Leishmann (tampó Leishmann 4: colorant Leishmann 1) en un vas de precipitats. S'ha de preparar al moment de la utilització perquè perd eficiència de tinció ràpidament.
35. Es dispensa la solució als portes i es deixa actuar 4–5 minuts.
36. Es passa aigua per sobre dels portes per eliminar-ne tot el colorant
37. S'assequen els portes amb molta cura.
38. S'avalua la preparació al microscopi òptic de camp clar.

### **Anàlisi de les imatges**

#### Paràmetres citogenètics estudiats

S'han analitzat aproximadament 100 metafases per fetus. Els paràmetres citogenètics estudiats són les metafases aberrants, les alteracions cromosòmiques i les bandes cromosòmiques implicades en aquestes alteracions.

Les alteracions cromosòmiques observades i analitzades, tant de cromàtide com de cromosoma, són els *gaps* (chtg, chsg), els trencaments (chtb, chsb), les delecions (del cht, del chs) i els fragments cromosòmics, tant de cromàtide (ace cht) com de cromosoma (ace chs); les alteracions cromosòmiques estables i inestables: translocacions (t), fusions (f), inversions (inv), cromosomes en anell (r), cromosomes marcador (mar), cromosomes dicèntrics (dic) i reorganitzacions entre dos o més cromosomes (re). Les endoreduplicacions no es tenen en compte.

Es calculen les freqüències de les metafases aberrants, de les AC totals i dels tipus d'AC respecte a les metafases totals i també respecte de les metafases aberrants. Quan parlem de punts de trencament, ens referim a les bandes cromosòmiques implicades en les AC trobades.

#### Microscòpia i suport informàtic emprats

Per a l'anàlisi citogenètica s'han utilitzat diversos microscopis òptics (Olympus: BX51, AX70 i BX60). Tots els microscopis estaven acoblats a una càmera, òptica o digital, i connectats a un sistema de suport informàtic per capturar les imatges de les metafases i per fer-ne una anàlisi posterior.

Els suports informàtics utilitzats van ser el programa *CytoVision*, d'*Applied Imaging Corporation* i el programa *Isis FISH Imaging System* (versió 5.0), de *MetaSystems*.

#### Anàlisi de les metafases i dels punts de trencament

S'observen les preparacions en tinció uniforme al microscopi òptic, primerament amb l'objectiu x10, per localitzar les metafases i després es passa a l'objectiu x100, per fer la detecció d'AC i la seva posterior classificació. Es captura la metafase aberrant (amb AC) en tinció uniforme amb l'ajuda de la càmera i del suport informàtic. Es recompten i es registren les

metafases aberrants per cada cas i també el nombre i el tipus d'alteracions cromosòmiques per cada metafase i fetus.

Posteriorment, s'observen les preparacions en tinció en bandes G, cercant i capturant les metafases aberrants, a fi de confirmar i localitzar els punts de trencament de les AC trobades i, si és possible, intentar identificar altres AC no visibles a tinció uniforme (reordenacions).

### **Hibridació “*in situ*” fluorescent amb sondes telomèriques**

Per detectar i caracteritzar les seqüències telomèriques intersticials (ITS) en el cariotip d'RNO (**figura 3.4**), es va utilitzar una sonda telomèrica no comercial, sintetitzada per la tècnica de PCR en el *Dipartimento di Genetica e Microbiologia* de la *Università di Pavia* (Itàlia) i marcada amb biotina per mitjà d'una reacció de *nick translation*. Aquesta sonda consisteix en una mescla de polinucleòtids sintètics (TTAGGG)<sub>n</sub> de longitud variable.

#### Reactius i equipament

- Sonda telomèrica marcada amb biotina
- Tween 20 (10 %) (Boeringher)
- 10xPBS (Oncor)
- 2xSSC (NaCl 0,03 M, citrat trisòdic 0,03 M)
- Formamida (Boeringher):
  - 70 % formamida/2xSSC pH 7–7,5
  - 25 % formamida/2xSSC pH 7–7,5
- Solucions de detecció: 4xSSC/Tween 20 (0,05 %) pH 7
- Tampó de dilució dels anticossos: 4xSSC/Tween20/NFMD
- Anticossos
- Avidina-FITC
- anti-Avidina
- Solució de treball dels anticossos per a detectar sondes marcades amb Biotina:
  - Avidina-FITC: 1,5 ml de tampó de dilució/3,75 µl d'Avidina-FITC
  - Anti-Avidina: 1,5 ml de tampó de dilució/15 µl d'anti-Avidina
- Tampó d'hibridació: 25 % formamida/4xSSC/1 % Tween 20/10 % DXS
- *Antifade*: 1 % p-fenilenediamina (Sigma)/glicerina (Sigma)/1xPBS
- PBS/50 mM MgCl<sub>2</sub>
- Paraformaldehyd al 4 % (Sigma)
- DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) (Sigma)
- DNA d'esperma de salmó (SSD) (Amershan Pharmacia)
- *Human Cot-1 DNA* (Invitrogen)
- RNAsa (Roche)
- Pepsina A (Sigma)
- NaAc 3 M (Sigma)
- HCl 0,01 M

- Etanol (Merck)
- Aigua destil·lada
- Cambra humida
- Bany amb termòstat
- Estufa a 37 °C
- Pipetes automàtiques de 10 µl i 100 µl
- Bany sec (*Thermomixer compact*, Eppendorf)
- Portaobjectes (Knittel Glässer, O. Kindler GmbH & Co.)
- Cubetes *coplin*
- Cobreobjectes de plàstic (ONCOR)
- Cobreobjectes de vidre (25 x 25 mm y 25 x 50 mm; Knittel Glässer, O. Kindler GmbH & Co.)
- Cola d'enquadernar
- Tubs d'1,5 ml estèrils (Eppendorf)
- Microscopi de fluorescència Olympus BX60 amb filtre específic per FITC i DAPI, connectat a una càmera de vídeo CCD i a un ordinador PC amb sistema d'anàlisi d'imatges *GENUS System* (Versió 2,75, *Applied Imaging Corporation*)

#### Preparació de la sonda

1. Es precipita la sonda afegint 0,1 volums de NaAc 3M i 3 volums d'etanol absolut a la mescla purificada.
2. Es deixa precipitar a – 20 °C durant tota una nit.
3. Se centrifuga a 14.000 rpm durant 20 minuts a + 4 °C.
4. Se n'elimina el sobrenedant per decantació.
5. S'hi afegeixen 100 µl d'etanol absolut (- 20 °C).
6. Se centrifuga a 14.000 rpm durant 20 minuts a + 4 °C.
7. Se n'elimina el sobrenedant per decantació.
8. Es resuspèn el precipitat en 20 µl d'aigua destil·lada per a arribar a una concentració final de la sonda de 100 ng/µl.
9. Es prepara la mescla d'hibridació:
  - Per obtenir una concentració final de 100 ng de sonda per portaobjectes en una àrea d'hibridació de 25 x 25 mm, es mesclen en un tub d'1,5 ml:
    - 1 µl de sonda telomèrica (100 ng/µl)
    - 7 µl de tampó d'hibridació
    - 2 µl d'aigua destil·lada
10. Es desnaturalitza la sonda a 80 °C durant 10 minuts.
11. Es manté la sonda en gel fins que les preparacions cromosòmiques estiguin preparades per al moment de la hibridació.

Preparació dels portaobjectes i desnaturalització del DNA cromosòmic

12. Es preparen les extensions cromosòmiques un dia abans de la hibridació, segons el protocol d'**Extensions cel·lulars**).

El dia destinat a la hibridació es fan els tractaments següents amb RNAsa i pepsina a les extensions per eliminar-ne restes proteiques i d'RNA, i amb la finalitat de disminuir el màxim la interferència en la interpretació dels resultats, i després es desnaturalitza el DNA de les extensions:

*Tractament amb RNAsa*

13. Es posen 10 µl de RNAsa (10 mg/ml) en 1 ml de 2xSSC.
14. Es col·loquen 100 µl de solució RNAsa sobre el portaobjectes.
15. Es cobreixen amb un cobreobjectes de vidre.
16. Es fa una incubació dins d'una cambra humida a 37 °C durant 60 minuts.
17. Se submergeix el portaobjectes dues vegades en una cubeta amb 2xSSC a T<sup>a</sup> ambient durant 5 minuts.
18. Es deshidrata la preparació submergint-la en una sèrie de solucions amb etanol al 70 %, 80 % i 95 %, dos minuts a cadascuna, a T<sup>a</sup> ambient.
19. Es deixa assecar a T<sup>a</sup> ambient.

*Tractament amb pepsina*

20. S'incuba el portaobjectes en una cubeta amb 0,005 % pepsina/0,01 M HCl a 37 °C durant 30 minuts.
21. Es renta en una cubeta amb 1xPBS durant 5 minuts a T<sup>a</sup> ambient.
22. Es traspasa la preparació a una cubeta amb PBS/50 mM MgCl<sub>2</sub> durant 5 minuts a T<sup>a</sup> ambient.
23. Es traspasa la preparació a una cubeta amb 4 % paraformaldehid durant 5 minuts a T<sup>a</sup> ambient.
24. Es renta en una cubeta amb 1xPBS durant 5 minuts a T<sup>a</sup> ambient.
25. Es deshidrata la preparació submergint-la en una sèrie de solucions amb etanol al 70 %, 80 % i 95 %, dos minuts a cadascuna, a T<sup>a</sup> ambient.
26. Es deixa assecar a T<sup>a</sup> ambient.

*Desnaturalització*

27. Es desnaturalitza el DNA cromosòmic submergint els portaobjectes en una solució de formamida al 70 % en 2xSSC a 75 °C ± 2 °C durant 3 minuts.
28. Es deshidrata la preparació submergint-la en una sèrie de solucions amb etanol al 70%, 80% i 95%, dos minuts a cadascuna, a T<sup>a</sup> ambient.
29. Es deixa assecar a T<sup>a</sup> ambient.

Hibridació

30. Es col·loquen 10 µl de la mescla d'hibridació sobre la superfície del portaobjectes seleccionada per la hibridació (25x25 mm).
31. Es col·loca un cobreobjectes damunt de la zona seleccionada.
32. Se segella amb cola d'enquadernar.
33. Es posa a incubar dins d'una cambra humida a 37 °C tota la nit.

Posthibridació: detecció i amplificació del senyal d'hibridació

34. Se n'elimina amb cura la cola de segellat i el cobreobjectes amb unes pinces.
35. Es fan diversos rentats de baixa astringència:
  - a. Tres rentats de cinc minuts en 25% formamida/2xSSC a 37 °C.
  - b. Tres rentats de cinc minuts en 2xSSC a 37 °C.
  - c. Un rentat de cinc minuts en 4xSSC/Tween 20 0,05 % a T<sup>a</sup> ambient.
36. Es preincuba el portaobjectes amb 100 µl de tampó de dilució dels anticossos durant deu minuts a T<sup>a</sup> ambient.
37. S'incuba el portaobjectes amb el primer anticòs (anti-Avidina):
  - a. Es dipositen sobre el portaobjectes 100 µl de la solució de treball dels anticossos, preparada prèviament.
  - b. Es posa un cobreobjectes de vidre de 25 x 50 mm.
  - c. Es deixa en cambra humida durant vint minuts a T<sup>a</sup> ambient.
38. S'elimina el cobreobjectes.
39. Es fan tres rentats de cinc minuts cadascun en 4xSSC/Tween vint minuts a T<sup>a</sup> ambient.
40. S'incuba el portaobjectes amb el segon anticòs (Avidina conjugada amb FITC):
  - a. Es dipositen 100 µl de la solució de treball dels anticossos, preparats prèviament, sobre el portaobjectes.
  - b. Es posa un cobreobjectes de vidre de 25 x 50 mm.
  - c. Es deixa en cambra humida durant vint minuts a T<sup>a</sup> ambient.
41. S'elimina el cobreobjectes.
42. Es fa un rentat de cinc minuts en 4xSSC/Tween 20 a T<sup>a</sup> ambient.
43. Posteriorment, es fan dos rentats de cinc minuts cadascun en 1xPBS a T<sup>a</sup> ambient.
44. Se submergeix la preparació cromosòmica a una cubeta amb DAPI (100 ng/ml).
45. Es fa un rentat ràpid en una cubeta amb 2xSSC a T<sup>a</sup> ambient.
46. Es fa un rentat ràpid en una cubeta amb aigua destil·lada a T<sup>a</sup> ambient.
47. Es deixa assecar a T<sup>a</sup> ambient.
48. Es munta la preparació amb 15 µl d'Antifade.
49. Se segella amb laca d'ungles.

Anàlisi de les metafases i localització de les seqüències telomèriques intersticials (ITS)

S'observen les preparacions amb el microscopi òptic de fluorescència. Es capturen les metafases que presenten senyals d'hibridació amb l'ajuda de la càmera i el sistema d'anàlisi



d'imatges *Genus System*. S'emmagatzemen les imatges en format TIFF per a la seva posterior anàlisi.

Es recompten i se n'enregistren les metafases trobades per cada cas. Les imatges s'analitzen amb el programa *Photoshop (Adobe®)*, que ens permet ampliar i contrastar les imatges de les metafases per poder determinar si hi ha ITS i descartar-ne el soroll de fons.

### 3.2.5. Paràmetres reproductius

S'examinen en fresc els úters i els ovaris de totes les femelles gestants. Els úters s'analitzen macroscòpicament i els ovaris s'examinen sota una lupa binocular amb llum freda.

Es fa un comptatge dels fetus, de les pèrdues postimplantacionals i de les implantacions (fetus + pèrdues postimplantacionals) corresponents a cada úter, i també dels cossos lútics d'ambdós ovaris. A partir d'aquí, es calculen les pèrdues preimplantacionals (cossos lútics – implantacions).

Es calculen els paràmetres anteriors (cossos lútics, implantacions, fetus, pèrdues preimplantacionals i pèrdues postimplantacionals) respecte de les femelles gestants de cada grup de tractament. També es calculen els índexs (%) implantacionals, gestacionals i de pèrdues preimplantacionals i postimplantacionals, de la manera següent:

$$\text{Pèrdues preimplantacionals (\%)} = \frac{\text{Pèrdues preimplantacionals totals}}{\text{total cossos lútics totals}} \times 100$$

$$\text{Índex implantacional (\%)} = \frac{\text{Implantacions totals}}{\text{cossos lútics totals}} \times 100$$

$$\text{Pèrdues postimplantacionals (\%)} = \frac{\text{Pèrdues postimplantacionals totals}}{\text{implantacions totals}} \times 100$$

$$\text{Índex gestacional (\%)} = \frac{\text{Fetus totals}}{\text{implantacions totals}} \times 100$$

### 3.2.6. Anàlisi estadística

Per a tots els paràmetres analitzats es considera una mínima significació estadística de  $p = 0,05$  (dues cues) i se'n calculen les respectives mitges, desviacions estàndard i errors estàndard. En funció de l'experiment realitzat, s'utilitzen diferents mètodes d'anàlisi estadística.

Per a l'estudi dels efectes de les radiacions ionitzants (*objectiu 1*), es fa la prova de la  $t$  d'Student (test paramètric, treballs I i II) i s'efectua la prova d'anàlisi de variàncies (ANOVA) de contrastos *a priori* (treball III). També es calcula el coeficient de variació, com a mesura de dispersió de les dades i es fa una *nested* ANOVA per a mesurar-ne la variabilitat (treball II).

Per a l'estudi dels efectes d'un mutagen químic (apc) (*objectiu 2*), es duu a terme la prova de la  $t$  d'Student (test paramètric).

En l'estudi de la possible radioprotecció d'un anàleg de la GnRH (*objectiu 3*), es fan dues anàlisis estadístiques diferents. Per a l'anàlisi citogenètica, es fa la prova d'anàlisi de variàncies (ANOVA) de contrastos *a priori* per comparar tots els paràmetres citogenètics dels sis grups. Per a l'anàlisi reproductiva, es compararen tots els grups entre si amb la prova U de Mann-Whitney, comparant els grups de dos en dos.

Els cromosomes i les bandes cromosòmiques estadísticament significatius (*objectiu 4*) implicats en la inestabilitat cromosòmica espontània i radioinduída transgeneracional, així com la distribució de les ITS al llarg dels cromosomes, es determinen mitjançant un test de  $\chi^2$ . Les

bandes cromosòmiques implicades en els efectes de l'apc (*objectiu 4*) i els llocs fràgils (*objectiu 4*) es detecten mitjançant el programa FSM (versió 995; Böhm *et al.* 1995).

Els cromosomes s'analitzen globalment, tenint en compte tots els trencaments trobats en cada cromosoma, i independentment del tipus d'alteració cromosòmica. El nombre de parells de bases de cada cromosoma i de cada banda cromosòmica s'obté de la pàgina web *Chromosome ensembl* ([www.ensembl.org/Rattus norvegicus](http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus)). No s'han tingut en compte ni el cromosoma Y ni els centròmers per a l'anàlisi estadística.



## 4. Results

*Torture numbers, and they'll confess to anything.*

Gregg Easterbrook



## 4.1. Treball I



**Genomic instability in rat: breakpoints induced by ionising radiation and interstitial telomeric-like sequences**

**Núria Camats**, Aurora Ruiz-Herrera, Juan José Parrilla, Maribel Acien, Pilar Payá, Elena Giulotto, Josep Egozcue, Francisca García, Montserrat Garcia

*Mutation Research (2006) 595:156–166*

Índex d'Impacte (2006) = 4,111

1r quartil (2006). Categoria *Toxicology* (posició 6/76)

1r quartil (2006). Categoria *Biotechnology & Applied microbiology* (posició 19/140)





# Genomic instability in rat: Breakpoints induced by ionising radiation and interstitial telomeric-like sequences

Núria Camats<sup>a,b</sup>, Aurora Ruiz-Herrera<sup>b,1</sup>, Juan José Parrilla<sup>c</sup>, Maribel Acien<sup>c</sup>, Pilar Payá<sup>c</sup>, Elena Giulotto<sup>d</sup>, Josep Egozcue<sup>b</sup>, Francisca García<sup>a</sup>, Montserrat Garcia<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Servicio de Ginecología y Obstetricia, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Ctra. Madrid-Cartagena, s/n, El Palmar, 30120 Murcia, Spain

<sup>d</sup> Dipartimento di Genetica e Microbiologia Adriano Buzzati Traverso, Università degli Studi di Pavia, 27100 Pavia, Italy

Received 27 June 2005; received in revised form 27 October 2005; accepted 18 November 2005

Available online 4 January 2006

## Abstract

The Norwegian rat (*Rattus norvegicus*) is the most widely studied experimental species in biomedical research although little is known about its chromosomal structure. The characterisation of possible unstable regions of the karyotype of this species would contribute to the better understanding of its genomic architecture. The cytogenetic effects of ionising radiation have been widely used for the study of genomic instability, and the importance of interstitial telomeric-like sequences (ITSs) in instability of the genome has also been reported in previous studies in vertebrates.

In order to describe the unstable chromosomal regions of *R. norvegicus*, the distribution of breakpoints induced by X-irradiation and ITSs in its karyotype were analysed in this work. For the X-irradiation analysis, 52 fetuses (from 14 irradiated rats) were studied, 4803 metaphases were analysed, and a total of 456 breakpoints induced by X-rays were detected, located in 114 chromosomal bands, with 25 of them significantly affected by X-irradiation (hot spots). For the analysis of ITSs, three fetuses (from three rats) were studied, 305 metaphases were analysed and 121 ITSs were detected, widely distributed in the karyotype of this species. Seventy-six percent of all hot spots analysed in this study were co-localised with ITSs.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Interstitial telomeric-like sequences; X-irradiation; Genomic instability; Rat

## 1. Introduction

The Norwegian rat (*Rattus norvegicus*, RNO) is the most widely used experimental species in biomedical research and it has also become a model organism for many multifactorial human disorders. Despite its importance in research and the achieving of the whole genome sequencing of the rat, little is known about its genomic architecture. In fact, its chromosomal function involves very complex interactions that go further than what can be understood about primary sequences [1]. Conse-

\* Corresponding author at: Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona), Spain. Tel.: +34 93 5811905; fax: +34 93 5811025.

E-mail address: [Montserrat.Garcia.Caldes@uab.es](mailto:Montserrat.Garcia.Caldes@uab.es) (M. Garcia).

<sup>1</sup> Present address: Evolutionary Genomics Group Department of Botany and Zoology, University of Stellenbosch, Private Bag X1, Matieland 7602, South Africa.

quently, stability of a genome does depend not only on its genetic sequence, but rather also on its own genomic architecture. Thus, the study of the genomic architecture, from the instability point of view, would also contribute to a better understanding of the chromosomes of rat.

Ionising radiations are physical agents that can induce mutations [2] in all stages of the cell cycle. Double-strand breaks (DSBs) are the primary lesions of DNA that allow a direct formation of structural or numeric chromosomal aberrations after defective repairing and these genotoxic effects in cells can be perceived at the cytogenetic level. The cytogenetic effects of ionising radiations in cells have been widely used for the study of genomic instability. Previous cytogenetic studies in Primates have suggested the existence of chromosomal regions more prone to break after treatment with physical and chemical agents [3–7], and also other studies in vertebrates have shown the importance of interstitial telomeric-like sequences (ITSs) in chromosomal instability and evolutionary processes [8–10]. Indeed, a correspondence has already been reported among breakpoints by ionising radiation, ITSs and fragile sites (FSs), proto-oncogens, breakpoints involved in chromosomal cancer rearrangements and evolutionary breakpoints [3,7].

ITSs consist of telomeric-like (TTAGGG)<sub>n</sub> tandem repeats located at non-terminal regions in eukaryotic chromosomes and their pattern in vertebrates can vary among closely related species [11]. They have been classified into different types according to their organisation: short, subtelomeric and fusion ITSs and large blocks of these sequences [8,12,13]. Short ITSs are made up of short sequences of TTAGGG units, essentially exact and arranged in the same orientation. They are polymorphic and highly unstable [14]. Subtelomeric ITSs are also polymorphic and unstable sequences, but they consist of some hundreds of base pairs, including some degenerated units in the same orientation [14]. They have been observed to be associated with telomeric proteins and can even contain genes [15]. Fusion ITSs contain two head-to-head blocks of TTAGGG flanked by subtelomeric sequences, whereas large blocks of telomeric sequences are found in chromosomal pericentromeric regions in different non-human species [11,12].

Previous studies performed in mammals, including humans, have postulated that some ITSs can be considered as a result of ancestral chromosomal reorganisations [9,16] and of intrachromosomal reorganisations [17,18]. Some of them are associated with human disorders that have caused an internalisation of telomeres [1,19,20]. In fact, Ijdo et al. [16] identified two inverted DNA sequences of telomeric DNA in human chromosomal

band 2q13, considered a relic of an ancient telomeric-telomeric fusion of two ancestral primate chromosomes. It has also been postulated that they could be unstable sequences where fissions and internal reorganisations could occur during the evolution of the karyotype, the storage of new telomeres or fission points being where chromosomal reorganisations can be fixed during the evolutionary process [9,21]. Recent studies have postulated that a large amount of ITSs have been generated by the insertion of telomeric sequences in repairing DSBs, so, ITSs could simply mark breaksites within unstable regions [8,10,13].

Numerous authors coincide in the existence of a relationship between ITSs and events of chromosomal instability, such as recombination, amplification and even retro-transposition, in bacteria, yeast, Chinese hamster [22–25], other rodent species [26] and also in the human karyotype [10]. There are remarkable results that give evidence that ITSs are preferential sites to solve chromosomal aberrations and that these sites show both spontaneous instability [27,28] and induced instability [29,30]. In particular, radiosensitivity of ITSs has already been demonstrated [31,32]. Moreover, a co-localisation of ITSs and FSs has been found at the cytogenetic level in rodents and primates [9,27,33–35], and previous cytogenetic studies in non-human primates have indicated that there is a relationship among evolutionary breakpoints, FSs and the existence of ITSs [7,9].

The main objective of this work is to characterise unstable regions in the *R. norvegicus* genome so as to elucidate the genomic architecture of this species. In order to study the architecture of the rat karyotype relating to its chromosomal instability, the chromosomes and chromosomal bands involved in ionising radiation effects and those containing ITSs are described.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Treatment of animals and obtainment of foetuses

A total of 17 (14 for the detection of breakpoints by X-rays and three for the detection of ITSs) *R. norvegicus* female Sprague–Dawley rats ( $2n = 42$ , Servicio de Animales de Laboratorio, Universidad de Murcia and Servei d'Estabulari, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain) were mated with males of known fertility for two weeks. After 14–16 days of pregnancy, the pregnant females were sacrificed in order to obtain foetal tissues.

### 2.2. Cell cultures and chromosome preparations

A total of 52 foetuses were analysed (49 for the detection of breakpoints by X-rays and three for the detection of ITSs).

Primary cultures of fibroblasts were established for each foetus. Cells were harvested and chromosomal preparations were obtained according to standard procedures. Rat idiogram and G-band nomenclature were established according to Levan [36] with a resolution of 238 bands/haploid genome.

### 2.3. Detection of breakpoints by X-rays

#### 2.3.1. Treatment with X-irradiation

Twelve female rats were irradiated, previously anaesthetised, in the abdominal region at different dosages: three females were irradiated with a single dose of 5 Gy and nine other different females with a fractioned dose of 12 Gy (3 Gy per day). Two females were used as controls. After 45 days of irradiation, all of the females (including the ones used as controls) were mated with males for two weeks. From a total of 49 fetuses, from 14 to 16 days old (41 of them from irradiated rats), fibroblast primary cultures were established and chromosome preparations were obtained. Roughly 100 cells per rat foetus were analysed.

#### 2.3.2. Breakpoints analysis

Detection of breakpoints was performed by analysing metaphases by sequential staining: conventional staining (with Leishman's stain) for the detection of chromosomal reorganisations, followed by the sequential G-banding technique (with Wright's stain) for the precise localisation of breakpoints. Metaphases were analysed with an Olympus AX70 optic microscope, and digital images were obtained using a coupled camera with CytoVision software (Applied Imaging, Inc.).

Breakpoints scored were those implicated in different chromosomal reorganisations: gaps, breaks and deletions of chromatid and chromosome, translocations, fusions, inversions, rings, dicentrics and inter-chromosomal reorganisations. We maintained the criterion of not including a breakpoint if we could not determine its exact position.

#### 2.3.3. Statistical analysis

The statistical analysis was performed by conducting a  $\chi^2$  test with Yates' correction ( $p < 0.05$ ,  $< 0.01$ ,  $< 0.001$ ), taking into account the length of chromosomes, chromosomal arms and chromosomal bands.

### 2.4. Detection of interstitial telomeric-like sequences (ITs)

Fibroblasts from primary cultures of three rat fetuses from three different mothers were analysed. Fluorescent in situ hybridisation (FISH) experiments were performed as previously described [37]. Chromosomes were hybridised with a non-commercial biotin-labelled telomeric probe, i.e., a mixture of synthetic (TTAGGG)<sub>n</sub> polynucleotides. The G-banding pattern was generated by using the DAPI DNA counterstain and images were captured by the IPLab System with the CCD/Apple System (Digital Pixel; Brighton).

Given that single spots cannot be distinguished from the background, only double spots (hybridisation signals on both chromatids) were scored, following the same criteria as in Azzalin et al. [37].

#### 2.4.1. Statistical analysis

The statistical analysis was performed by conducting a  $\chi^2$  test with Yates' correction ( $p < 0.05$ ,  $< 0.01$ ,  $< 0.001$ ), taking into account the length of chromosomal bands.

## 3. Results

### 3.1. X-irradiation breakpoints

The breakpoints analysed were those found implicated in intra- and inter-chromosomal reorganisations (Fig. 1a,b). A total of 4803 metaphases was analysed, 3954 of them were treated with X-rays and 532 were aberrant metaphases. A total of 792 breaks from different chromosomal reorganisations (gaps included) were detected by sequential G-banding methods (Table 1). Additionally, we were able to identify 456 breakpoints from these 792 breaks detected after the X-ray treatment, spread all over the karyotype but not in a random distribution. Those breakpoints analysed were located at 114 chromosomal bands all over the chromosomes, except in chromosome RNOY.

The distribution of breakpoints by chromosomes and chromosomal arms was analysed (Tables 2 and 3) and revealed that chromosomes RNO1, RNO2 and RNO3, as well as RNO chromosomal arms 1q, 2q and 3p had a significantly higher number of breakpoints than expected ( $\chi^2$  test with Yates' correction). Regarding the localisation of breakpoints, it was observed that 24 chromosomal bands in RNO were significantly affected by X-irradiation (Table 4, Fig. 2) distributed along chromosomes RNO1, RNO2, RNO3, RNO4, RNO7, RNO8 and RNO13. When the statistical analysis was conducted, a high proportion of the most affected bands belonged to RNO1–RNO4. At the same time, it is important to state that some chromosomes (RNO9, RNO14, RNO16, RNO17, RNOX and RNOY), chromosomal arms (9q, 14p, 16p, 16q, 17q, Xq and Yq), as well as chromosomal bands showed a significantly lower number of breakpoints than expected (Tables 2–4).

In order to know if there were some chromosomal regions more affected than expected, the long and short arms were each roughly divided into three equal regions: pericentromeric region (C), middle region (M) and terminal region (T). Distribution of breakpoints according to their chromosomal position was: 114 breakpoints (25%) in C regions; 191 breakpoints (41.89%) in M regions and

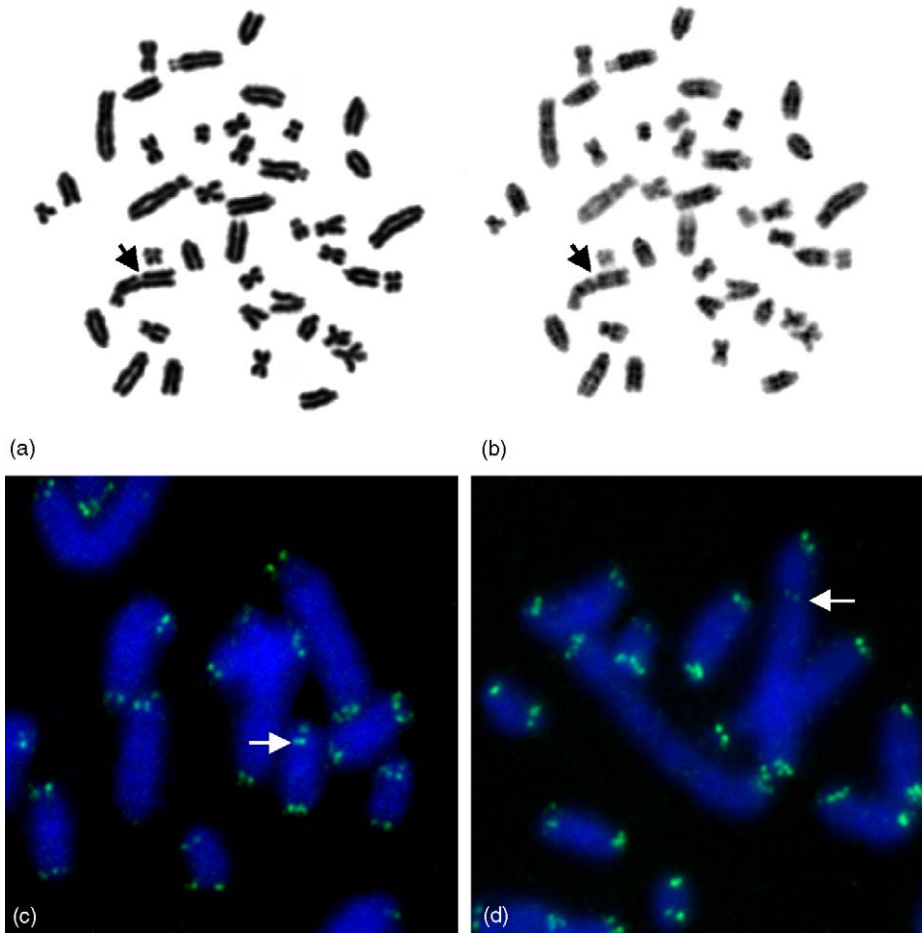


Fig. 1. a and b are metaphase images showing the chromosomes of *Rattus norvegicus* in conventional staining (a) and in the sequential G-banding technique (b). Black arrows indicate a chromatid break in band 1q32. c and d are partial metaphase images of *R. norvegicus* chromosomes showing ITSs FISH hybridisation signals with the telomeric probe. White arrows show double hybridisation signals in 18p12 (c) and in 1q43 (d).

151 breakpoints (33.11%) in T regions. Localisation of breakpoints along the chromosomes was not random: there was a concentration in M ( $\chi^2$  test with Yates' correction,  $p < 0.05$ ).

Furthermore, the distribution analysis of the total breakpoints (456) according to the G-banding pattern indicated that 39 breakpoints (8.55%) were found in G positive (G(+)) bands and 417 breakpoints (91.45%)

were found in G negative (G(-)) bands. According to this, these breakpoints concentrated in G(-) bands ( $\chi^2$  test with Yates' correction,  $p < 0.05$ ).

### 3.2. Interstitial telomeric-like sequences

A total of 305 metaphases obtained from three foetuses from different mothers were analysed. Besides the

Table 1

Number of analysed metaphases, aberrant metaphases, aberrant metaphases/total metaphases, total breaks from different chromosomal reorganisations (gaps included) and breaks (gaps included)/metaphase observed in X-ray-treated and in control cultures from 49 *Rattus norvegicus* foetuses

Treatment <sup>a</sup>	No. of foetuses	Metaphases	Aberrant metaphases	% Aberrant metaphases	Breaks	% Breaks
C	8	849	61	7.18	76	8.95
I	41	3954	471	11.91	716	18.11
Total	49	4803	532		792	

<sup>a</sup>C: control; I: X-ray-treated.

Table 2

Observed and expected distribution of chromosomal breakpoints among chromosomes of foetuses from irradiated RNO females (5 and 12 Gy (fractioned dose))

Chromosome	Length <sup>a</sup>	Breakpoints	
		Observed	Expected
<b>1</b>	<b>70.0</b>	<b>101</b>	<b>40.6<sup>***</sup></b>
<b>2</b>	<b>68.7</b>	<b>54</b>	<b>39.8<sup>*</sup></b>
<b>3</b>	<b>51.0</b>	<b>60</b>	<b>29.6<sup>***</sup></b>
4	50.0	39	29.0
5	46.0	24	26.7
6	39.5	17	22.9
7	38.0	24	22.0
8	37.0	24	21.5
9	35.0	5	20.3 <sup>b, **</sup>
10	35.6	18	20.6
11	28.0	8	16.2
12	24.5	7	14.2
13	32.0	16	18.6
14	32.5	7	18.9 <sup>b, **</sup>
15	30.0	14	17.4
16	27.3	1	15.8 <sup>b, ***</sup>
17	26.4	3	15.3 <sup>b, **</sup>
18	23.0	8	13.3
19	17.9	10	10.4
20	16.0	7	9.3
X	37.3	9	21.6 <sup>b, **</sup>
Y	21.5	0	12.5 <sup>b, ***</sup>

Chromosomes with a significantly higher number of breakpoints are given in bold.

<sup>a</sup> Length is based on data from the ideogram of *R. norvegicus* (mm).

<sup>b</sup> Chromosomes with a significantly lower number of breakpoints.

\*  $\chi^2$  test with Yates' correction,  $p < 0.05$ .

\*\*  $\chi^2$  test with Yates' correction,  $p < 0.01$ .

\*\*\*  $\chi^2$  test with Yates' correction,  $p < 0.001$ .

final telomeric signals, a total of 121 ITSs was detected, with different hybridisation frequencies, in all chromosomes except in RNOY (Figs. 1c, d and 2).

ITSs were classified according to their frequency of hybridisation into very frequent, frequent and rare [37]. Very frequent signals were those which hybridised 19 times or more with the telomeric probe. They were located in two different chromosomal bands: 1q12 (24 times) and 2q34 (60 times). Frequent signals, those which hybridised 5–18 times, were located in 15 different chromosomal bands: 1q11 (10 times), 1q22 (14 times), 1q43 (eight times), 2q32 (six times), 2q33 (13 times), 3q36 (nine times), 4q34 (11 times), 6q24 (five times), 10q12 (five times), 11q12 (six times), 14q11 (six times), 17cen (five times), 18p12 (six times), 18q12 (eight times) and 19q11 (five times). Rare signals were those which hybridised fewer than five times with the telomeric probe and were found in 104 different chromosomal bands (Fig. 2).

Table 3

Observed and expected distribution of chromosomal breakpoints among chromosomal arms of foetuses from irradiated RNO females (5 and 12 Gy (fractioned dose))

Chromosomal arm	Length <sup>a</sup>	Breakpoints	
		Observed	Expected
1p	10.0	7	5.8
<b>1q</b>	<b>60.0</b>	<b>94</b>	<b>34.8<sup>***</sup></b>
<b>2q</b>	<b>68.7</b>	<b>54</b>	<b>39.8<sup>*</sup></b>
<b>3p</b>	<b>5.0</b>	<b>26</b>	<b>2.9<sup>***</sup></b>
3q	46.0	34	26.7
4q	50.0	39	29.0
5q	46.0	24	26.7
6q	39.5	17	22.9
7q	38.0	24	22.0
8q	37.0	24	21.5
9q	35.0	5	20.3 <sup>b, **</sup>
10q	35.6	18	20.6
11p	5.0	0	2.9
11q	23.0	8	13.3
12p	7.0	3	4.1
12q	17.5	4	10.2
13p	9.0	2	5.2
13q	23.0	14	13.3
14p	14.5	0	8.4 <sup>b, **</sup>
14q	18.0	7	10.4
15p	15.0	7	8.7
15q	15.0	7	8.7
16p	13.3	1	7.7 <sup>b, *</sup>
16q	14.0	0	8.1 <sup>b, **</sup>
17p	13.2	2	7.7
17q	13.2	1	7.7 <sup>b, *</sup>
18p	10.0	5	5.8
18q	13.0	3	7.5
19p	8.8	5	5.1
19q	9.1	5	5.3
20p	8.0	5	4.6
20q	8.0	2	4.6
Xq	37.3	9	21.6 <sup>b, **</sup>
Yq	21.5	0	12.5 <sup>b, ***</sup>

Chromosomal arms with a significantly higher number of breakpoints are given in bold.

<sup>a</sup> Length is based on data from the ideogram of *R. norvegicus* (mm).

<sup>b</sup> Chromosomal arms with a significantly lower number of breakpoints.

\*  $\chi^2$  test with Yates' correction,  $p < 0.05$ .

\*\*  $\chi^2$  test with Yates' correction,  $p < 0.01$ .

\*\*\*  $\chi^2$  test with Yates' correction,  $p < 0.001$ .

ITSs were analysed by chromosomes and chromosomal arms ( $\chi^2$  test with Yates' correction,  $p < 0.05$ ) and revealed that their distribution along the chromosomes and chromosomal arms was random. The distribution of non-centromeric ITSs according to chromosomal position was the following: 59 ITSs (48.76%) were found in C; 33 ITSs (27.27%) in M and 29 ITSs (23.97%) were located in T. The localisation of ITSs along the chro-



Table 4  
RNO chromosomal bands with a significantly higher and lower number of breaks (gaps included)

Bands	Length <sup>a</sup>	Breakpoints	
		Observed	Expected
1q12	5.5	9	3.23**
1q22	8.5	21	5***
1q32	5.3	18	3.12***
1q34	1.0	6	0.59***
1q36	2.0	5	1.18**
1q42	0.8	5	0.47***
1q43	4.3	18	2.53***
1q54	2.2	6	1.29***
2q24	5.3	9	3.12**
2q32	3.3	6	1.94**
2q34	7.8	13	4.59***
2q42	2.2	8	1.29***
3p12	1.8	21	1.06***
3p11	1.3	3	0.76*
3q12	4.8	7	2.82*
3q32	1.8	4	1.06*
3q36	5.0	11	2.94***
4q13	1.8	5	1.06***
4q24	5.6	8	3.29*
4q34	6.7	10	3.94**
4q42	6.4	8	3.71*
7q34	6.0	12	3.53***
8q22	2.8	5	1.65*
8q24	8.0	11	4.7**
13q26	3.6	6	2.12*
16q12	11.3	0	6.64 <sup>b,*</sup>
17q12	11.3	1	6.64 <sup>b,*</sup>
Yq11	16.0	0	9.41 <sup>b,**</sup>

<sup>a</sup> Length is based on data from the ideogram of *R. norvegicus* (mm).

<sup>b</sup> Bands with a significantly lower number of breakpoints.

\*  $\chi^2$  test with Yates' correction,  $p < 0.05$ .

\*\*  $\chi^2$  test with Yates' correction,  $p < 0.01$ .

\*\*\*  $\chi^2$  test with Yates' correction,  $p < 0.001$ .

mosomes was not random: the number of ITSs in C was significantly higher when a statistical test was conducted ( $\chi^2$  test with Yates' correction,  $p < 0.05$ ). Furthermore, the distribution of non-centromeric ITSs, according to the G-banding pattern, indicated that 50 ITSs (44.25%) were located in G(+) bands and 63 ITSs (55.75%) in G(-) bands. In this case, their distribution was random ( $\chi^2$  test with Yates' correction,  $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Although the genomic sequence of the rat has been widely studied, little is known about the genomic architecture of this species, whereas the importance of it is unquestionable for being able to understand the behaviour of the genome. In order to analyse the unstable regions in the karyotype of *R. norvegicus*, breakpoints

induced by X-irradiation and the distribution of interstitial telomeric-like sequences in the chromosomes of this species were analysed for the first time anywhere in this work.

##### 4.1. X-irradiation breakpoints

A total of 456 breakpoints by X-rays were analysed. The analysis of the control cultures showed that all bands with spontaneous breakpoints were also affected by X-rays. Only the largest chromosomes, RNO1–RNO3, and, coincidentally, their 1q, 2q and 3p arms, show a significantly higher number of breakpoints induced by X-rays than expected, whereas six chromosomes and seven chromosomal arms are statistically less affected (Tables 2 and 3).

RNO1–RNO3 are the chromosomes with the largest number of affected bands by X-rays followed by some medium-sized chromosomes, whereas the least affected chromosomes are the medium-sized ones RNO11 and RNO14 and the small ones RNO16–RNO18. From the three heterochromatic arms presented in Grützner et al. [38], only the RNO3p arm showed a higher number of breakpoints than expected.

In the case of the least affected chromosomes RNO16 and RNO17, there were some methodological problems that could explain why proportions are not maintained. First, these two chromosomes have a very similar size and morphology and so, according to the sample's quality, they can be mistaken. Moreover, both arms of RNO17 are equal and those in RNO16 are very similar. In fact, there is no agreement regarding the assignment of p and q arms in RNO16 [38–40]. In this sense, the breakpoints counted in these two chromosomes could be biased. However, this problem can not totally explain why they do not have the same proportion of breakpoints as other chromosomes of a similar length.

Some primate species (including humans) show a non-random distribution of the breakpoints by X-rays according to chromosomal position, and these breakpoints accumulate in T (human species, *Macaca fascicularis* and *Erithrocebus patas*) and in C chromosomal regions (*Cebus apella*) [3–5]. It has often been explained that repair mechanisms are less efficient in the C and T regions [41] and this fact could explain the results obtained in these primate karyotypes. In the same sense, breakpoints induced by X-rays show a non-random distribution in the rat: they accumulate in M regions. The reason for the accumulation in M regions in the rat remains unknown, but it could be related to some kind of instability in non-terminal regions of chromosomal arms in this species.



Fig. 2. Ideogram of *R. norvegicus* chromosomes exhibiting the interstitial telomeric-like sequences (dots), the most affected chromosomal bands induced by X-rays (asterisks) and the homology limits between RNO and MMU described by Helou et al. (2001) (long lines). Every dot means a hybridisation signal on both chromatids.

A high proportion of the 456 breakpoints affected by X-rays was located in G(–) bands in RNO: the distribution of breakpoints was statistically significant in G(–) bands and we can affirm that 88% (22 out of 25) of chromosomal bands most affected by ionising radiation are G(–). A similar concentration of breakpoints in G(–) bands has also been found in other primate species, including the human species [3–5]. According to these results, G negative bands are much more sensitive to X-rays than G positive bands. However, other *in vitro* experiments in human chromosomes show that this clustering in G(–) bands could be an artefact of the visual analysis meaning that localisation of breakpoints can be influenced by the G-banding pattern and by the tendency to accumulate breakpoints in pale bands or light bands when only one banding technique is used [3]. In spite of this, there are other studies, in non-human primates [4,5] and also in human species [42], which defend the

fact that most of the pale bands analysed which are terminal bands are mostly affected by X-rays and these bands are independent of visual artefacts of this kind of analysis.

According to this analysis, we consider that there are chromosomal bands, chromosomal arms and chromosomes more and less prone to break by X-rays throughout the karyotype of RNO. In conclusion, damage induced by X-irradiation is not random: it affects specific sites because of their direct exposure, due to the architecture of the genome and/or due to the specific sequences in these regions.

#### 4.2. Interstitial telomeric-like sequences

In this study, ITSs have been detected in the karyotype of RNO analysing fibroblast chromosomes, due to the fact that the most reliable results are those com-



ing from studies in primary cultures. Although there were chromosomes and chromosomal arms with a large number of ITSs, and other ones with no ITSs, the distribution of ITSs along chromosomes and chromosomal arms was random ( $\chi^2$  test with Yates' correction,  $p < 0.05$ ). It is important to note that centromeric ITSs were also detected in some chromosomes and that all the ITSs found in sub-bands in RNO16 and RNO17 were unified in bands 16q12 and 17q10 because of their difficulty in the analysis. ITSs were classified according to their frequency of hybridisation as in previous works [9,37]. The differences in hybridisation frequencies found were probably related to the different number of tandem repeats of the (TTAGGG)<sub>n</sub> sequence present in each locus: it was more difficult to detect by FISH when the sequence was small. When conducting the statistical test, localisation of ITSs along the chromosomes is concentrated in C regions, but their distribution according to the G-banding pattern is random. If we compare our results with those already published in other rodent species, some differences become evident [43–51]. As has been observed in *Cricetulus griseus* and in *Mus minutoides/musculoides*, RNO shows a spread pattern of specific signals all through its karyotype [12,27]. However, in these two species (*C. griseus* and *M. minutoides/musculoides*) there are blocks of ITSs not found in RNO.

#### 4.3. Evolutionary implications of ITSs

When comparing the results of chromosomal homologies between RNO and *Mus musculus* (MMU) [39,52,53] with the localisation of ITSs found in the karyotype of RNO, some coincidences have been found. Fourteen out of 30 (46.67%) limits of the RNO-conserved chromosomal segments described by Stanyon et al. [39] and Cavagna et al. [53], when compared with MMU, co-localise with RNO ITSs, whereas 15 out of 40 (37.5%) limits of the RNO-conserved chromosomal segments co-localise with RNO ITSs, when compared to results from Helou et al. [52] (Fig. 2).

Can it be assumed that a large number of ITSs is related to a high rate of chromosome evolution in a species? In fact, evolutionary studies in the order of Rodentia show that these species have numerous evolutionary rearrangements in their karyotypes. The rate of change in these species seems to be the highest among mammals [39]. Telomeric sequences have been found in centromeric regions of metacentric chromosomes as a result of evolutionary reorganisations in rodents [12,46,48,54]. Nevertheless, there are rodent species with very few, or even without ITSs, and other

ones with losses of telomeric sequences at the evolutionary breakpoints [44,48,50,55,56]. Hence, it is proposed that this absence of a signal in chromosomes involved in fusions is produced by a loss of telomeric repeats during these events or by the fact that these sequences are too short to be detected by the FISH technique. In all probability, both aspects could occur in these cases: part of the telomeric repeats could be lost, converting it into a short sequence.

Based on our findings and also on those previously published, there are rodent species with a great number of ITSs, i.e., *R. norvegicus*, whereas others show very few or no ITSs. Thus, the presence/absence of ITSs might not necessarily be related to the fact of having more or fewer chromosome reorganisations, and so this question remains open.

#### 4.4. Genomic instability

In our study, 19 coincidences between bands significantly affected by ionising radiation and the ITSs in the RNO karyotype have been found: 1q12, 1q22, 1q32, 1q34, 1q42, 1q43, 2q24, 2q32, 2q34, 2q42, 3p12, 3q36, 4q13, 4q24, 4q34, 4q42, 7q34, 8q22 and 8q24 (Fig. 2). Therefore, 76% of all hot points are co-localised with ITSs. In fact, this percentage is higher, with respect to those published in primates [3–5]. In human species (20 hot points and 103 ITSs) there are eight coincidences (40%) and in the *M. fascicularis* (19 hot points and 90 ITSs) and *C. apella* (26 hot points and 55 ITSs) species, only five coincidences were found, representing 26.32% and 19.23%, respectively [3–5,9].

In spite of the differences in the percentages of co-localisation of ITSs and hot spots by X-irradiation in these species, ITSs have been reported to be radiosensitive and act as preferential sites for resolution of aberrations when breaking by radiation, therefore, they are usually involved in radio-induced chromosomal instability. In fact, Day et al. [24] suggested a director role of ITSs in chromosomal instability. So, according to Azzalin et al. [8] and Faravelli et al. [13], a review whether ITSs are the cause or effect of instability should be performed. Cytogenetic studies would give support to the hypothesis that very long ITSs tend to break, whereas this same tendency is controversial in short ITSs [27,30,57]. In the same sense, molecular data [30] have confirmed that ITSs can be local genome de-stabilisers, and so they are able to promote reorganisations on a large scale. In this sense, other molecular data from ITSs in RNO (data not shown) indicate that some of these ITSs contain a large number of repeats and this repeats would cause the high coincidence between ITSs and hot points

by X-irradiation (76%) and would explain the genomic instability in these regions.

In going through the observed relationship between ITSs in the rat and its genomic instability, it is important to mention that there is also a cytogenetic co-localisation between ITSs and spontaneous and induced FSs (unpublished data). Preliminary results indicate that there is a concentration in five large chromosomes: RNO1–RNO4 and RNOX, meaning that 77.78% of FSs are co-localised with ITSs in RNO.

In conclusion, the instability in the genomic architecture of rat produced by physical (X-rays) and chemical agents (FSs) is related to the presence of ITSs, as follows from the chromosomal breakages observed in *R. norvegicus* caused by these agents, and which co-localise cytogenetically with ITSs.

### Acknowledgements

We wish to thank the Servicio de Ginecología y Obstetricia and the Servicio de Radioterapia of the Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Spain), the Servicio de Cultivo de Tejidos and the Servicio de Animales de Laboratorio of the Universidad de Murcia (Spain) and the Servei de Cultius Cel·lulars (IBB) of the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain) and Dr. J. Calaf of the Hospital de Sant Pau i de la Santa Creu (Spain) for their collaboration in this project. Financial support was received from FIS (exp 99/09900) and from Ipsen Pharma Laboratories. The English of this manuscript has been corrected by a native English-speaking English Instructor of this University.

### References

- [1] V.M. Park, K.M. Gustashaw, T.M. Wathen, The presence of interstitial telomeric sequences in constitutional chromosome abnormalities, *Am. J. Hum. Genet.* 50 (1992) 914–923.
- [2] K.L. Witt, J.B. Bishop, Mutagenicity of anticancer drugs in mammalian germ cells, *Mutat. Res.* 355 (1996) 209–234.
- [3] L. Barrios, R. Miró, M.R. Caballín, C. Fuster, F. Guedea, A. Subias, J. Egozcue, Cytogenetic effects of radiotherapy. Breakpoint distribution in induced chromosome aberrations, *Cancer Genet. Cytogenet.* 41 (1989) 61–70.
- [4] A. Borrell, M. Ponsà, J. Egozcue, A. Rubio, M. Garcia, Chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes from *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini) after X-ray irradiation, *Mutat. Res.* 401 (1998) 65–76.
- [5] A. Borrell, M. Ponsà, J. Egozcue, A. Rubio, M. Garcia, Chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes from *Macaca fascicularis* and *Erythrocebus patas* (Cercopithecidae, Catarrhini) after X-ray irradiation, *Mutat. Res.* 403 (1998) 185–198.
- [6] A. Ruiz-Herrera, M. Ponsà, F. Garcia, J. Egozcue, M. Garcia, Fragile sites in human and *Macaca fascicularis* chromosomes are breakpoints in chromosome evolution, *Chromosome Res.* 10 (2002) 33–44.
- [7] A. Ruiz-Herrera, F. García, E. Giulotto, C. Attolini, J. Egozcue, M. Ponsà, M. Garcia, Evolutionary breakpoints are co-localized with fragile sites and intrachromosomal telomeric sequences in primates, *Cytogenet. Genome Res.* 108 (2005) 234–247.
- [8] C.M. Azzalin, S.G. Nergadze, E. Giulotto, Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin, *Chromosoma* 110 (2001) 75–82.
- [9] A. Ruiz-Herrera, F. García, C. Azzalin, E. Giulotto, J. Egozcue, M. Ponsà, M. Garcia, Distribution of intrachromosomal telomeric sequences (ITSs) on *Macaca fascicularis* (primates) chromosomes and their implication for chromosome evolution, *Hum. Genet.* 110 (2002) 578–586.
- [10] S.G. Nergadze, M. Rocchi, C.M. Azzalin, C. Mondello, E. Giulotto, Insertion of telomeric repeats at intrachromosomal break sites during primate evolution, *Genome Res.* 14 (2004) 1704–1710.
- [11] J. Meyne, R.J. Baker, H.H. Hobart, T.C. Hsu, O.A. Ryder, O.G. Ward, J.E. Wiley, D.H. Wurster-Hill, T.L. Yates, R.K. Moyzis, Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes, *Chromosoma* 99 (1990) 3–10.
- [12] R. Castiglia, E. Gornung, M. Corti, Cytogenetic analyses of chromosomal rearrangements in *Mus minutoides/musculoides* from North-West Zambia through mapping of the telomeric sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> and banding techniques, *Chromosome Res.* 10 (2002) 399–406.
- [13] M. Faravelli, C.M. Azzalin, L. Bertoni, O. Chernova, C. Attolini, C. Mondello, E. Giulotto, Molecular organization of internal telomeric sequences in Chinese hamster chromosomes, *Gene* 283 (2002) 11–16.
- [14] C. Mondello, L. Pirzio, C.M. Azzalin, E. Giulotto, Instability of interstitial telomeric sequences in the human genome, *Genomics* 68 (2000) 111–117.
- [15] H.C. Mefford, B.J. Trask, The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres, *Nat. Rev. Genet.* 3 (2002) 91–102, Review.
- [16] J.W. Ijdo, A. Baldini, D.C. Ward, S.T. Reeders, R.A. Wells, Origin of human chromosome 2: an ancestral telomere-telomere fusion, *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 88 (1991) 9051–9055.
- [17] J.R. Vermeesch, P. Petit, F. Speleman, K. Devriendt, F. Frys, P. Marynen, Interstitial telomeric sequences at the junction site of a jumping translocation, *Hum. Genet.* 99 (1997) 735–737.
- [18] S.M. Zneimer, P.D. Cotter, S.D. Stewart, Telomere-telomere (end to end) fusion of chromosomes 7 and 22 with an interstitial deletion of chromosome 7p11.2 → p15.1: phenotypic consequences and possible mechanisms, *Clin. Genet.* 58 (2000) 129–133.
- [19] E. Rossi, G. Florida, M. Casali, C. Danesino, G. Chiumello, F. Bernardi, I. Magnani, L. Papi, M. Mura, O. Zuffardi, Types, stability, and phenotypic consequences of chromosome rearrangements leading to interstitial telomeric sequences, *J. Med. Genet.* 30 (1993) 926–931.
- [20] M. Busson Le Coniat, F. Brizard, N.V. Smadja, O. Maarek, H. Der Sarkissian, R. Berger, Interstitial telomere repeats in translocations of hematopoietic disorders, *Leukemia* 14 (2000) 1630–1633.
- [21] S.D. Bouffler, W.F. Morgan, T.K. Pandita, P. Slijepcevic, The involvement of telomeric sequences in chromosomal aberrations, *Mutat. Res.* 366 (1996) 129–135.

- [22] A.S. Balajee, H.J. Oh, A.T. Natarajan, Analysis of restriction enzyme-induced chromosome aberrations in the interstitial telomeric repeat sequences of CHO and CHE cells by FISH, *Mutat. Res.* 307 (1994) 307–313.
- [23] L. Bertoni, C. Attolini, L. Tessera, E. Mucciolo, E. Giulotto, Telomeric and non-telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in gene amplification and chromosome stability, *Genomics* 24 (1994) 53–62.
- [24] J.P. Day, C.L. Limoli, W.F. Morgan, Recombination involving interstitial telomere repeat-like sequences promotes chromosomal instability in Chinese hamster cells, *Carcinogenesis* 19 (1998) 259–265.
- [25] A.D. Bolzán, G.L. Páez, M.S. Bianchi, FISH analysis of telomeric repeat sequences and their involvement in chromosomal aberrations induced by radiomimetic compounds in hamster cells, *Mutat. Res.* 479 (2001) 187–196.
- [26] T. Ashley, D.C. Ward, A “hot spot” of recombination coincides with an interstitial telomeric sequence in the Armenian hamster, *Cytogenet. Cell Genet.* 62 (1993) 169–171.
- [27] L. Bertoni, C. Attolini, M. Favarelli, S. Simi, E. Giulotto, Intrachromosomal telomere-like DNA sequences in Chinese hamster, *Mammalian Genome* 7 (1996) 853–855.
- [28] S.D. Bouffler, M.A. Blasco, R. Cox, P.J. Smith, Telomeric sequences, radiation sensitivity and genomic instability, *Int. J. Radiat. Biol.* 77 (2001) 995–1005, Review.
- [29] J.L. Fernández, J. Gosálvez, V. Goyanes, High frequency of mutagen-induced chromatid exchanges at interstitial telomere-like DNA sequence blocks of Chinese hamster cells, *Chromosome Res.* 3 (1995) 281–284.
- [30] A.E. Kilburn, M.J. Shea, R.G. Sargent, J.H. Wilson, Insertion of a telomere repeat sequence into a mammalian gene causes chromosome instability, *Mol. Cell Biol.* 21 (2001) 126–135.
- [31] L. Alvarez, J.W. Evans, R. Wilks, J.N. Lucas, M. Brown, A.J. Giaccia, Chromosomal radiosensitivity at intrachromosomal telomeric sites, *Genes Chromosomes Cancer* 8 (1993) 8–14.
- [32] P. Slijepcevic, Y. Xiao, I. Dominguez, A.T. Natarajan, Spontaneous and radiation-induced chromosomal breakage at interstitial telomeric sites, *Chromosoma* 104 (1996) 596–604.
- [33] M. Boutouil, R. Fetni, J. Qu, L. Dallaire, C. Richer, N. Lemieux, Fragile site and interstitial telomere repeat sequences at the fusion point of a de novo (Y;13) translocation, *Hum. Genet.* 98 (1996) 323–327.
- [34] A. Musio, T. Mariani, Distribution of interstitial telomere-related sequences in the human genome and their relationship with fragile sites, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 18 (1999) 11–15.
- [35] Y. Zou, X. Yi, W.E. Wright, J.W. Shay, Human telomerase can immortalize Indian Muntjac cells, *Exp. Cell Res.* 281 (2002) 63–76.
- [36] G. Levan, Nomenclature for G-bands in rat chromosomes, *Hereditas* 77 (1974) 37–52.
- [37] C.M. Azzalin, E. Mucciolo, L. Bertoni, E. Giulotto, Fluorescence in situ hybridization with a synthetic (T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>n</sub> polynucleotide detects several intrachromosomal telomere-like repeats on human chromosomes, *Cytogenet. Cell Genet.* 78 (1997) 112–115.
- [38] F. Grützner, H. Himmelbauer, M. Paulsen, H. Ropers, T. Haaf, Comparative mapping of mouse and rat chromosomes by fluorescence in situ hybridization, *Genomics* 55 (1999) 306–313.
- [39] R. Stanyon, F. Yang, P. Cavagna, P.C.M. O’Brien, M. Bagga, M.A. Ferguson-Smith, J. Wienberg, Reciprocal chromosome painting shows that genomic rearrangement between rat and mouse proceeds ten times faster than between humans and cats, *Cytogenet. Cell Genet.* 84 (1999) 150–155.
- [40] S. Nilsson, K. Helou, A. Walentinsson, C. Szpirer, O. Nerman, F. Stahl, Rat–mouse and rat–human comparative maps based on gene homology and high-resolution Zoo-FISH, *Genomics* 74 (2001) 287–298.
- [41] F. Pelliccia, A. Micheli, G. Oliveri, Inter- and intra-chromosomal distribution of chromatid breaks induced by X-rays during G<sub>2</sub> in human lymphocytes, *Mutat. Res.* 150 (1985) 293–298.
- [42] R. Álvarez, L. Tusell, A. Genescà, R. Miró, M.R. Caballín, M. Ribas, F. Barquinero, J. Egozcue, Dose-response relationship for the induction of chromosomal abnormalities in irradiated human spermatozoa, *Environ. Mol. Mutagen.* 29 (1997) 357–366.
- [43] G.G. Sharma, T. Sharma, Unusual chromosomal organization of telomeric sequences and expeditious karyotypic differentiation in the recently evolved *Mus terricolor* complex, *Cytogenet. Cell Genet.* 80 (1998) 204–208.
- [44] M.J. Silva, Y. Yonenaga-Yassuda, Karyotype and chromosomal polymorphism of an undescribed *Akodon* from Central Brazil, a species with the lowest known diploid chromosome number in rodents, *Cytogenet. Cell Genet.* 81 (1998) 46–50.
- [45] W.S. Liu, K. Fredga, Telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences are associated with nucleolus organizer regions (NORs) in the wood lemming, *Chromosome Res.* 7 (1999) 235–240.
- [46] S. Garagna, M. Zuccotti, E. Capanna, C.A. Redi, High-resolution organization of mouse telomeric and pericentromeric DNA, *Cytogenet. Genome Res.* 96 (2002) 125–129.
- [47] M.J. Silva, Y. Yonenaga-Yassuda, Heterogeneity and meiotic behaviour of B and sex chromosomes, banding patterns and localization of (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences by fluorescence in situ hybridization in the neotropical water rat *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae), *Chromosome Res.* 6 (1998) 455–462.
- [48] V. Fagundes, Y. Yonenaga-Yassuda, Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion, *Chromosome Res.* 6 (1998) 643–648.
- [49] M.J. Silva, Y. Yonenaga-Yassuda, New karyotypes of two related species of *Oligoryzomys* genus (Cricetidae, Rodentia) involving centric fusion with loss of NORs and distribution of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences, *Hereditas* 127 (1997) 217–229.
- [50] M.J. Silva, Y. Yonenaga-Yassuda, Autosomal and sex chromosomal polymorphisms with multiple rearrangements and a new karyotype in the genus *Rhipidomys* (Sigmodontinae, Rodentia), *Hereditas* 131 (1999) 211–220.
- [51] M. Lizarralde, A. Bolzán, M. Bianchi, Karyotype evolution in South American subterranean rodents *Ctenomys magellanicus* (Rodentia: Octodontidae): chromosome rearrangements and (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence localizations in 2n=34 and 2n=36 chromosomal forms, *Hereditas* 139 (2003) 13–17.
- [52] K. Helou, A. Walentinsson, G. Levan, F. Stahl, Between rat and mouse zoo-FISH reveals 49 chromosomal segments that have been conserved in evolution, *Mammalian Genome* 12 (2001) 765–771.
- [53] P. Cavagna, G. Stone, R. Stanyon, Black rat (*Rattus rattus*) genomic variability characterized by chromosome painting, *Mammalian Genome* 13 (2002) 157–163.
- [54] J. Andrades-Miranda, N.I.T. Zanchin, L.F.B. Oliveira, A.R. Langguth, M.S. Mattevi, (T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>n</sub> telomeric sequence hybridization indicating centric fusion rearrangements in the karyotype of the rodent *Oryzomys subflavus*, *Genetica* 114 (2002) 11–16.

- [55] S. Garagna, D. Broccoli, C.A. Redi, J.B. Searle, H.J. Cooke, E. Capanna, Robertsonian metacentrics of the house mouse lose telomeric sequences but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area, *Chromosoma* 103 (1995) 685–692.
- [56] I. Nanda, S. Schneider-Rasp, H. Winking, M. Schmid, Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements, *Chromosome Res.* 3 (1995) 399–409.
- [57] C. Desmaze, C. Alberti, L. Martins, G. Pottier, C.N. Sprung, J.P. Murnane, L. Sabatier, The influence of intersitial telomeric sequences on chromosome instability in human cells, *Cytogenet. Cell Genet.* 86 (1999) 288–295.



## 4.2. Treball II



**Trans-generational radiation-induced chromosomal instability in the females enhances the action of chemical mutagens**

**Núria Camats**, Francisca García, Juan José Parrilla, Joaquim Calaf, Miguel Martín,  
Montserrat Garcia Caldés

*Mutation Research (2008) 640:16–26*

Índex d'Impacte (2007): 4,159

1r quartil (2007). Categoria *Toxicology* (posició 4/73)

1r quartil (2007). Categoria *Biotechnology & Applied microbiology* (posició 22/138)





# Trans-generational radiation-induced chromosomal instability in the female enhances the action of chemical mutagens

Núria Camats<sup>a,b</sup>, Francisca García<sup>a</sup>, Juan José Parrilla<sup>c</sup>, Joaquim Calaf<sup>d</sup>,  
Miguel Martín<sup>e</sup>, Montserrat Garcia Caldés<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> *Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain*

<sup>b</sup> *Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain*

<sup>c</sup> *Servicio de Ginecología y Obstetricia, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, 30120 El Palmar, Murcia, Spain*

<sup>d</sup> *Servei de Ginecologia i Obstetrícia, Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain*

<sup>e</sup> *Departament de Pediatria, d'Obstetrícia i Ginecologia i de Medicina Preventiva, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain*

Received 16 June 2007; received in revised form 5 November 2007; accepted 30 November 2007

Available online 8 December 2007

## Abstract

Genomic instability can be produced by ionising radiation, so-called radiation-induced genomic instability, and chemical mutagens. Radiation-induced genomic instability occurs in both germinal and somatic cells and also in the offspring of irradiated individuals, and it is characterised by genetic changes including chromosomal rearrangements. The majority of studies of trans-generational, radiation-induced genomic instability have been described in the male germ line, whereas the authors who have chosen the female as a model are scarce. The aim of this work is to find out the radiation-induced effects in the foetal offspring of X-ray-treated female rats and, at the same time, the possible impact of this radiation-induced genomic instability on the action of a chemical mutagen. In order to achieve both goals, the quantity and quality of chromosomal damage were analysed.

In order to detect trans-generational genomic instability, a total of 4806 metaphases from foetal tissues from the foetal offspring of X-irradiated female rats (5 Gy, acute dose) were analysed. The study's results showed that there is radiation-induced genomic instability: the number of aberrant metaphases and the breaks per total metaphases studied increased and were found to be statistically significant ( $p \leq 0.05$ ), with regard to the control group.

In order to identify how this trans-generational, radiation-induced chromosomal instability could influence the chromosomal behaviour of the offspring of irradiated rat females in front of a chemical agent (aphidicolin), a total of 2481 metaphases were studied. The observed results showed that there is an enhancement of the action of the chemical agent: chromosomal breaks per aberrant metaphases show significant differences ( $p \leq 0.05$ ) in the X-ray- and aphidicolin-treated group as regards the aphidicolin-treated group.

In conclusion, our findings indicate that there is trans-generational, radiation-induced chromosomal instability in the foetal cells from X-ray-treated female rats and that this RIGI enhances the chromosomal damage caused by the chemical agent aphidicolin.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Genomic instability; X-irradiation; Aphidicolin; Female; Rat; Oocyte I

## 1. Introduction

The term genomic instability (GI) has been used since the last decade of the 20th century [1] to describe the increased

rate of acquisition of alterations in the genome [2] produced by either ionising radiation or chemical mutagens. Radiation-induced genomic instability (RIGI) describes the effects seen at delayed times after irradiation, and it is manifested by many cell divisions after the initial radiation insult [3]. It is characterised by genetic changes which include chromosomal rearrangements, aneuploidy, micronuclei, transformation, gene amplifications, gene mutations and reduced plating efficiency in cells derived and clonally expanded from an irradiated cell [3]. RIGI occurs

\* Corresponding author at: Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 5811905; fax: +34 93 5811025.

E-mail address: [Montserrat.Garcia.Caldes@uab.es](mailto:Montserrat.Garcia.Caldes@uab.es) (M.G. Caldés).

in both germinal and somatic cells and also in the offspring of irradiated individuals, so-called trans-generational, radiation-induced genomic instability [2].

This trans-generational RIGI has been studied in flies [4] and in vertebrate species, which include fish [5], rodents [6–13] and humans [14–16]. It has mostly been studied in male individuals (usually mice) [2,9,13,17,18], but also in females [6,7,12,19,20]. After the irradiation of their germ lines, cells, tissues or entire individuals were analysed. This irradiated germ line [9,19,20], the following embryonic cells [19,20], the somatic and germ cells from the embryos and foetuses themselves [6,7,12,18–21] and, also, those cells from the offspring born coming from the irradiated germ line [11,17,22] were directly studied.

The results of these studies were that either the exposure to ionising irradiation of the father [2,8–11,13,17,18] or the mother [12,18–20] caused RIGI in the next generation of individuals. Thus, GI can be induced throughout development and the effects of radiation exposure can be observed for long times after irradiation, including through pre- and post-natal development and into future generations of these animals [9,17,22]. In spite of these conclusions, the results of trans-generational studies in human populations, the majority of which are related to processes of cancer, seem to be inconclusive [2,3,15,16,18].

Multiple end points or final manifestations of GI have been measured to assess trans-generational RIGI, including genetic and cellular parameters such as chromosomal aberrations [8,10–12], synaptonemal complexes [6,7,23,24], ploidy changes, micronucleus formation, gene mutations and amplification, changes in the mutation rates [2], cellular transformation, clonal heterogeneity, apoptosis indices [11], DNA fragmentation [11], delayed reproductive cell death, tandem repeat instability [2,25], single nucleotide polymorphisms [13] and DNA methylation changes [26] in addition to histological, morphological and gestational parameters such as lifespan, mortality and fertility rates or tumoural incidence in the offspring [18,27–30].

As chromosomal breakage is an end point of GI [2,31], the term GI has also been known as chromosomal instability [1,31–37] in studies with cytogenetic markers, such as chromatid and chromosomal breaks, fragments, minutes, chromosomal bridges, chromosomal losses, intra- and inter-chromosomal reorganisations or unstable chromosomal aberrations [12,19,20,34,35,37–39].

The majority of the trans-generational, radiation-induced chromosomal instability studies have been performed in the male germ line [8,10,11], whereas the authors who have chosen females as a model are scarce [6,7,12,19,20]. All of these studies of trans-generational genotoxic effects of ionising radiation (X-ray) on the gonadal function of females using cytogenetic markers have concluded that, in the case of F<sub>1</sub> foetal oocytes, (i) there is an induction of apoptosis in the foetal rat germ cells [6], (ii) the rat oocytes remaining do not present either GI or any constitutional aberration [6,7] and (iii) there is an increase of chromosomal aberrations, chromosomal gains, mosaicism and constitutional chromosomal alterations among the offspring of female mice [19,20].

The aim of this work is to find out the radiation-induced effects in the foetal offspring (F<sub>1</sub>) of X-ray-treated female rats and, at the same time, the possible impact of these effects on the action of a chemical mutagen. In order to achieve both goals, the quantity and quality of the chromosomal damage were analysed.

**2. Materials and methods**

The diagram showing the experimental design (experiments A and B) is in Fig. 1.

*2.1. Foetuses, cell cultures and chromosomal preparations*

Experiment A was performed to find out if there was RIGI, and experiment B was developed in order to analyse the possible interaction of RIGI and a chemical mutagen (Fig. 1). A total of 17 *Rattus norvegicus* adult, female Sprague–Dawley

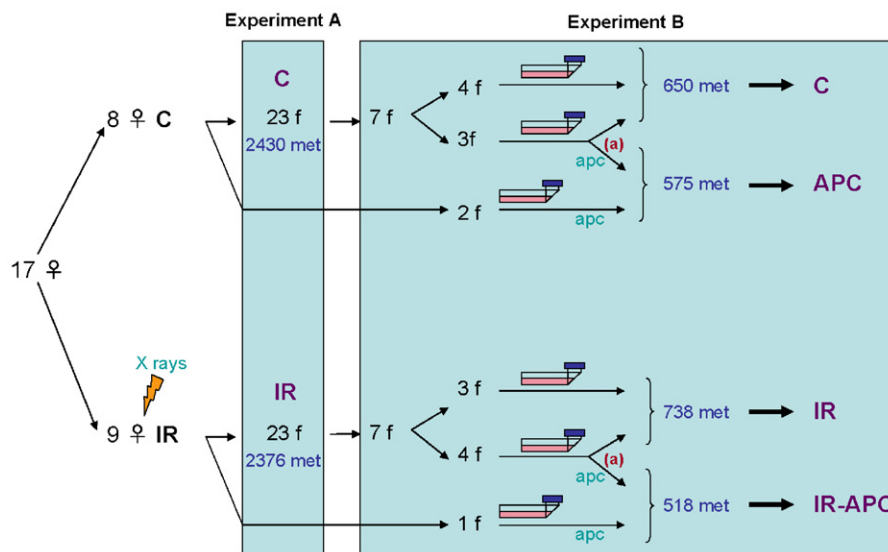


Fig. 1. Diagram displaying the experiments (A and B) performed in our study (Section 2). (♀) female rats (*R. norvegicus*), (f) foetuses, (met) metaphases analysed, (apc) aphidicolin, (C) control group, (APC) aphidicolin-treated group, (IR) X-ray-treated group, and (IR-APC) X-ray- and aphidicolin-treated group, and (a): the culture was divided into two: control and apc-treated groups.

rats was studied ( $2n = 42$ , Servicio de Animales de Laboratorio, Universidad de Murcia and Servei d'Estabulari, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain). From these rats, eight were used as controls and nine were irradiated with a single dose of 5 Gy, as explained in Section 2.1.1 (Fig. 1). After 45 days of irradiation, in order to study the effects of irradiation on the germ line cells on oocytes I (primordial follicles), the whole group of the females (treated and controls) were mated with males of known fertility for 2 weeks. After 14–16 days of pregnancy, they were sacrificed in order to obtain foetal tissues.

In experiment A (Fig. 1), 46 foetuses were studied (23 (control, C) from control females and 23 (X-ray-treated group, IR) from irradiated females) with a mean of three foetuses per rat. In experiment B (Fig. 1), 17 foetuses were analysed (9 from control females and 8 from irradiated females), with a mean of two foetuses per rat. Primary cultures of fibroblasts were established for each foetus. The primary fibroblasts were obtained from the whole foetuses. These primary cultures lasted from 4 to 7 days (short cultures) in order to obtain no differentiation into specific tissue cells and no genetic modification. A single passage was performed followed by the harvest of the cells the next day. Chromosomal preparations were obtained according to standard procedures. The rat ideogram and G-band nomenclature were established according to Levan [40] with a resolution of 238 bands per haploid genome. Roughly 100 cells per rat foetus were analysed.

### 2.1.1. Treatment with X-irradiation

Nine rats were irradiated at the abdominal region ( $5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ ), previously anaesthetised (Thalamonal, Roche;  $0.1\text{ cm}^3/100\text{ g}$ ), with a single dose of 5 Gy for 2.57 min (Servicio de Radiología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia)).

### 2.1.2. Chemical induction procedure

Cultures from 10 foetuses from 7 different mothers (5 from control females and 5 from irradiated females) were treated with aphidicolin (apc) (Fig. 1). For chemical induction, 24 h before harvest, apc ( $0.02\text{ mM}$ , dissolved in DMSO) was

added to culture flasks for a final concentration of  $0.2\text{ }\mu\text{M}$ . Untreated primary cultures were used as control and, finally, approximately 100 cells per rat foetus were analysed.

### 2.1.3. Cytogenetic analysis

The detection of breakpoints was performed by analysing metaphases by sequential staining: conventional staining (with Leishman's stain) for the detection of chromosomal reorganisations, followed by the sequential G-banding technique (with Wright's stain) for the precise localisation of breakpoints (Fig. 2). Metaphases were analysed with an Olympus AX70 optical microscope, and digital images were obtained using a coupled camera with CytoVision software (Applied Imaging, Inc.).

The parameters analysed were the number of aberrant metaphases, chromosomal breaks, chromosomal breakpoints and chromosomal bands involved. Breaks and breakpoints (only those breaks, included in the scored breaks, which could finally be localised in chromosomal bands) were those scored as aberrations themselves (gaps and breaks of chromatid and of chromosome) and also those involved in different chromosomal reorganisations: deletions, translocations, fusions, inversions, rings, dicentric and other inter-chromosomal reorganisations.

Afterwards, frequencies of all parameters were obtained to make a quantitative analysis of the damage: aberrant metaphases per total metaphases, chromosomal breaks per total and per aberrant metaphases and different, affected chromosomal bands per total metaphases and per aberrant metaphases. The coefficient of variation (CV) was also calculated.

Additionally, a qualitative analysis of the damage was conducted by the analysis of the scored chromosomal bands per group of treatment.

### 2.2. Statistical analysis

A Student's *t*-test (parametric test,  $p \leq 0.05$ ) was performed for the statistical analysis in both experiments. At the same time, a one-to-one analysis

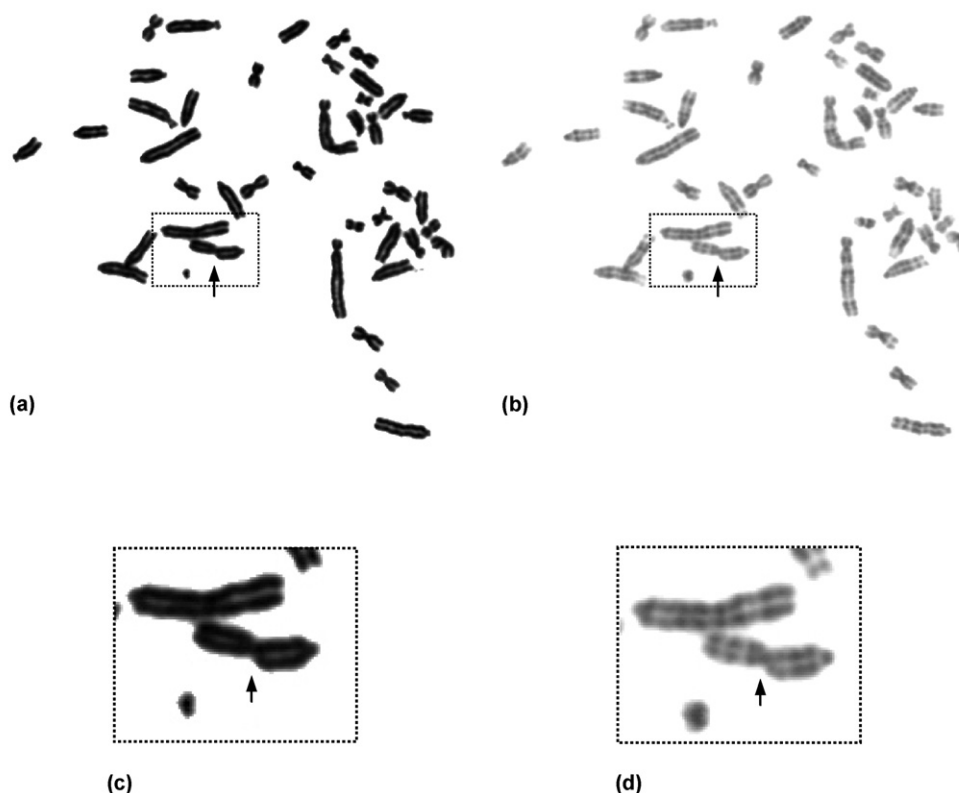


Fig. 2. Metaphase images showing the chromosomes of *R. norvegicus* in conventional staining (a and c) and in the sequential G-banding technique (b and d). In the partial metaphase images (c and d) arrows indicate a chromatid break in band 4q31.

was used in experiment B (Fig. 1), when comparing the different groups: (a) the control group (C) versus the apc-treated-group (APC), (b) APC versus the X-ray-treated group (IR), (c) IR versus X-ray- and apc-treated group (IR-APC) and (d) IR-APC versus APC. Additionally, the statistical analysis for the detection of the statistically significant chromosomal bands was performed by conducting the FSM programme (Version 995) [41]. The CV was calculated as a measure of dispersion of data and a nested ANOVA ( $p \leq 0.05$ ) to measure the contribution of some factors to variability was also performed.

### 3. Results

In order to determine the existence and, if there is one, the nature of a trans-generational, radiation-induced chromosomal instability, experiment A was performed (Figs. 1 and 3, Tables 1 and 2). The females were irradiated at the abdominal region (directly to the ovaries) at the adult stage. At this moment, theoretically, the ovaries were full of follicles in different stages (primordial, primary, secondary and Graaf). The long period of recovery permitted the absence of these treated, non-primordial follicles at mating, and at this moment the germ cells ready for fertilisation were the ones from those X-irradiated primordial follicles. Therefore, this experiment was conducted in a way (the moment of irradiation, the abdominal, irradiated region and the long period of recovery) which allowed for analysing the results of the X-irradiation in oocytes I in primordial follicles of the mothers and their consequences in the F<sub>1</sub>. After this, the F<sub>1</sub>

somatic cells were analysed to determine the hereditary X-ray effects on the maternal oocytes I.

#### 3.1. Is there a trans-generational, radiation-induced chromosomal instability?

In order to obtain evidence of RIGI in the foetal cells coming from X-irradiated female germ cells (oocytes I), experiment A was performed. A total of 4806 metaphases was analysed, 2376 belonged to IR, 272 of which were aberrant metaphases. In this treatment group, 429 breaks from different chromosomal reorganisations (gaps included) were detected by sequential G-banding methods, 245 of which were totally identified (break-points), and a total of 103 different chromosomal bands were involved in these breakpoints (Table 1 and Fig. 4).

When comparing C and IR, there is a trans-generational RIGI: statistically significant differences (Student's *t*-test,  $p \leq 0.05$ ) were found: (i) in the aberrant metaphases per total metaphases and (ii) in breaks per total metaphases (Table 1 and Fig. 3). Regarding the chromosomal bands involved, 72 different chromosomal bands were found to be implicated in C (11 of them were found to be statistically significant) and 103 were scored in IR (22 statistically significant) (Tables 1 and 2, and Fig. 4). From these results, there are eight coincident, statistically significant chromosomal bands for both groups: 1q22, 1q43, 3q12, 4q22, 5q36, 6q24, 7q34 and 8q24. Besides this, there are three statis-

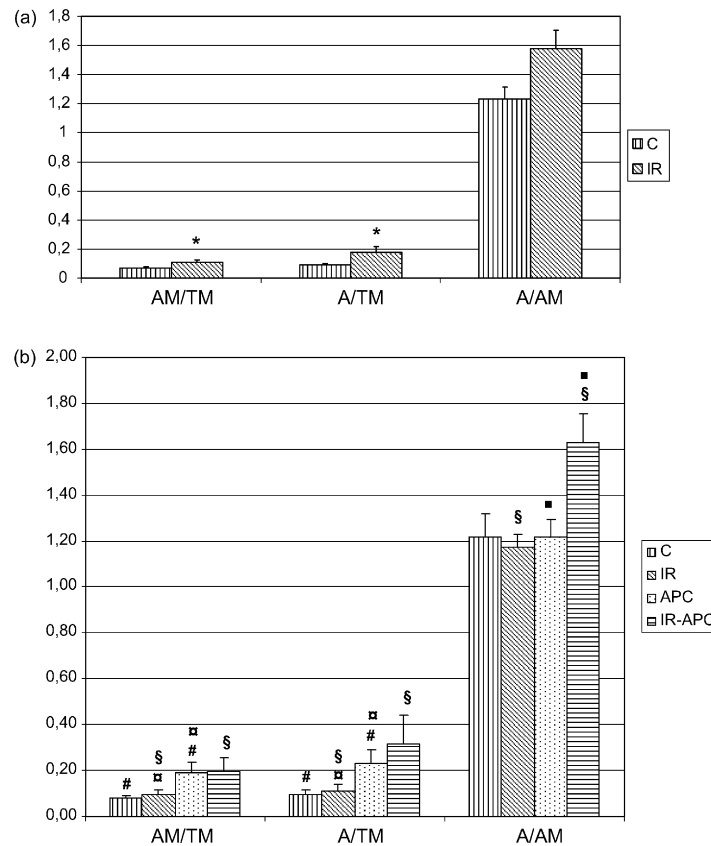


Fig. 3. Results obtained in experiments A and B. Graph (a) refers to experiment A and graph (b) refers to experiment B (AM/TM: aberrant metaphases per total metaphases; A/TM: breaks per total metaphases; A/AM: breaks per aberrant metaphases). There are statistically significant differences between C and IR (\*); C and APC (#); IR and APC (\$) ; IR and IR-APC (\$); APC and IR-APC (■).

Table 1  
Results obtained in experiment A

	C	IR	Totals
Total metaphases	2430	2376	4806
Aberrant metaphases	173	272	445
Breaks <sup>a</sup>	213	429	642
Breakpoints <sup>b</sup>	150	245	395
Bands	72	103	
Aberrant metaphase/total metaphases*	0.07 ± 0.007	0.11 ± 0.017	
Breaks/total metaphases*	0.09 ± 0.011	0.18 ± 0.036	
Breaks/aberrant metaphases	1.23 ± 0.083	1.58 ± 0.123	
Bands (≠)/total metaphases	0.03	0.04	
Bands (≠)/aberrant metaphases	0.42	0.38	
Coefficient of variation (%) <sup>c</sup>	63.81	98.28	

C: control group; IR: X-ray-treated group; (≠): meaning different bands; and values after ± denotes standard error.

<sup>a</sup> Scored as aberrations and also those involved in different intra- and inter-chromosomal reorganisations (including gaps).

<sup>b</sup> Breaks which could finally be localised in chromosomal bands.

<sup>c</sup> Regarding the scored chromosomal bands (≠) per individual within a treatment group.

\* Statistically significant differences with Student's *t*-test.

tically significant chromosomal bands present only in C (1q32, 1q52 and 12p11), in contrast to the 14 found in IR (2q24, 2q26, 2q34, 2q42, 3p12, 3q36, 3q42, 4q24, 4q34, 7q13, 7q22, 10q32, 11q22 and 19q12) (Table 2).

Table 2  
Chromosomal bands found to be statistically significant in both experiments

Bands <sup>a</sup>	C	IR	APC	IR-APC
1q22	1q22	1q22	1q22	
1q32	1q32			
1q43	1q43	1q43		1q43
1q52	1q52		1q52	
2q24		2q24	2q24	2q24
2q26		2q26		
2q34		2q34		
2q42		2q42		
3p12		3p12		
3q12	3q12	3q12	3q12	3q12
3q36		3q36	3q36	
3q42		3q42		
4q22	4q22	4q22	4q22	
4q24		4q24	4q24	
4q31			4q31	
4q34		4q34		
5q36	5q36	5q36	5q36	
6q24	6q24	6q24	6q24	
7q13		7q13	7q13	
7q22		7q22		
7q34	7q34	7q34	7q34	
8q24	8q24	8q24		8q24
10q32		10q32		
11q22		11q22	11q22	
12p11	12p11			
14q21		14q21		
15q21			15q21	
18q12			18q12	
19q12		19q12		
Xq21			Xq21	Xq21
Xq22			Xq22	
31	11	23	17	5

C: control group; IR: X-ray-treated group; APC: aphidicolin-treated group; IR-APC: X-ray and aphidicolin-treated group.

<sup>a</sup> Statistically significant chromosomal bands found by the Chi-square test performed by the FSM programme (Version 995).

### 3.2. Does RIGI influence the chromosomal behaviour of the foetal *F*<sub>1</sub> cells in front of *apc*?

In order to find out how trans-generational RIGI could influence the chromosomal behaviour of IR in front of the addition of a chemical agent (*apc*), experiment B was performed (Fig. 1). Four different groups of fetuses were analysed: three different controls (C, IR and APC) versus IR-APC (Fig. 1). A total of 2481 metaphases were analysed, with 330 of them being found to be aberrant. The obtained results are scored in Tables 2 and 3 and Figs. 3, 5 and 6.

In IR, 738 metaphases were analysed, 69 of them being aberrant. A total of 81 breaks from different chromosomal reorganisations (gaps included) was detected by sequential G-banding methods (50 breakpoints) and located in 40 different chromosomal bands (Table 3 and Fig. 6). Regarding APC, 110 aberrant metaphases from a total of 575 metaphases, and also 134 breaks (104 breakpoints) in 75 different chromosomal bands (Table 3 and Fig. 5) were detected. Finally, 100 out of 518 were found to be aberrant in IR-APC, resulting in 163 breaks (148 breakpoints) in 87 different chromosomal bands (Table 3 and Fig. 6).

When the one-to-one statistical analysis (Student's *t*-test,  $p \leq 0.05$ ) was conducted, there were statistically significant differences in the frequencies of chromosomal breaks and in the relative frequency of aberrant metaphases in: (a) APC versus C and (b) APC versus IR (Table 3 and Fig. 3). In relation to the Student's *t*-test analysis of IR and IR-APC, statistically significant differences between both groups were established in all parameters analysed. Finally, concerning the APC versus IR-APC analysis, a statistically significant increase is shown in the frequency of chromosomal breaks per aberrant metaphase (Table 3 and Fig. 3). Therefore, trans-generational RIGI enhances the effects of a chemical mutagen (*apc*).

Regarding the chromosomal bands involved (Table 2), 39 different chromosomal bands were found in C, 40 in IR, 75 in APC and 87 in IR-APC (Table 3). From these bands, 21 of them were found to be statistically significant: one chromoso-



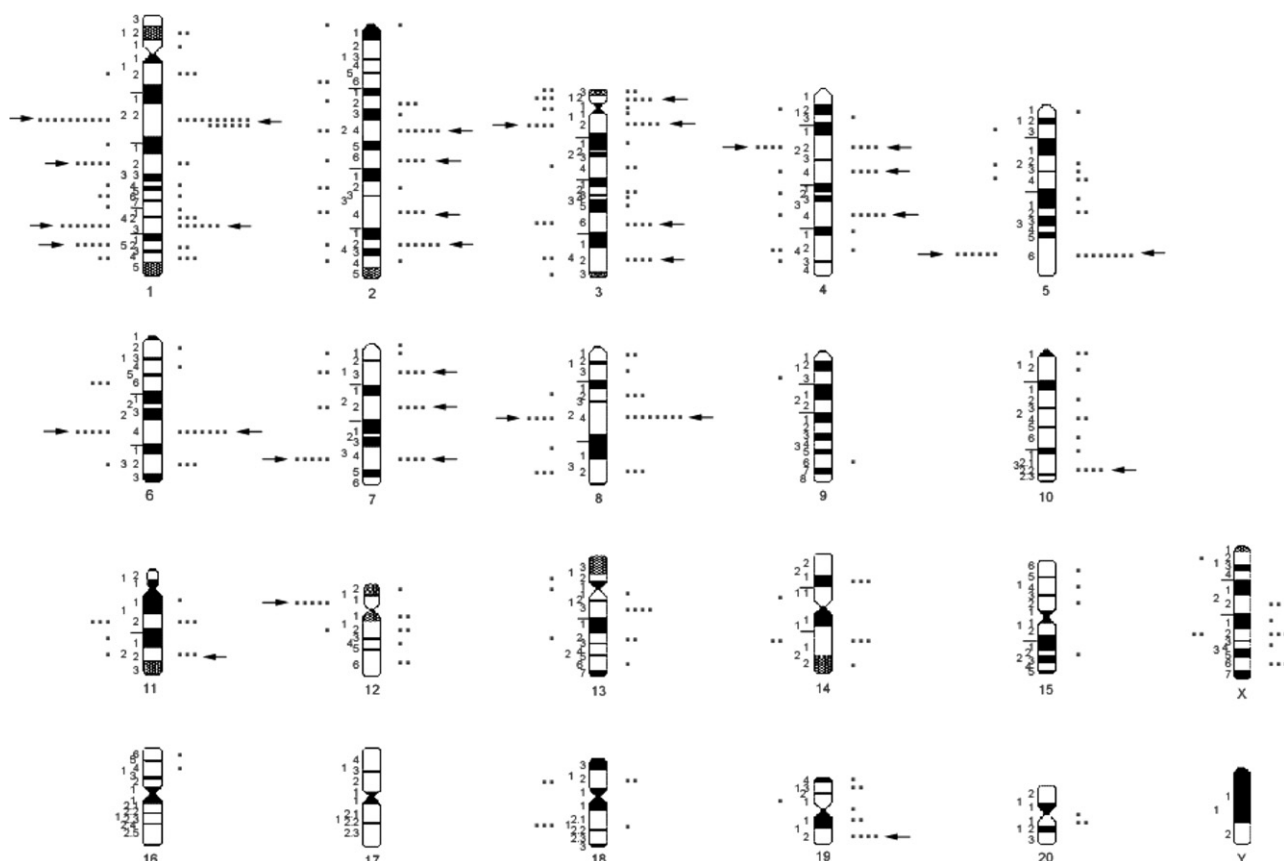


Fig. 4. Ideogram of *R. norvegicus* chromosomes exhibiting the breakpoints (dots) and statistically significant chromosomal bands scored (arrows) in experiment A. The data corresponding to C (control group) are shown on the left whereas those from IR (X-ray- treated group) are shown on the right side of the chromosomes.

mal band in C (Table 2 and Fig. 5), 17 chromosomal bands in APC (Table 2 and Fig. 5), two chromosomal bands in IR (Table 2 and Fig. 6) and, finally, five chromosomal bands in IR-APC (Table 2 and Fig. 6). Despite the variation of the different

chromosomal bands found in the different groups, some of them are coincidental: 1q22 in C and APC and 2q24, 3q12 and Xq21 for APC and IR-APC, but none of them coincided in the four groups (Table 2).

Table 3  
Results obtained in experiment B

	C	IR	APC	IR-APC	Totals
Total metaphases	650	738	575	518	2481
Aberrant metaphases	51	69	110	100	330
Breaks <sup>a</sup>	62	81	134	163	440
Breakpoints <sup>b</sup>	51	50	104	148	353
Bands	39	40	75	87	
Aberrant metaphase/total metaphases	0.078 ± 0.011 <sup>c</sup>	0.093 ± 0.024 <sup>d,e</sup>	0.191 ± 0.045 <sup>c,d</sup>	0.193 ± 0.061 <sup>e</sup>	
Breaks/total metaphases	0.095 ± 0.021 <sup>c</sup>	0.110 ± 0.029 <sup>d,e</sup>	0.233 ± 0.057 <sup>c,d</sup>	0.315 ± 0.124 <sup>e</sup>	
Breaks/aberrant metaphases	1.216 ± 0.103	1.174 ± 0.055 <sup>e</sup>	1.218 ± 0.073 <sup>f</sup>	1.630 ± 0.126 <sup>e,f</sup>	
Bands (≠)/total metaphases	0.060	0.054	0.130	0.224	
Bands (≠)/aberrant metaphases	0.765	0.580	0.682	1.160	
Coefficient of variation (%) <sup>g</sup>	35.155	97.934	41.821	79.327	

C: control group; IR: X-ray-treated group; APC: aphidicolin-treated group; IR-APC: X-ray and aphidicolin-treated group; (≠): meaning different chromosomal bands; and values after ± denotes standard error.

<sup>a</sup> Scored as aberrations and also those involved in different intra- and inter-chromosomal reorganisations (including gaps).

<sup>b</sup> Breaks which could finally be localised in chromosomal bands.

<sup>c</sup> Statistically significant differences between C and APC ( $p \leq 0.05$ ).

<sup>d</sup> Statistically significant differences between IR and APC ( $p \leq 0.05$ ).

<sup>e</sup> Statistically significant differences between IR and IR-APC ( $p \leq 0.05$ ).

<sup>f</sup> Statistically significant differences between APC and IR-APC ( $p \leq 0.05$ ).

<sup>g</sup> Regarding the scored chromosomal bands (≠) per individual within a treatment group.

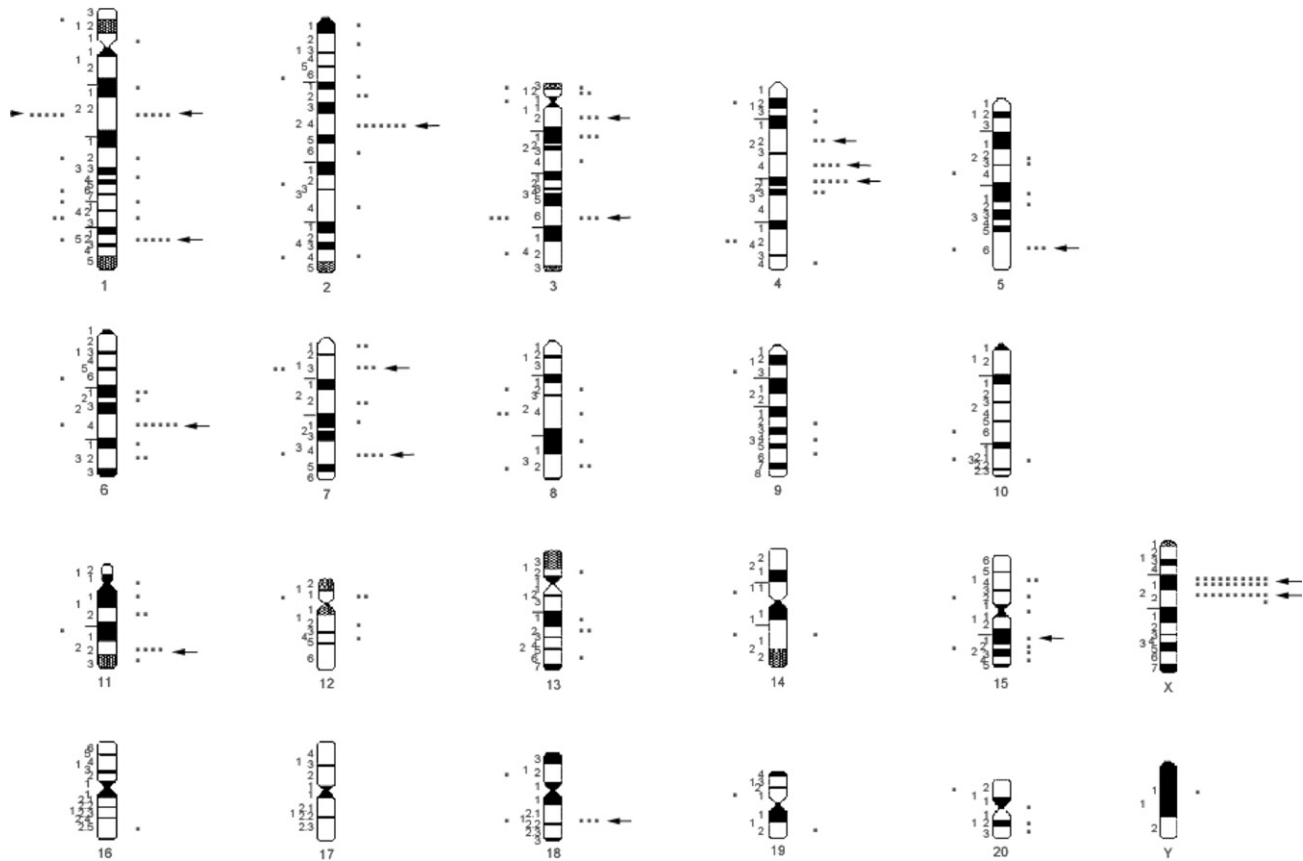


Fig. 5. Ideogram of *R. norvegicus* chromosomes exhibiting the breakpoints (dots) and statistically significant chromosomal bands (arrows) in experiment B. The data corresponding to C are shown on the left whereas those from APC are shown on the right side of the chromosomes.

#### 4. Discussion

‘Are there any trans-generational effects in the offspring of irradiated oocytes I in primordial follicles?’ ‘Does RIGI cause any modulation in the effects of an added chemical mutagen (apc)?’ This is the first cytogenetic experimental work that has been able to unmistakably answer these questions. The trans-generational RIGI in the foetal offspring of X-ray-treated female rats has been proved and it has been shown that this genomic instability increases apc–cytogenetic effects.

##### 4.1. Control cells show a spontaneous chromosomal instability

The C-obtained results indicate the existence of a spontaneous chromosomal breakage (9–9.5%, Tables 1 and 3) and of aberrant metaphases (7–7.8%, Tables 1 and 3), as has previously been described in rat foetal fibroblasts [12] and in human foetal amniocytes [42]. In this sense, data from mouse adult cells (bone marrow [8] and hepatocytes [10,11]) and primate lymphocytes (*Macaca fascicularis*, *Mandrillus sphinx*, *Cebus nigrivittatus*, *Cebus apella* and *Erythrocebus patas* [43–45]) show a spontaneous breakage frequency that in the case of primates ranges from 1 to 11%, demonstrating a high variability within species and among individuals. Therefore, the spontaneous chromoso-

mal breakage cannot be associated with either cell type, species or foetal or adult origin.

Taking into consideration the existence of statistically significant chromosomal bands involved in these spontaneous breakages (Table 2, Figs. 4 and 5), we dare to conclude that there are ‘hot points’ intrinsic to the nature of the rat genome itself. At the same time, it is important to note that 81.82% of these chromosomal bands are also implicated in the effects of physical or chemical mutagens.

##### 4.2. Variability in foetal rat cells is seen

A clear inter-individual variability is seen if we take into account not only our quantitative results scored for the different foetuses per group individually (data not shown), but also for chromosomal bands analysis. Furthermore, previous data in rat [12], mouse models and human species with other cells types and parameters [8,10,49,50] show this heterogeneity.

CV measures the dispersion in relation to the mean value of the scored data in a group, and therefore is useful to give a qualitative idea of variability. Regarding the scored chromosomal bands per individual within a treatment group (Tables 1 and 3), the CV indicates the existence of different degrees of variability within the individuals of the four groups.

The group with the highest CV, with respect to the mean number of different chromosomal bands involved, is the X-



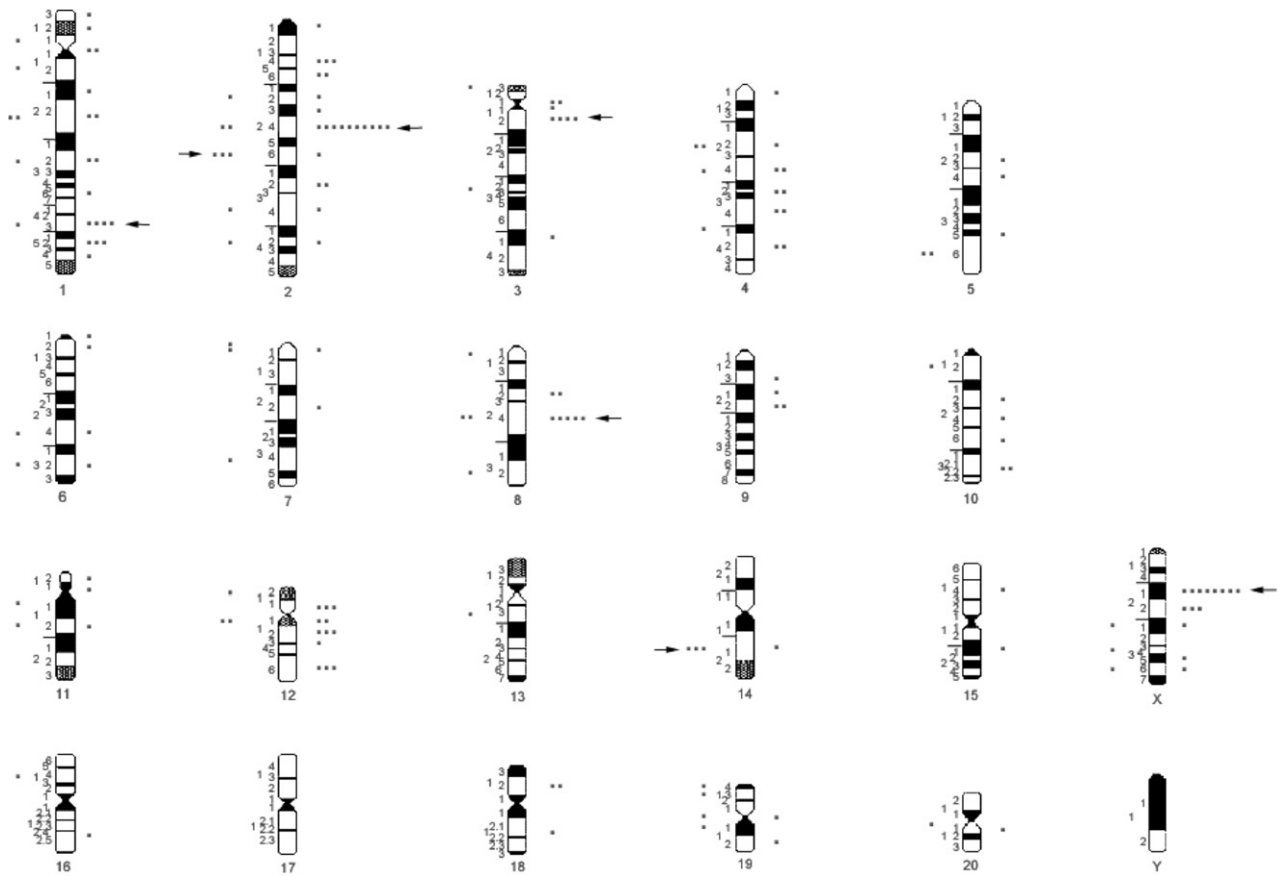


Fig. 6. Ideogram of *R. norvegicus* chromosomes exhibiting the breakpoints (dots) and statistically significant chromosomal bands (arrows) in experiment B. The data corresponding to IR are shown on the left whereas those from IR-APC are shown on the right side of the chromosomes.

ray-treated group (IR, 97–98%) followed by IR-APC (79%) (Tables 1 and 3), indicating the existence of great variability within the individuals belonging to these two groups and, perhaps, signalling that X-irradiation might increase the variability of response of individuals (in fact, it is an indirect effect). In contrast to that, C (35–63%) and APC (41%) indicate only certain variability within the individuals inside these groups (Tables 1 and 3). In this case, when there is a direct addition of the chemical mutagen *apc* to the cultures, the response of the cells (breakpoints) is so enhanced that it is similar in all individuals of the group. When there is trans-generational chromosomal instability and *apc*-treatment in these cells (IR-APC), the response also remains as deleterious as in APC, but more heterogeneous (as in IR).

In order to analyse the possible origin of this intra-group variability, a statistical analysis was performed in the five parameters (breaks per total and per aberrant metaphases, chromosomal bands per total and aberrant metaphases, and aberrant metaphases per total metaphases, data not shown). This analysis revealed that mothers contribute to the intra-group variability in both experiments (experiment A:  $p < 0.001$ ,  $F = 8.045$ ; experiment B:  $p = 0.002$ ,  $F = 9.433$ ) and that treatment also plays a role in this intra-group variability in the case of experiment B ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.3. There is a radiation-induced chromosomal instability in the offspring of X-irradiated females

The cytogenetic analysis of the  $F_1$  foetal somatic cells indicates trans-generational chromosomal instability: a statistically significant increase of the frequency of chromosomal breaks (x2) and aberrant metaphases (x1.6) has been observed (Table 1 and Fig. 3) in agreement with Tease and Fisher [19,20] and Camats et al. [12]. These results would be in apparent contradiction to Martínez-Flores et al. [6] who, when studying  $F_1$  foetal germ cells from prepubertal and adult-irradiated mothers by synaptonemal complexes, did not observe this phenomenon. In our opinion, the main reason for this disagreement might be the different parameters used in both studies. What is stated above would suggest that the use of chromosomal parameters, and not that of synaptonemal complexes, is more efficient when the goal is the analysis of germ cell genomic instability.

At the same time, the  $F_1$  of our study does not show any constitutional aberration, agreeing with the results by Martínez-Flores et al. [6,7]. However, both RIGI and constitutional structural chromosomal aberrations in the descending somatic cells were found by Tease and Fisher [19,20] when X-irradiated germ cells stayed at the pre-ovulatory oocytes I stage. All of

these different, obtained effects seem to indicate the importance of bearing in mind the oocyte meiosis stage when evaluating genotoxic effects.

Our results in females are in the same line as of previously published data from different trans-generational studies in the male rat [8,10,11] and male mouse [2,9,13,17,25,46,47] with carcinogenic, cytogenetic and molecular parameters.

#### 4.4. Trans-generational RIGI increases the effects of chemical mutagens

In order to know whether the trans-generational RIGI situation can modify the ‘intensity’ of the effects originated by a chemical mutagen (apc), experiment B was performed (Figs. 1, 3, 5 and 6, Tables 2 and 3). For the first time in females, the interaction between trans-generational RIGI and the apc-produced cytogenetic damage has been proved.

In our opinion, the direct apc approach justifies the greater cytogenetic damage (frequencies of chromosomal breaks and aberrant metaphases; statistically significant using Student’s *t*-test,  $p \leq 0.05$ ) produced by the chemical agent in relation to the trans-generational (indirect) effects of the treatment with X-rays (the observed results are two- and threefold greater than the ones observed in IR and C, respectively) (Table 3 and Fig. 3). The statistically significant differences (frequencies of aberrant metaphases, chromosomal breaks per total metaphases and chromosomal breaks per aberrant metaphases; Student’s *t*-test,  $p \leq 0.05$ ) between IR and IR-APC would follow the same line (Table 3 and Fig. 3).

In spite of the statements above, the direct, apc–cytogenetic effects (APC) are lower than the observed genotoxic damage in IR-APC. The results obtained in this latest group enable us to see a tendency of increasing chromosomal alterations (Table 3 and Fig. 3). In this sense, it is important to note that the chromosomal breaks per aberrant metaphases in IR-APC have significant differences *versus* APC and this would mean that, in fact, trans-generational RIGI enhances apc effects.

This increased cytogenetic damage observed is in agreement with the results in female mice in a similar experiment with carcinogenic parameters (tumoural incidence) [30] and with other studies in male rats and mice with other cytogenetic (chromosomal bridges and fragments [8]) and carcinogenic parameters [28,48].

For the study of the chromosomal bands involved, another approach was performed using other parameters: the different, affected chromosomal bands per total metaphases and per aberrant metaphases (Tables 1 and 3). These frequencies of chromosomal bands (per total or aberrant metaphases) refer to the number of different, damaged chromosomal bands of the rat karyotype in each treatment group. With respect to total metaphases (chromosomal bands per total metaphases), they are used to compare the treatment groups in terms of the spreading of the damage and, with respect to aberrant metaphases (chromosomal bands per aberrant metaphases), they detect the damage inside the aberrant cells while also comparing the different treatment groups.

When comparing the different, affected chromosomal bands per total metaphases, the different bands per metaphase in IR are very similar to those of C in both experiments (Tables 1 and 3). Furthermore, there is a great increase of IR-APC (x4) in relation to IR (Table 3) and also a great increase of the different chromosomal bands in IR-APC (x2) in relation to APC (Table 3). Moreover, taking into consideration the different chromosomal bands per aberrant metaphases (Tables 1 and 3), the IR-APC value doubles in relation to IR and APC (Table 3).

All of these data would mean an evident enhancement of damage in terms of number of different chromosomal bands involved in the double-treated group (IR-APC) when relating it to the other groups (APC and IR), following the tendency of the previously mentioned quantitative parameters.

#### 4.5. About the breakpoints: target and spontaneous chromosomal bands

The qualitative analysis results follow the same line as the above-commented quantitative results. In this case, there are many more different chromosomal bands related to direct apc-treatment than to the X-ray-affected ones (trans-generational effect) within a similar number of samples (Table 2, Figs. 4–6).

From both experiments, our results show the existence of a large amount of breakpoints and many chromosomes involved in the mutagenic effects, and that the breakpoints distribution along the karyotype and in the involved chromosomes is not at random (Tables 1 and 3, and Figs. 3–6) in agreement with previous data [12].

The 3q12 chromosomal band is the only one coincident in the four treatment groups, whereas there are eight coincidental bands among three of them (Table 2 and Figs. 4–6). This chromosomal band (3q12) is a fragile site in *R. norvegicus* (unpublished data) and corresponds to the human chromosomal region 2q22.3–2q32.1, which is also considered a fragile site in human species.

There is foetal rat genomic instability by itself: there are two chromosomal bands (1q32 and 12p11) only present in C. These bands could be considered to be fragile bands by themselves, not affected by physical or chemical mutagens.

There are ten chromosomal bands only present in IR and five only present in APC (Table 2). This seems to indicate that there are target chromosomal bands specific for chromosomal instability by X-rays or by the apc-treatment.

Additionally, there are some bands that break spontaneously (observed in C), but these can also be observed in IR or APC treatments (Table 2). They would be fragile bands by themselves that could be related to physical or chemical genotoxic treatments.

Furthermore, all chromosomal bands in IR-APC are also present in IR and/or APC, confirming that there are fragile bands which are mutagen-related.

All of these chromosomal bands above could be globally considered to be more often involved in chromosomal breakage (Table 2) and we could consider them ‘hot spots’ of rat chromosomes in front of (or not) physical and/or chemical agents.

In conclusion, in this work is demonstrated, for the first time: (i) the existence of trans-generational RIGI in the F<sub>1</sub> foetal cells of female rats; (ii) this trans-generational RIGI, caused by the X-irradiated maternal oocytes I, enhances the action of the chemical mutagen apc; (iii) the genotoxic effects show a high inter-individual variability and, (iv) the only chromosomal band present in the four treatment groups, 3q12, is considered to be a fragile site in *R. norvegicus* which is conserved in human species.

## Acknowledgements

We wish to thank the Servicio de Ginecología y Obstetricia and the Servicio de Radioterapia of the Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Spain), the Servicio de Cultivo de Tejidos and the Servicio de Animales de Laboratorio of the Universidad de Murcia (Spain) and the Servei de Cultius Celulars (IBB) of the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain) for their collaboration in this project. Financial support was received from FIS (Exp. 99/09900), from Ipsen Pharma Laboratories and grants from the Servicio de Ginecología y Obstetricia of the Hospital Virgen de la Arrixaca (Murcia, Spain). The English of this manuscript has been corrected by a native English-speaking instructor of English of this University.

## References

- [1] B.A. Marder, W.F. Morgan, Delayed chromosomal instability induced by DNA damage, *Mol. Cell Biol.* 13 (1993) 6667–6677.
- [2] R.C. Barber, Y.E. Dubrova, The offspring of irradiated parents, are they stable? *Mutat. Res.* 598 (2006) 50–60.
- [3] W.F. Morgan, Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other nontargeted effects of exposure to ionising radiation? *Oncogene* 22 (2003) 7094–7099.
- [4] T. Kanao, T. Okamoto, Y. Miyachi, N. Nohara, Parental exposure to low-dose X-rays in *Drosophila melanogaster* induces early emergence in offspring, which can be modulated by transplantation of polar cytoplasm, *Mutat. Res.* 527 (2003) 1–6.
- [5] A. Shimada, A. Shima, Trans-generational genomic instability as revealed by a somatic mutation assay using the medaka fish, *Mutat. Res.* 552 (2004) 119–124.
- [6] I. Martinez-Flores, J. Egozcue, M. Garcia, Effects on female fertility and germinal cells in prepubertal and adult rats (*Rattus norvegicus*) after X-ray irradiation, *Adv. Exp. Med. Biol.* 444 (1998) 215–219.
- [7] I. Martinez-Flores, C. Saez, J. Egozcue, M. Garcia, Effects of ionising radiation on oocytes of prepubertally irradiated rats, *Int. J. Radiat. Biol.* 76 (2000) 1403–1407.
- [8] I.E. Vorobtsova, Irradiation of male rats increases the chromosomal sensitivity of progeny to genotoxic agents, *Mutagenesis* 15 (2000) 33–38.
- [9] R. Barber, M.A. Plumb, E. Boulton, I. Roux, Y.E. Dubrova, 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 (2002) 6877–6882.
- [10] K. Kropacova, L. Slovinska, E. Misurova, Cytogenetic changes in the liver of progeny of irradiated male rats, *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 43 (2002) 125–133.
- [11] L. Slovinska, A. Elbertova, E. Misurova, Transmission of genome damage from irradiated male rats to their progeny, *Mutat. Res.* 559 (2004) 29–37.
- [12] N. Camats, A. Ruiz-Herrera, J.J. Parrilla, M. Acien, P.Payá Giulotto, J. Egozcue, F. Garcia, M. Garcia, Genomic instability in rat: breakpoints induced by ionising radiation and interstitial telomeric-like sequences, *Mutat. Res.* 595 (2006) 156–166.
- [13] J. Wu, M. Morimyo, E. Hongo, T. Higashi, M. Okamoto, A. Kawano, Y. Ohmachi, Radiation-induced germ line mutations detected by a direct comparison of parents and first-generation offspring DNA sequences containing SNPs, *Mutat. Res.* 596 (2006) 1–11.
- [14] J. Byrne, S.A. Rasmussen, S.C. Steinhorn, R.R. Connelly, M.H. Myers, C.F. Lynch, J. Flannery, D.F. Austin, F.F. Holmes, G.E. Holmes, L.C. Strong, J.J. Mulvihill, Genetic disease in offspring of long-term survivors of childhood and adolescent cancer, *Am. J. Hum. Genet.* 62 (1998) 45–52.
- [15] H.O. Dickinson, L. Parker, Leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in children of male Sellafield radiation workers, *Int. J. Cancer* 99 (2002) 437–444.
- [16] Y.E. Dubrova, Long-term genetic effects of radiation exposure, *Mutat. Res.* 544 (2003) 433–439.
- [17] Y.E. Dubrova, M.A. Plumb, Ionising radiation and mutation induction at mouse minisatellite loci. The story of the two generations, *Mutat. Res.* 499 (2002) 143–150.
- [18] T. Nomura, Trans-generational effects of radiation and chemicals in mice and humans, *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 47 (Suppl. B) (2006) B83–B97.
- [19] C. Tease, G. Fisher, Cytogenetic and genetic studies of radiation-induced chromosome damage in mouse oocytes. I. Numerical and structural chromosome anomalies in metaphase II oocytes, pre- and post-implantation embryos, *Mutat. Res.* 349 (1996) 145–153.
- [20] C. Tease, G. Fisher, Cytogenetic and genetic studies of radiation-induced chromosome damage in mouse oocytes. II. Induced chromosome loss and dominant visible mutations, *Mutat. Res.* 349 (1996) 155–162.
- [21] R.C. Barber, P. Hickenbotham, T. Hatch, D. Kelly, N. Topchiy, G.M. Almeida, G.D. Jones, G.E. Johnson, J.M. Parry, K. Rothkamm, Y.E. Dubrova, Radiation-induced trans-generational alterations in genome stability and DNA damage, *Oncogene* 25 (2006) 7336–7342.
- [22] Y.E. Dubrova, Radiation-induced trans-generational instability, *Oncogene* 22 (2003) 7087–7093.
- [23] R. Pujol, L. Cusido, A. Rubio, J. Egozcue, M. Garcia, Effect of X-rays on germ cells in female fetuses of *Rattus norvegicus* irradiated at three different times of gestation, *Mutat. Res.* 356 (1996) 247–253.
- [24] R. Pujol, L. Cusido, A. Rubio, J. Egozcue, M. Garcia, X-ray-induced synaptonemal complex damage during meiotic prophase in female fetuses of *Rattus norvegicus*, *Mutat. Res.* 379 (1997) 127–134.
- [25] O. Niwa, Indirect mechanisms of genomic instability and the biological significance of mutations at tandem repeat loci, *Mutat. Res.* 598 (2006) 61–72.
- [26] I. Pogribny, J. Raiche, M. Slovack, O. Kovalchuk, Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320 (2004) 1253–1261.
- [27] M.F. Lyon, R. Renshaw, Induction of congenital malformation in mice by parental irradiation: transmission to later generations, *Mutat. Res.* 198 (1988) 277–283.
- [28] U. Mohr, C. Dasenbrock, T. Tillmann, M. Kohler, K. Kamino, G. Hagemann, G. Morawietz, E. Campo, M. Cazorla, P. Fernandez, L. Hernandez, A. Cardesa, L. Tomatis, Possible carcinogenic effects of X-rays in a trans-generational study with CBA mice, *Carcinogenesis* 20 (1999) 325–332.
- [29] T. Nomura, Trans-generational carcinogenesis: induction and transmission of genetic alterations and mechanisms of carcinogenesis, *Mutat. Res.* 544 (2003) 425–432.
- [30] C. Dasenbrock, T. Tillmann, H. Ernst, W. Behnke, R. Kellner, G. Hagemann, V. Kaefer, M. Kohler, S. Rittinghausen, U. Mohr, L. Tomatis, Maternal effects and cancer risk in the progeny of mice exposed to X-rays before conception, *Exp. Toxicol. Pathol.* 56 (2005) 351–360.
- [31] C.L. Limoli, M.I. Kaplan, J. Corcoran, M. Meyers, D.A. Boothman, W.F. Morgan, Chromosomal instability and its relationship to other end points of genomic instability, *Cancer Res.* 57 (1997) 5557–5563.
- [32] M. Durante, G.F. Grossi, T.C. Yang, Radiation-induced chromosomal instability in human mammary epithelial cells, *Adv. Space Res.* 18 (1996) 99–108.
- [33] M.A. Kadhim, E.G. Wright, Radiation-induced transmissible (sic) chromosomal instability in haemopoietic stem cells, *Adv. Space Res.* 22 (1998) 587–596.

- [34] W.F. Morgan, J. Corcoran, A. Hartmann, M.I. Kaplan, C.L. Limoli, B. Ponnaiya, DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability, *Mutat. Res.* 404 (1998) 125–128.
- [35] C. Mothersill, M.A. Kadhim, S. O'Reilly, D. Papworth, S.J. Marsden, C.B. Seymour, E.G. Wright, Dose- and time-response relationships for lethal mutations and chromosomal instability induced by ionising radiation in an immortalized human keratinocyte cell line, *Int. J. Radiat. Biol.* 76 (2000) 799–806.
- [36] C.L. Limoli, M.I. Kaplan, E. Giedzinski, W.F. Morgan, Attenuation of radiation-induced genomic instability by free radical scavengers and cellular proliferation, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 10–19.
- [37] P.U. Devi, M. Satyamitra, Tracing radiation-induced genomic instability *in vivo* in the haemopoietic cells from foetus to adult mouse, *Br. J. Radiol.* 78 (2005) 928–933.
- [38] M.S. Kovacs, J.W. Evans, I.M. Johnstone, J.M. Brown, Radiation-induced damage, repair and exchange formation in different chromosomes of human fibroblasts determined by fluorescence *in situ* hybridization, *Radiat. Res.* 137 (1994) 34–43.
- [39] A.P. Krishnaja, N.K. Sharma, Differential radiation effects in smokers—culture time dependence of the yield of gamma ray-induced chromosome damage in first division metaphases, *Int. J. Radiat. Biol.* 82 (2006) 363–377.
- [40] G. Levan, Nomenclature for G-bands in rat chromosomes, *Hereditas* 77 (1974) 37–52.
- [41] U. Böhm, P.F. Dahm, B.F. McAllister, I.F. Greenbaum, Identifying chromosomal fragile sites from individuals: a multinomial statistical model, *Hum. Genet.* 95 (1995) 249–256.
- [42] R.A. de la Chica, I. Ribas, J. Giraldo, J. Egozcue, C. Fuster, Chromosomal instability in amniocytes from fetuses of mothers who smoke, *JAMA* 293 (2005) 1212–1222.
- [43] A. Ruiz-Herrera, M. Ponsa, F. Garcia, J. Egozcue, M. Garcia, Fragile sites in human and *Macaca fascicularis* chromosomes are breakpoints in chromosome evolution, *Chromosome Res.* 10 (2002) 33–44.
- [44] A. Ruiz-Herrera, F. Garcia, E. Giulotto, C. Attolini, J. Egozcue, M. Ponsa, M. Garcia, Evolutionary breakpoints are co-localised with fragile sites and intra-chromosomal telomeric sequences in primates, *Cytogenet. Genome Res.* 108 (2005) 234–247.
- [45] A. Borrell, M. Ponsa, J. Egozcue, A. Rubio, M. Garcia, Chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes from *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini) after X-ray irradiation, *Mutat. Res.* 401 (1998) 65–76.
- [46] O. Niwa, Induced genomic instability in irradiated germ cells and in the offspring; reconciling discrepancies among the human and animal studies, *Oncogene* 22 (2003) 7078–7086.
- [47] K. Shiraishi, T. Shimura, M. Taga, N. Uematsu, Y. Gondo, M. Ohtaki, R. Kominami, O. Niwa, Persistent induction of somatic reversions of the pink-eyed unstable mutation in F<sub>1</sub> mice born to fathers irradiated at the spermatozoa stage, *Radiat. Res.* 157 (2002) 661–667.
- [48] I.E. Vorobtsova, L.M. Aliyakparova, V.N. Anisimov, Promotion of skin tumours by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two generations of descendants of male mice exposed to X-ray irradiation, *Mutat. Res.* 287 (1993) 207–216.
- [49] S.A. Lorimore, P.J. Coates, E.G. Wright, Radiation-induced genomic instability and bystander effects: inter-related nontargeted effects of exposure to ionising radiation, *Oncogene* 22 (2003) 7058–7069.
- [50] M.A. Kadhim, Role of genetic background in induced instability, *Oncogene* 22 (2003) 6994–6999.



### **4.3. Treball III**



**The GnRH analogue triptorelin confers ovarian radio-protection to  
adult female rats**

**Núria Camats**, Francisca García, Juan José Parrilla, Joaquim Calaf,  
Miguel Martín-Mateo, Montserrat Garcia Caldés

*Mutation Research (2009)(Accepted)*

Índex d'Impacte (2007): 4,159

1r quartil (2007). Categoria *Toxicology* (posició 4/73)

1r quartil (2007). Categoria *Biotechnology & Applied microbiology* (posició 22/138)





**The GnRH analogue triptorelin confers ovarian  
radio-protection to adult female rats**

**N. Camats<sup>a,b</sup>, F. García<sup>a</sup>, J.J. Parrilla<sup>c</sup>, J. Calaf<sup>d</sup>, M. Martín-Mateo<sup>e</sup>, M. Garcia Caldes<sup>a,b,\*</sup>**

<sup>a</sup> Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (I.B.B.), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Servicio de Ginecología y Obstetricia, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, 30120 El Palmar, Murcia, Spain

<sup>d</sup> Servei de Ginecologia i Obstetrícia, Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Departament de Pediatria, d'Obstetrícia i Ginecologia i de Medicina Preventiva, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain

\* Corresponding author at: Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 5811905; fax: +34 93 5811025.

*E-mail address:* Montserrat.Garcia.Caldes@uab.es

**ABSTRACT**

There is a controversy regarding the effects of the analogues of the gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in radiotherapy. This has led us to study the possible radio-protection of the ovarian function of a GnRH analogue, the agonist triptorelin, in adult, female rats (*Rattus norvegicus sp.*).

The effects of the X-irradiation on the oocytes of ovarian primordial follicles, with and without GnRHa treatment, were compared, directly in the female rats (F<sub>0</sub>) with reproductive parameters, and in the somatic cells of the resulting foetuses (F<sub>1</sub>) with cytogenetical parameters. In order to do this, the ovaries and uteri from 82 females were extracted for the reproductive analysis and 236 foetuses were obtained for cytogenetical analysis.

The cytogenetical study was based on the data from 22,151 metaphases analysed. The cytogenetical parameters analysed were the number of aberrant metaphases (2,234) and the number (2,854) and type of chromosomal aberrations. Concerning the reproductive analysis of the ovaries and the uteri, the parameters analysed were the number of *corpora lutea*, implantations, implantation losses and foetuses.

Triptorelin confers radio-protection of the ovaries in front of chromosomal instability, which is different, with respect to the single and fractioned dose. The cytogenetical analysis shows a general decrease in most of the parameters of the triptorelin-treated groups, with respect to their controls, and some of these differences were considered to be statistically significant.

The reproductive analysis indicates that there is also radio-protection by the agonist, although minor to the cytogenetical one. Only some of the analysed parameters show a statistically significant decrease in the triptorelin-treated groups.

**Keywords:** female rat, radio-protection, chromosomal instability, germ cells, ovarian function, GnRH analogue

## 1. INTRODUCTION

In the last several years, a great number of people has suffered from cancer disease, but survived thanks to radiotherapy. The secondary effects of this treatment include different degrees of gonadal dysfunction and prevent these people from returning to a totally normal life. In accordance with that, a good knowledge of the effects of ionising radiation upon the female gonadal function and the possibility of treatment or prevention of the ovarian lesion could lessen some of the consequences of these therapies in cancer patients.

When the adult female mammals are irradiated, the ovaries are full of follicles in different stages; the majority of them are primordial follicles (PFs). The PFs are non-growing follicles and they are morphologically constituted by a small-sized oocyte, arrested in the first meiotic prophase (in diplotene), wrapped by a single layer of non-proliferative epithelium. There is a controversy, with respect to the renovation of the mammalian female germ line [1-3] but, at the moment, it is considered that the pool of PFs decreases progressively along the life of the female mammal because of folliculogenesis (growth and development of the PFs) and degeneration processes. Follicular recruitment, independent of gonadotrophins, starts around birth and continues until the end of the reproductive life of the female. At puberty, follicle selection, gonadotrophin-dependent, is established in every estrous cycle.

The gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) is a peptidic hormone synthesised in the hypothalamic neurons and it is an essential component of the hypothalamic-hypophysal-gonadal axis. Its prime function is the neuro-hormonal control of reproduction, as it stimulates the synthesis and release of the hypophysary gonadotrophins (Gn): the follicle-stimulating hormone (FSH) and the luteinising hormone (LH). These hormones promote the development of the gonadal functions: the production and release of the sexual steroids and gametogenesis. Throughout the early years of life, GnRH has a pulsating baseline-level secretion, which strengthens at the prepubertal period. However, if this GnRH secretion is continuous, as seen in some pathologies, the effect of the hormone is opposite to its natural function and the capacity of secretion of Gn is suppressed [4].

This dual potential of GnRH has been seized and analogue molecules have been designed. The two types of GnRH analogues (agonists (GnRHa) and antagonists) have been thoroughly studied in male and female rodents [5-8] and in primates including humans [4,9]. Unlike the antagonists, the GnRHa, such as triptorelin (D-Trp<sup>6</sup>-LHRH), preserve the dual effect of the original GnRH molecule and so they can be applied in both GnRH-like functions. The inhibition of the secretion of Gn, achieved after a continued period of exposure to these molecules [8], will be regained when the treatment is interrupted.

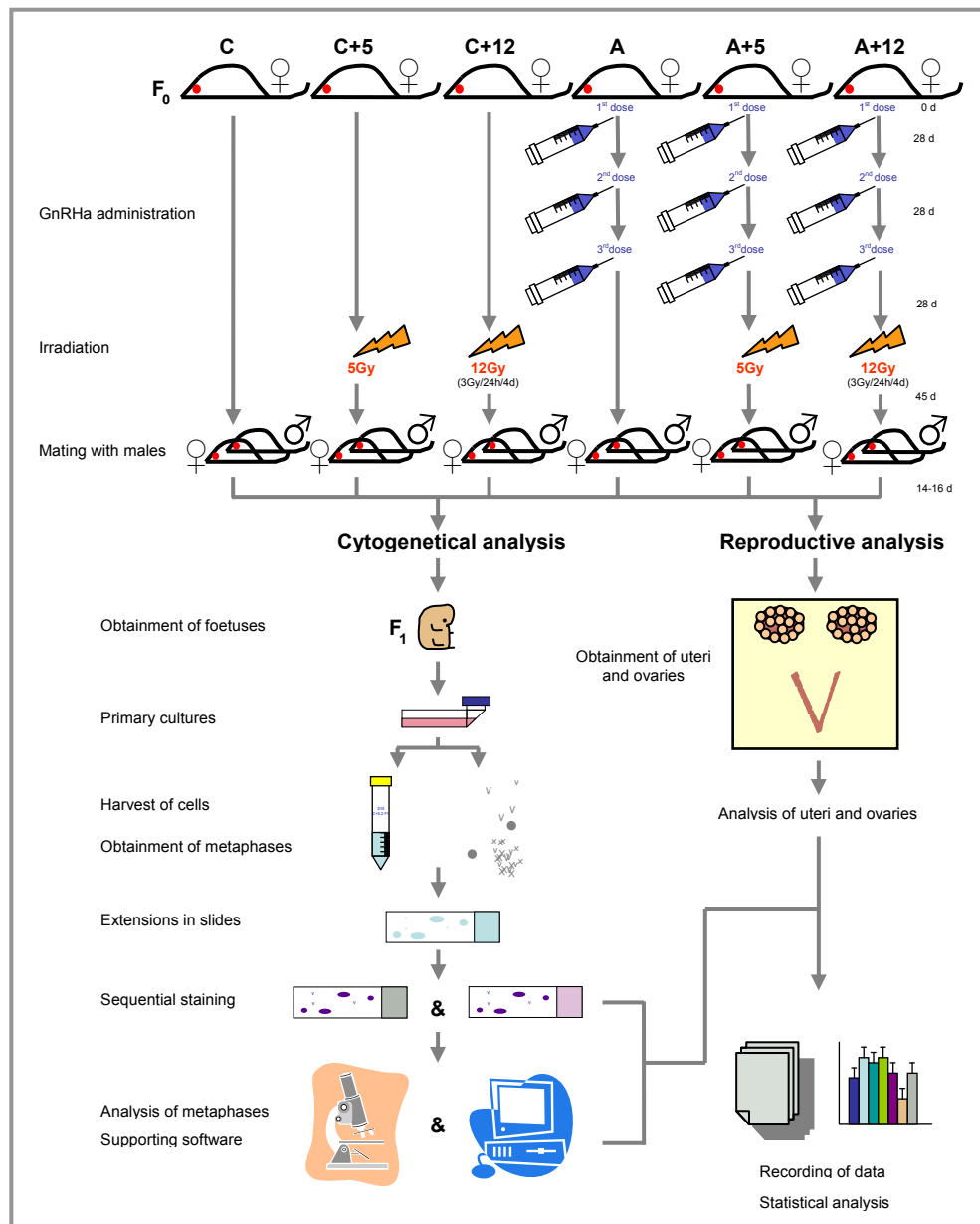
Studies concerning radiotherapy and GnRHa are scarce and refer to clinical, histological, morphological or pharmacological data and, none of them analyses cytogenetical markers. In males (human and animal models), the majority of these studies indicate the existence of radio-protection [10-13]. On the other hand, in females (primates including human and mainly rodents) the results obtained are controversial [14-20], and conclude positively or

negatively, depending on the analogue studied, the species analysed and the dose and type of irradiation.

In this context, an experiment with female *Rattus norvegicus* as the animal model was designed to study the possible radio-protection of the ovarian function of the GnRH analogue (GnRHa) triptorelin. According to this, the effects of the X-irradiation on the oocytes of PFs with and without GnRHa treatment were compared, directly in the female rats ( $F_0$ ) with reproductive parameters, and in the somatic cells of the resulting foetuses ( $F_1$ ) with cytogenetical parameters.

## 2. MATERIALS AND METHODS

The diagram showing the experimental design is in **Figure 1**.



**Figure 1.** Diagram of the experimental design. C: control group, C+5: 5-Gy-treated group, C+12: 12-Gy-treated group, A: GnRH-treated group, A+5: GnRH and 5-Gy-treated group, A+12: GnRH and 12-Gy-treated group, F<sub>0</sub>: generation 0 (females), F<sub>1</sub>: first generation (foetuses), d: days, h: hours.

### 2.1. Females, foetuses, cell cultures and chromosomal preparations

In order to study the effects of the GnRH analogue triptorelin (GnRH), a total of 83 *Rattus norvegicus* (RNO) adult, female Sprague-Dawley-strain rats ( $2n=42$ , Servicio de Animales de Laboratorio, Universidad de Murcia and Servei d'Estabulari, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain) were analysed.

An experiment with six different groups of treatment was designed: a non-treated group (C), an X-irradiated one with a dose of 5 Gray (Gy) (C+5), an X-irradiated one with a dose of 12 Gy (C+12); a GnRHa-treated group (A); a GnRHa-treated and subsequently 5-Gy-irradiated group (A+5) and a GnRHa-treated and subsequently 12-Gy-irradiated group (A+12), as shown in **Figure 1**.

After 45 days of irradiation, all of the females cohabitated for two weeks with adult, Sprague-Dawley males of proved fertility. A monitoring of the successful matings was performed by the observation of the presence of the dropped copulation plug or of vaginal sperm every morning to determine Day 0 of pregnancy.

After 14-16 days of pregnancy, all of the 83 females were sacrificed. The uteri and ovaries from 82 were extracted for the reproductive analysis. Foetuses from 65 female rats were obtained for the cytogenetical analysis.

A total of 236 foetuses were analysed with a mean of three to four foetuses per rat (**Fig. 1, Table 1**). Forty-two of these corresponded to non-X-irradiated females (**C** and **A**) and 194 of them came from X-irradiated females (C+5, C+12, A+5 and A+12). A total of 82 uteri and 164 ovaries were also analysed, corresponding to the pregnant females of all of the groups.

Primary cultures of fibroblasts were established for each foetus. The primary fibroblasts were obtained from the whole foetuses. These primary cultures lasted from four to seven days (short cultures) in order to obtain no differentiation in specific tissue cells and no genetic modification. A single subculture was performed followed by the harvest of the cells on the next day. Chromosomal preparations were obtained according to standard procedures.

### **2.1.1. Hormonal treatment**

The GnRHa triptorelin (Decapeptyl®, Ipsen) was administered for three times (Day 0, Day 28 and Day 56) to three groups of treatment: A, A+5, A+12 (**Fig. 1**). The dosage was of 0.05 ml per each 100 gr of weight (0.094 mgr/100 gr), and it was inoculated into the leg muscle.

### **2.1.2. X-irradiation**

Previously anaesthetised (Thalamonal, Roche; 0.1 cc/100 gr), 54 females were X-irradiated in the abdominal region (5x5 cm) at two different dosages: 25 were irradiated with a single dose of 5 Gray (Gy) for 2.57 minutes (C+5 and A+5) on Day 84, and 29 were irradiated with a fractioned dose of 12 Gy (C+12 and A+12) for four days at a dose of 3 Gy for 1.54 minutes per day, on Days 84 to 87. The X-irradiation was conducted in the Unit of Cobaltotherapy at the *Servicio de Radiología, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain*.

At the moment of irradiation of the adult females, theoretically, the ovaries were full of follicles in different stages. The long period of recovery (45 days) permitted that the germ cells ready for fertilisation at mating were the ones from those X-irradiated primordial follicles. Therefore, this experiment allowed for the analysis of the results of the X-irradiation in the oocytes I in primordial follicles of the mothers and their consequences in the F<sub>1</sub>.

## 2.2. Cytogenetical analysis

The detection of breakpoints was performed by analysing metaphases by sequential staining: conventional staining (with Leishman's stain) for the detection of chromosomal aberrations, followed by the sequential G-banding technique (with Wright's stain) for the precise localisation of breakpoints (**Fig. 2**). Metaphases were analysed with an Olympus AX70 optic microscope, and digital images were obtained using a coupled camera with CytoVision software (*Applied Imaging, Inc.*).

The parameters analysed were the number of aberrant metaphases and the number and types of chromosomal aberrations. Chromosomal aberrations included two groups of aberrations: gaps and breaks and structural aberrations. Gaps and breaks included chromatid gaps (meaning a gap in one chromatid of the chromosome (chtg)), chromosome gaps (meaning a gap including both chromatids (chsg)), chromatid breaks (meaning different types of breakages in one chromatid of a chromosome (chtb)) and chromosome breaks (meaning different types of breakages including both chromatids (chsb)). The structural aberrations included (a) stable aberrations (translocations (t), fusions (f), inversions (inv), insertions (ins), marker chromosomes (mar), chromatid deletions (cht del) and chromosome deletions (chs del)); (b) unstable aberrations (acentric fragments with only a chromatid (ace cht) and with two chromatids (ace chs), reorganisations between two or more chromosomes (re), ring chromosomes (r) and dicentric chromosomes (dic)), and (c) other aberrations (derivative and odd chromosomes). Furthermore, aberrant metaphases were classified into six groups depending on the number of aberrations contained. The frequencies of all parameters obtained, with respect to total and aberrant metaphases, and with respect to total aberrations, include aberrant metaphases per total metaphases (AM/TM), total aberrations per total metaphases (Ab/TM) and total aberrations per aberrant metaphases (Ab/AM).

The rat ideogram and G-band nomenclature were established according to Levan [21] with a resolution of 238 bands per haploid genome. Roughly 100 cells per rat foetus were analysed.

## 2.3. Reproductive analysis

An examination of the uteri and ovaries of each pregnant female was performed. The uteri were analysed macroscopically and the ovaries were examined under a binocular magnifying glass with a coupled cold light, in both cases without fixation. The uteri were analysed by counting the foetuses and the post-implantation losses of every pregnant female, while the *corpora lutea* in each of the ovaries were recorded. The implantations (foetuses + post-implantation losses) and the pre-implantation losses (*corpora lutea* - implantations) were also calculated. The means per group of the former parameters were computed. The percentages of pre-implantation loss, implantation index, post-implantation loss and gestational index were calculated:

$$\text{Pre-implantation loss (\%)} = \text{Pre-implantation losses} / \text{total } \textit{corpora lutea} \times 100$$

$$\text{Implantation index (\%)} = \text{Implantations} / \text{total } \textit{corpora lutea} \times 100$$

$$\text{Post-implantation loss (\%)} = \text{Post-implantation losses} / \text{total implantations} \times 100$$

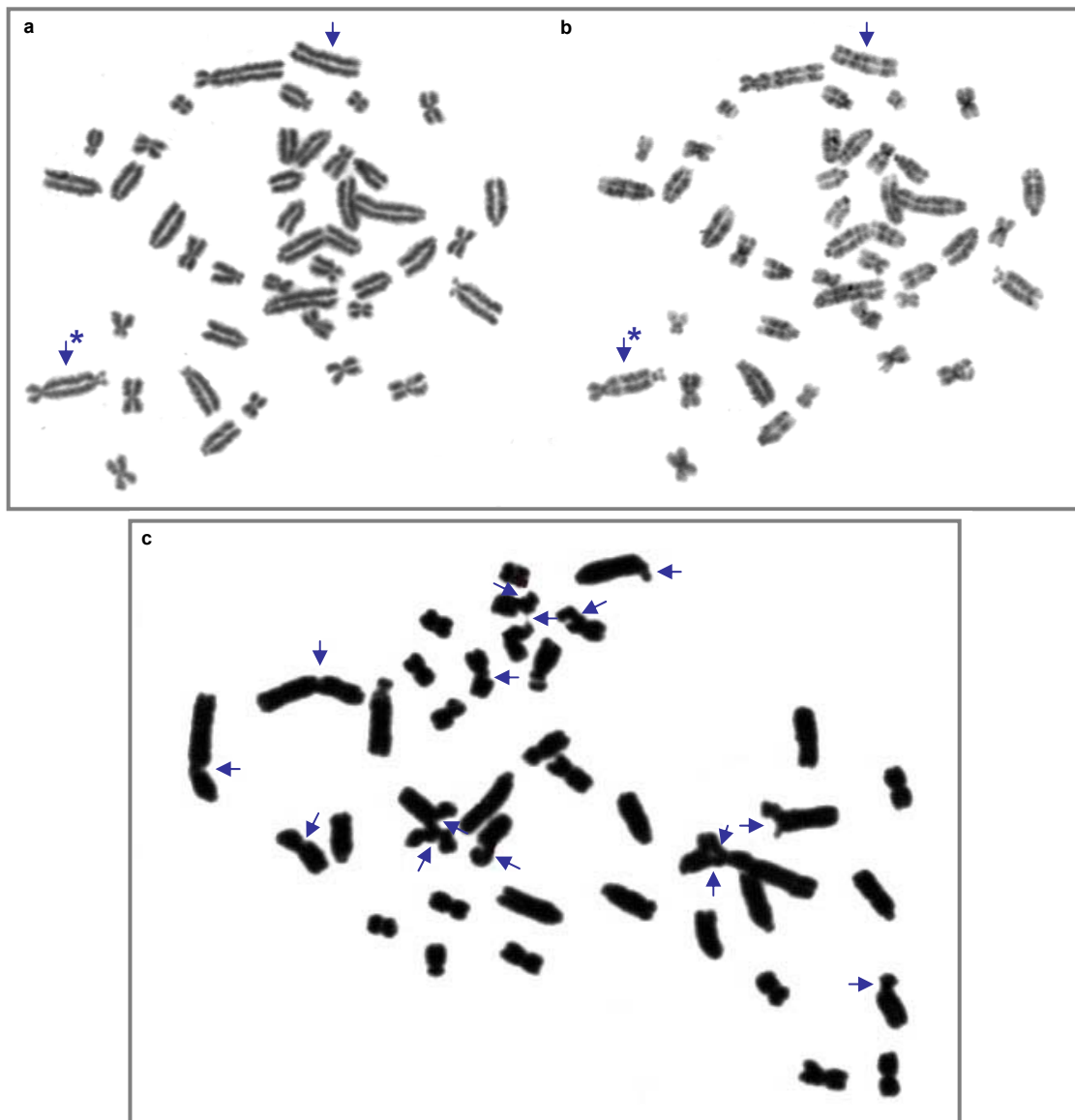


$$\text{Gestational index (\%)} = \text{Foetuses/total implantations} \times 100$$

#### 2.4. Statistical analysis

An ANOVA test with a priori contrasts was performed for the statistical analysis to compare all of the previously mentioned cytogenetical parameters of the six groups. Additionally, the Mann-Whitney U test for appropriate pair-wise comparisons was performed to evaluate the reproductive parameters and the indices were compared by Fisher's exact test.

For all statistical tests, the minimum significance limit level of  $p=0.05$  (two-tailed) was used for all measured parameters. Means, standard deviations and standard error were calculated for all measured parameters.



**Figure 2.** Aberrant metaphases showing the chromosomes of *Rattus norvegicus*. **a** and **b** correspond to an aberrant metaphase in sequential staining: conventional staining (**a**) and in G-banding technique (**b**). **c** shows an aberrant metaphase containing multiple aberrations. Arrows indicate different types of aberrations and the asterisk indicates a dicentric chromosome dic(1;3) with its corresponding acentric.

### 3. RESULTS

In order to determine the possible radio-protection of the GnRHa triptorelin, two different approaches were performed: a cytogenetical (to  $F_1$ ) and a reproductive (to  $F_0$  and  $F_1$ ) analysis.

#### 3.1. The cytogenetical results

A total of 22,151 metaphases was analysed: 10,205 metaphases corresponded to the three groups treated with GnRHa (A, A+5 and A+12), and 11,946 to the rest (C, C+5 and C+12) (**Table 1**). A total of 2,234 aberrant metaphases were found: 904 corresponded to the GnRHa-treated groups and 1,330 to the rest of groups (**Table 1**).

**Table 1.** Females, foetuses, metaphases analysed and aberrant metaphases of the cytogenetical analysis

	C	C+5	C+12	A	A+5	A+12	Totals
Females	7	14	14	4	11	15	65
Foetuses	26	45	50	16	40	59	236
Total metaphases	2,694	4,419	4,833	1,602	3,959	4,644	22,151
Aberrant metaphases	204	598	528	91	311	502	2,234

C	Control group
C+5	5-Gy-treated group
C+12	12-Gy-treated group
A	GnRH-analogue-treated group
A+5	GnRH-analogue and 5-Gy-treated group
A+12	GnRH-analogue and 12-Gy-treated group

A total of 2854 aberrations were detected by sequential G-banding methods, 2045 belonging to gaps and breaks (71.65% of aberrations) and 809 to structural aberrations (28.35%). These aberration types were present in all treatment groups (**Table 2**).

Aberrant metaphases containing only one aberration were the most usually found followed by two aberration-aberrant metaphases (**Table 3**).

**Table 3.** Number of aberrations (%) regarding aberrant metaphases

Groups of treatment	Aberrant metaphases with:					
	1 Ab	2 Ab	3 Ab	4 Ab	5 Ab	>5 Ab
C	79.46	15.14	2.70	1.08	0.00	1.62
C+5	72.16	17.59	4.90	1.56	0.67	3.12
C+12	67.68	18.03	7.26	2.81	1.64	2.58
A	82.80	10.75	3.23	2.15	1.08	0.00
A+5	69.54	21.19	4.97	2.32	0.33	1.66
A+12	72.99	19.18	3.92	0.62	1.86	1.44

C	Control group
C+5	5-Gy-treated group
C+12	12-Gy-treated group
A	GnRH-analogue-treated group
A+5	GnRH-analogue and 5-Gy-treated group
A+12	GnRH-analogue and 12-Gy-treated group
Ab	Chromosomal aberration/s

**Table 2.** Aberrant metaphases and aberrations and their frequencies, with respect to total metaphases, with respect to aberrant metaphases and with respect to total aberrations

	Totals							Per total metaphases					
	C	C+5	C+12	A	A+5	A+12	Totals	C	C+5	C+12	A	A+5	A+12
<b>Aberrant Metaphases</b>	<b>204</b>	<b>598</b>	<b>528</b>	<b>91</b>	<b>311</b>	<b>502</b>	<b>2,234</b>	<b>0.076</b> ± 0.009	<b>0.139</b> ± 0.019	<b>0.110</b> ± 0.020	<b>0.057</b> ± 0.007	<b>0.078</b> ± 0.007	<b>0.089</b> ± 0.007
<b>Aberrations</b>	<b>237</b>	<b>690</b>	<b>683</b>	<b>118</b>	<b>434</b>	<b>692</b>	<b>2,854</b>	<b>0.088</b> ± 0.011	<b>0.148</b> ± 0.019	<b>0.150</b> ± 0.023	<b>0.074</b> ± 0.010	<b>0.106</b> ± 0.011	<b>0.129</b> ± 0.016
gaps and breaks	170	478	488	100	334	475	2,045	0.064 ± 0.009	0.103 ± 0.011	0.106 ± 0.019	0.062 ± 0.010	0.083 ± 0.008	0.087 ± 0.010
gaps	45	127	121	20	99	148	560	0.017 ± 0.003	0.027 ± 0.004	0.027 ± 0.006	0.012 ± 0.016	0.026 ± 0.004	0.027 ± 0.003
breaks	125	351	367	80	235	327	1,485	0.047 ± 0.008	0.075 ± 0.008	0.079 ± 0.014	0.050 ± 0.007	0.058 ± 0.006	0.061 ± 0.008
Structural aberrations	67	212	195	18	100	217	809	0.025 ± 0.005	0.045 ± 0.010	0.045 ± 0.008	0.011 ± 0.003	0.023 ± 0.005	0.042 ± 0.008
Stable	27	54	54	6	19	62	222	0.010 ± 0.004	0.011 ± 0.003	0.011 ± 0.002	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.011 ± 0.002
t	0	7	3	3	2	10	25						
f	3	1	6	0	4	4	18						
inv	0	0	1	0	0	0	1						
ins	0	0	0	0	1	0	1						
mar	7	10	7	2	2	8	36						
del	17	36	37	1	10	40	141						
Unstable	37	148	132	12	79	155	563	0.015 ± 0.003	0.034 ± 0.008	0.033 ± 0.007	0.008 ± 0.002	0.019 ± 0.004	0.031 ± 0.006
ace	27	98	88	10	54	126	403						
re	8	45	34	1	20	22	130						
r	1	4	7	1	5	7	25						
dic	1	1	3	0	0	0	5						
Others	3	10	9	0	2	0	24	0.001 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000

- |      |                                       |              |                    |        |   |
|------|---------------------------------------|--------------|--------------------|--------|---|
| C    | Control group                         | gaps and bks | Gaps and breaks    | del    | Deletions   |
| C+5  | 5-Gy-treated group                    | bks          | Breaks             | ace    | Acentric fragments  |
| C+12 | 12-Gy-treated group                   | t            | Translocations     | re     | Reorganisations between two or more chromosomes               |
| A    | GnRH-analogue-treated group           | f            | Fusions            | r      | Ring chromosomes  |
| A+5  | GnRH-analogue and 5-Gy-treated group  | inv          | Inversions         | dic    | Dicentric chromosomes   |
| A+12 | GnRH-analogue and 12-Gy-treated group | ins          | Insertions         | Others | Derivative chromosomes, odd chromosomes and other aberrations |
|      |                                       | mar          | Marker Chromosomes |        |   |

Data behind ± are Standard error (S)

**Table 2.** (cont.) Aberrant metaphases and aberrations and their frequencies, with respect to total metaphases, with respect to aberrant metaphases and with respect to total aberrations

	Per aberrant metaphases						Per total aberrations						
	C	C+5	C+12	A	A+5	A+12	C	C+5	C+12	A	A+5	A+12	Totals
<b>Aberrant Metaphases</b>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<b>Aberrations</b>	<b>1.170</b> ± 0.056	<b>1.416</b> ± 0.095	<b>1.476</b> ± 0.109	<b>1.318</b> ± 0.099	<b>1.384</b> ± 0.011	<b>1.364</b> ± 0.058	—	—	—	—	—	—	—
gaps and breaks	<b>0.836</b> ± 0.082	<b>1.006</b> ± 0.072	<b>1.028</b> ± 0.085	<b>1.028</b> ± 0.130	<b>1.112</b> ± 0.048	<b>0.939</b> ± 0.049	<b>71.73</b>	<b>69.28</b>	<b>71.45</b>	<b>84.75</b>	<b>76.96</b>	<b>68.64</b>	<b>71.65</b>
gaps	0.183 ± 0.166	0.253 ± 0.032	0.249 ± 0.031	0.187 ± 0.052	0.374 ± 0.060	0.289 ± 0.030	18.99	18.41	17.72	16.95	22.81	21.39	19.62
breaks	0.653 ± 0.086	0.753 ± 0.061	0.779 ± 0.070	0.840 ± 0.107	0.739 ± 0.061	0.651 ± 0.040	52.74	50.87	53.73	67.80	54.15	47.25	52.03
<b>Structural aberrations</b>	<b>0.337</b> ± 0.062	<b>0.410</b> ± 0.056	<b>0.451</b> ± 0.066	<b>0.290</b> ± 0.104	<b>0.278</b> ± 0.048	<b>0.425</b> ± 0.049	<b>28.27</b>	<b>30.72</b>	<b>28.55</b>	<b>15.25</b>	<b>23.04</b>	<b>31.36</b>	<b>28.35</b>
Stable	0.116 ± 0.042	0.099 ± 0.024	0.111 ± 0.022	0.063 ± 0.023	0.054 ± 0.014	0.119 ± 0.023	11.39	7.83	7.91	5.08	4.38	8.96	7.78
t							0.00	1.01	0.44	2.54	0.46	1.45	0.88
f							1.27	0.14	0.88	0.00	0.92	0.58	0.63
inv							0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.04
ins							0.00	0.00	0.00	0.00	0.23	0.00	0.04
mar							2.95	1.45	1.02	1.69	0.46	1.16	1.26
del							7.17	5.22	5.42	0.85	2.30	5.78	4.94
Unstable	0.220 ± 0.052	0.331 ± 0.047	0.339 ± 0.056	0.226 ± 0.105	0.224 ± 0.043	0.306 ± 0.044	15.61	21.45	19.33	10.17	18.20	22.40	19.73
ace							11.39	14.20	12.88	8.47	12.44	18.21	14.12
re							3.38	6.52	4.98	0.85	4.61	3.18	4.56
r							0.42	0.58	1.02	0.85	1.15	1.01	0.88
dic							0.42	0.14	0.44	0.00	0.00	0.00	0.18
Others	0.009 ± 0.005	0.041 ± 0.024	0.032 ± 0.026	0.000 ± 0.000	0.003 ± 0.002	0.000 ± 0.000	1.27	1.45	1.32	0.00	0.46	0.00	0.84

C	Control group	gaps and bks	Gaps and breaks	del	Deletions
C+5	5-Gy-treated group	bks	Breaks	ace	Acentric fragments
C+12	12-Gy-treated group	t	Translocations	re	Reorganisations between two or more chromosomes
A	GnRH-analogue-treated group	f	Fusions	r	Ring chromosomes
A+5	GnRH-analogue and 5-Gy-treated group	inv	Inversions	dic	Dicentric chromosomes
A+12	GnRH-analogue and 12-Gy-treated group	ins	Insertions	Others	Derivative chromosomes, odd chromosomes and other aberrations
		mar	Marker Chromosomes		

Data behind ± are Standard error (S)

a. - In order to study the differences of the effects of the two radiation dosages (5 and 12 Gy; single and fractioned dose) with the control groups (C and A), statistical comparisons (ANOVA test with *a priori* contrasts,  $p \leq 0.05$ ) based on all data frequencies of every control group with their respective irradiated groups were performed (**Table 2, Fig. 3**). In this sense:

When comparing C vs. C+5 and C vs. C+12:

Regarding total metaphases (**Table 2, Fig. 3a**), C+5 and C+12 showed an increase in the frequencies and statistically significant results (aberrant metaphases, total aberrations, gaps and breaks and structural aberrations), with respect to C. Concerning aberrant metaphases, only total aberrations were significantly higher in C+12 (**Table 2**).

When comparing A vs. A+5 and A vs. A+12:

Regarding total metaphases (**Table 2, Fig. 3b**), a statistically significant increase in the frequencies (aberrant metaphases, total aberrations and structural aberrations) in both irradiated groups (A+5 and A+12), with respect to A, were observed. Concerning aberrant metaphases (**Table 2**), the total aberrations were similar in all of the groups.

b. - In order to find out possible radio-protection by the GnRHa triptorelin, GnRHa-treated and non-GnRHa-treated groups were compared. Statistical comparisons based on all data frequencies (**Table 2**) with an ANOVA test with *a priori* contrasts were performed (**Table 2, Figs. 4 and 5**).

Concerning total metaphases (**Table 2, Fig. 4**):

When comparing C and A (**Fig. 4a**), there is a protection of the analogue in front of the spontaneous chromosomal instability: the frequencies show a general decrease in A, which is statistically significant in structural aberrations ( $p=0.023$ ).

When comparing the 5-Gy-treated groups (**Table 2, Fig. 4b**), the tendency to decrease is even higher (with respect to the former comparison) in all of the parameters of A+5. This decrease is statistically significant in aberrant metaphases ( $p=0.049$ ) and in structural aberrations ( $p=0.048$ ). In the case of the 12-Gy-treated groups (**Table 2, Fig. 4c**), the frequencies of the parameters in A+12 are lower than those in C+12, but without statistical significance.

The cytogenetical parameters used as damage indicators in the GnRHa-treated groups indicate that GnRHa confers radio-protection to the cells in front of chromosomal instability that is higher when the dose is single.

Regarding aberrant metaphases (**Table 2, Fig. 5**), it seems that there is no protection from neither spontaneous nor radiation-induced chromosomal instability, at least with statistical significance (**Table 2, Fig. 5a**). Concerning the irradiated groups, we can observe an equivalence in C+5 and A+5 and a (non-statistically significant) general decrease of radiation-induced chromosomal instability in A+12, with respect to C+12 (**Table 2, Fig. 5b and 5c**).

### 3.2. The reproductive results

Eighty-two pregnant females were studied: 40 of them corresponded to the three groups treated with GnRHa (A, A+5 and A+12), and 42 corresponded to the rest of the groups (C, C+5 and C+12) (**Table 4**).

A total of 1,823 *corpora lutea*, 669 pre-implantation losses, 1,154 implantations, 131 post-implantation losses and 1,023 fetuses were found (**Table 4**).

**a. -** In order to study the differences of the effects of the two radiation dosages (5 and 12 Gy; single and fractioned dose, respectively) with the control groups (C and A, respectively), statistical comparisons (pair-wise Mann-Whitney *U* tests and also Fisher's exact tests,  $p \leq 0.05$ ) based on all data frequencies of every control group with their respective irradiated groups were performed (**Table 4, Fig. 6**).

When comparing C vs. C+5 and C vs. C+12, (**Table 4, Fig. 6a**), there are no statistically significant differences except for fetuses per female (C versus C+5).

When comparing A vs. A+5 and A vs. A+12, (**Table 4, Fig. 6b**), the results in the three groups were similar to each other except for the implantation index, which is statistically significantly lower in A+5, respect to A.

No effect of radiation is observed at the reproductive level, at least in the studied parameters. Regardless of the single or fractioned dose of irradiation, and of the treatment or non-treatment with GnRHa, there are hardly any statistically significant differences between groups.

**b. -** In order to find the possible existence of radio-protection by the GnRHa triptorelin, GnRHa-treated and non-GnRHa-treated groups were compared. Statistical comparisons (pair-wise Mann-Whitney *U* tests and also Fisher's exact tests,  $p \leq 0.05$ ) based on all frequencies (**Table 4**) were performed (**Fig. 7**).

When comparing C and A, (**Table 4, Fig. 7a**), results are similar to each other. There is a tendency to improve the gonadal function using triptorelin although no statistically significant protection by GnRHa was observed in the parameters referring to the reproductive conditions. Otherwise, statistically significant parameters indicate radio-protection in the 5-Gy-treated and in the 12-Gy-treated groups (**Table 4, Figs. 7b and 7c**; *corpora lutea*,  $p=0.035$ ; pre-implantation loss,  $p=0.019$ ).

**Table 4.** The reproductive parameters analysed

	0 Gy		5 Gy		12 Gy		Totals
	C	A	C+5	A+5	C+12	A+12	
<b>Total corpora lutea</b>	<b>191</b>	<b>103</b>	<b>350</b>	<b>353</b>	<b>352</b>	<b>474</b>	<b>1,823</b>
Corpora lutea per female (mean ± SE)	21.22 ± 2.76	20.60 ± 1.33	21.88 ± 1.76	27.15 ± 2.37	25.14 ± 2.04	21.55 ± 1.84	22.92
<b>Total pre-implantation loss</b>	<b>58</b>	<b>29</b>	<b>115</b>	<b>154</b>	<b>156</b>	<b>157</b>	<b>669</b>
Pre-implantation loss per pregnant female (mean ± SE)	8.11 ± 2.54	5.80 ± 3.20	7.19 ± 1.92	11.85 ± 2.09	12.64 ± 1.89	7.14 ± 1.73	8.79
Pre-implantation loss (%)	30.37	28.16	32.86	43.63	44.32	33.12	34.89
<b>Total implantations</b>	<b>133</b>	<b>74</b>	<b>235</b>	<b>199</b>	<b>196</b>	<b>317</b>	<b>1,154</b>
Implantations per female	13.11 ± 0.42	14.80 ± 2.71	14.69 ± 0.95	15.31 ± 0.75	12.50 ± 0.95	14.41 ± 0.56	14.14
Implantation index (%)	69.63	71.84	67.14	56.37	55.68	66.88	64.59
<b>Total post-implantation loss</b>	<b>20</b>	<b>6</b>	<b>26</b>	<b>23</b>	<b>25</b>	<b>31</b>	<b>131</b>
Post-implantation loss per female (mean ± SE)	1.89 ± 0.26	1.20 ± 0.37	1.63 ± 0.31	1.77 ± 0.34	1.43 ± 0.20	1.41 ± 0.28	1.55
Post-implantation loss (%)	15.04	8.11	11.06	11.56	12.76	9.78	11.38
<b>Total live foetuses (a)</b>	<b>113</b>	<b>68</b>	<b>209</b>	<b>176</b>	<b>171</b>	<b>286</b>	<b>1,023</b>
Live foetuses per female (mean ± SE)	11.22 ± 0.44	12.20 ± 2.54	13.06 ± 0.94	13.54 ± 0.96	11.07 ± 0.81	13.05 ± 0.63	12.35
Gestational index (%)	84.96	91.89	88.95	88.44	87.24	90.22	88.62
<b>Females</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>17</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>22</b>	<b>82</b>

C control group

C+5 5-Gy-treated group

C+12 12-Gy-treated group

A GnRH-analogue-treated group

A+5 GnRH-analogue and 5-Gy-treated group

A+12 GnRH-analogue and 12-Gy-treated group

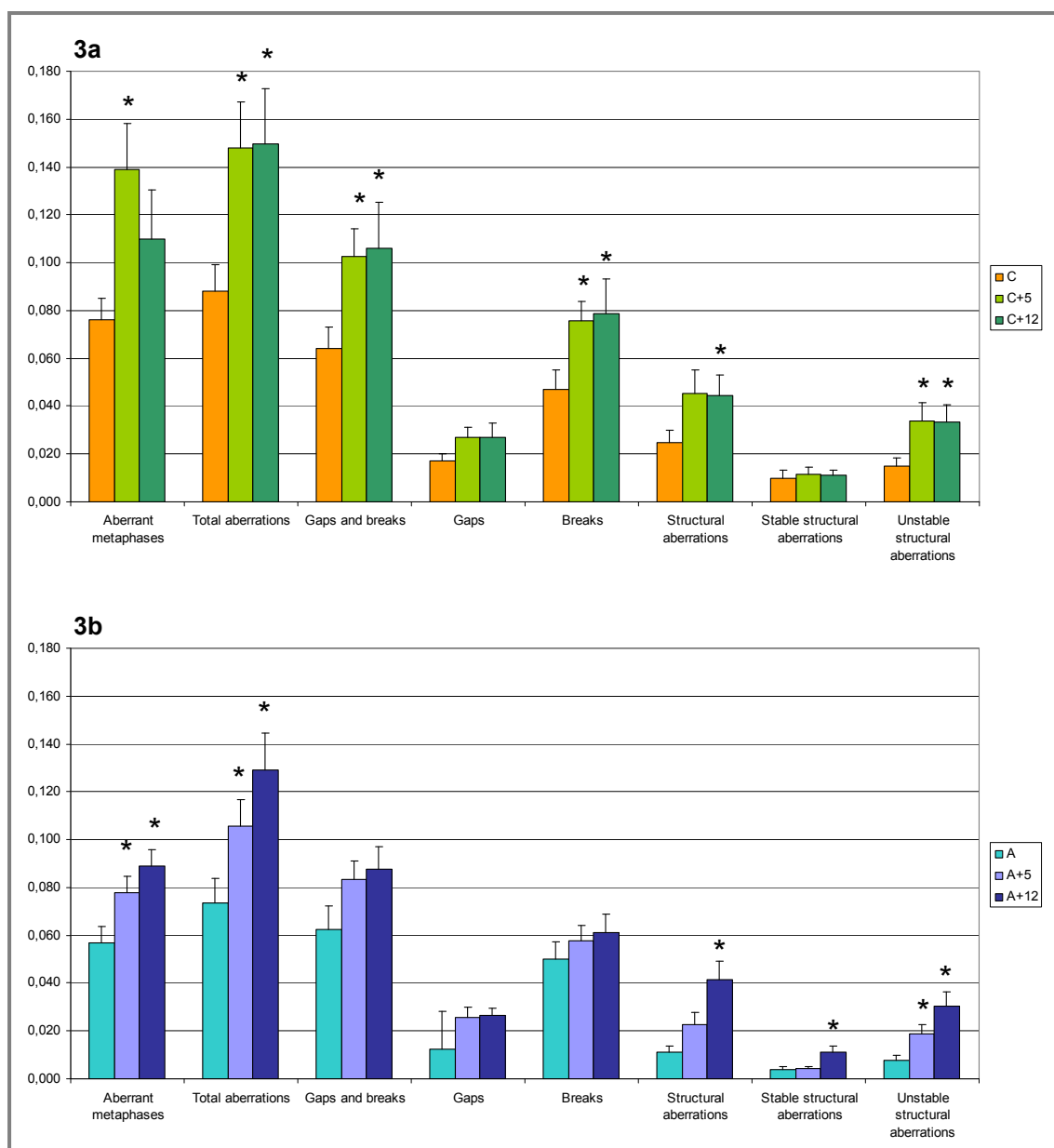
SE = standard error

Pre-implantation loss (%) = total pre-implantation losses/total corpora lutea x 100

Implantation index (%) = total implantation sites/corpora lutea x 100

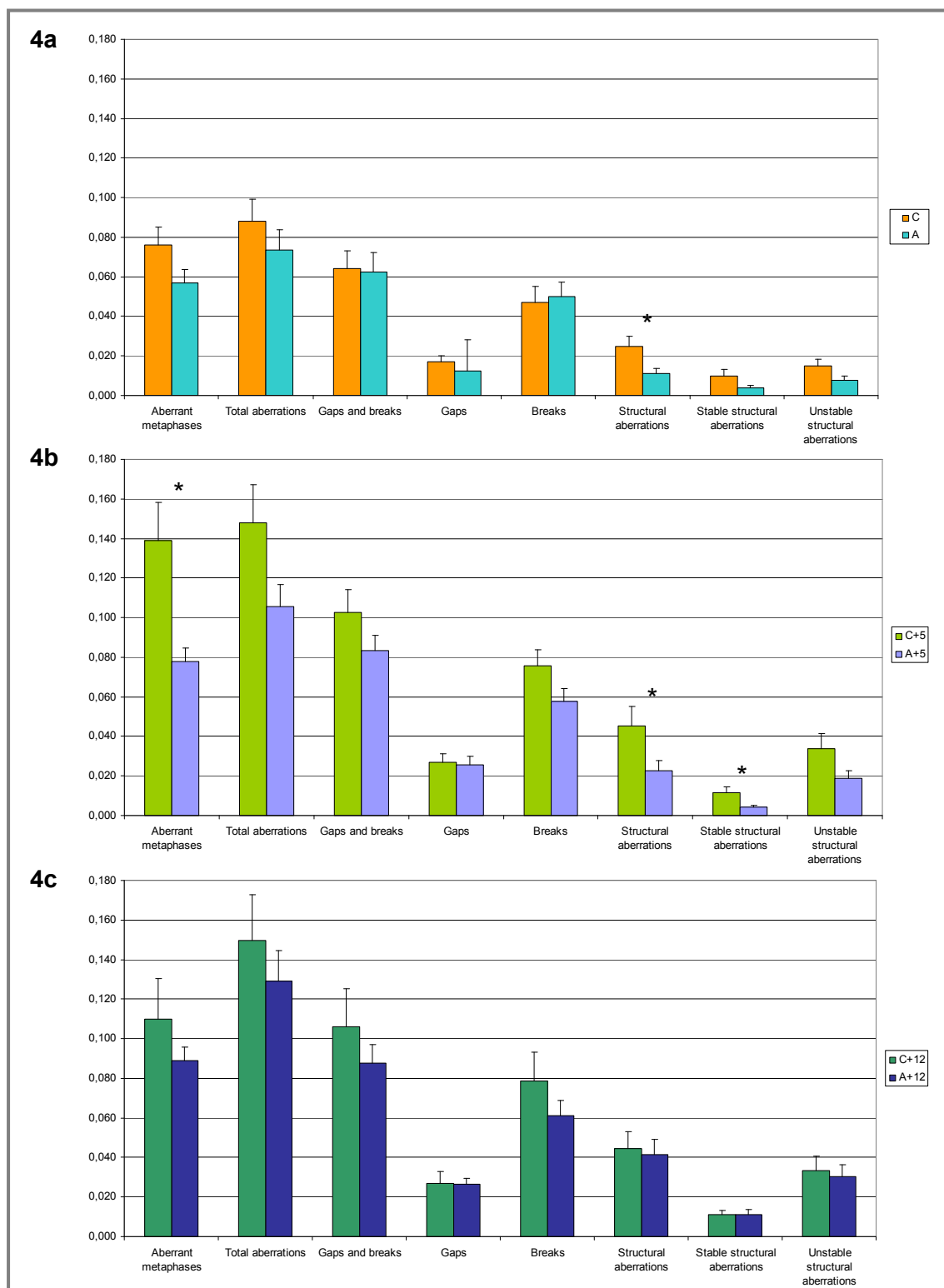
Post-implantation loss (%) = total post-implantation losses/total implantation sites x 100

Gestational index (%) = total live foetuses/total implantation sites x 100

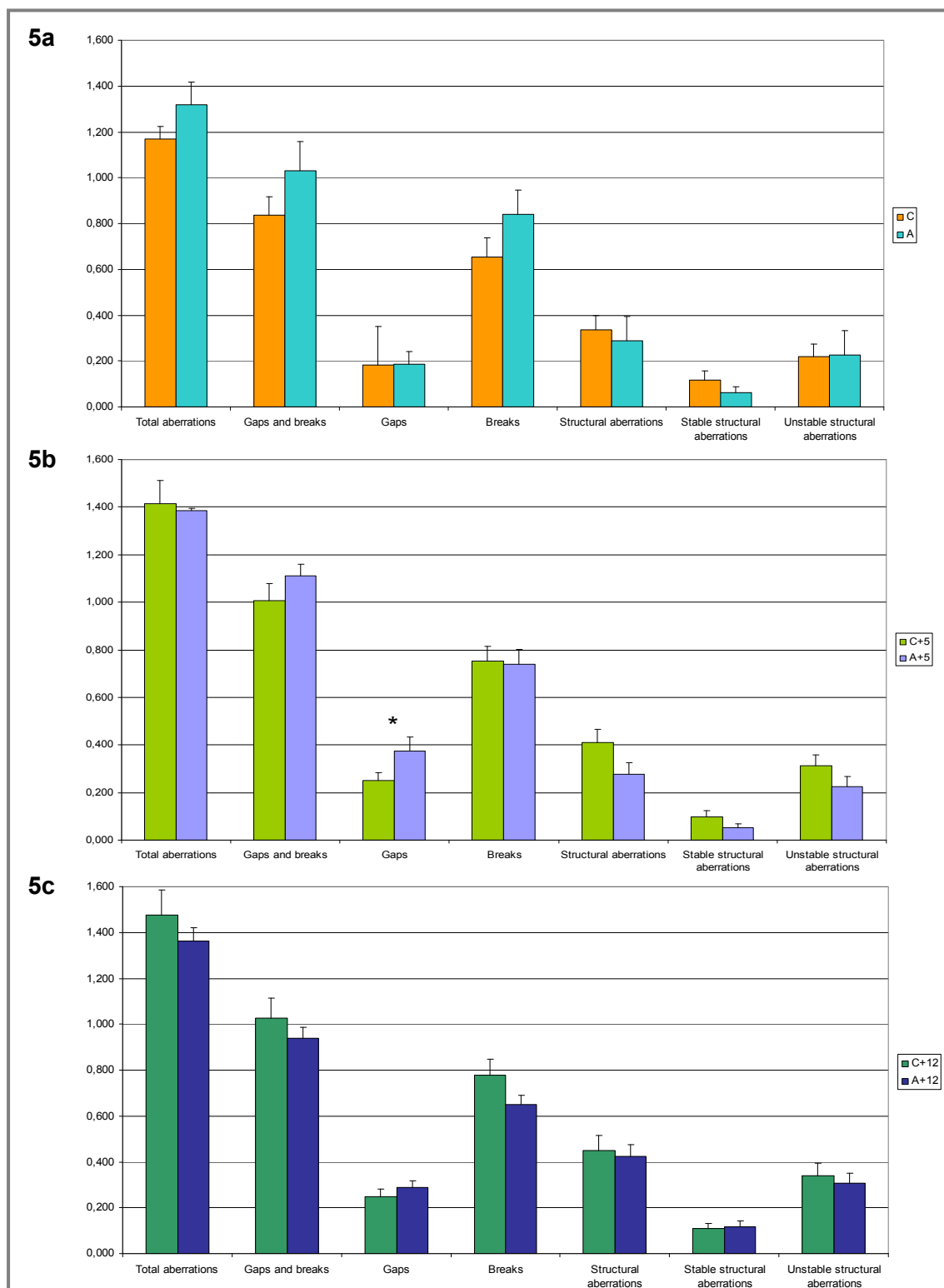


**Figure 3.** The cytogenetical parameters, with respect to total metaphases. 3a shows the comparisons between C and C+5 and between C and C+12, and 3b, between A and A+5 and between A and A+12. Statistically significant differences in the parameters, between each of the irradiated groups and the control groups, are marked with an asterisk above the irradiated-group columns. The information of each parameter is completed by its standard error, above.

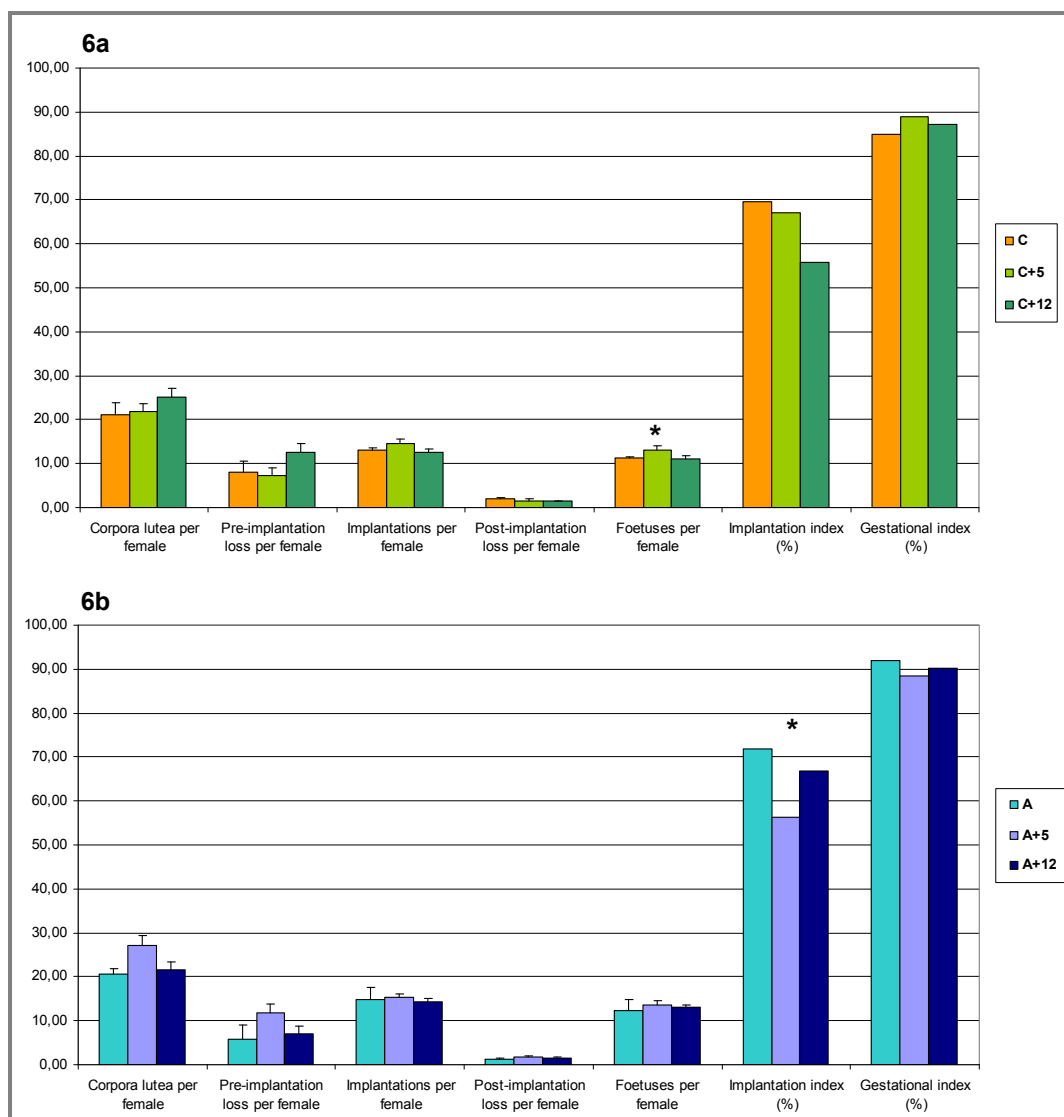




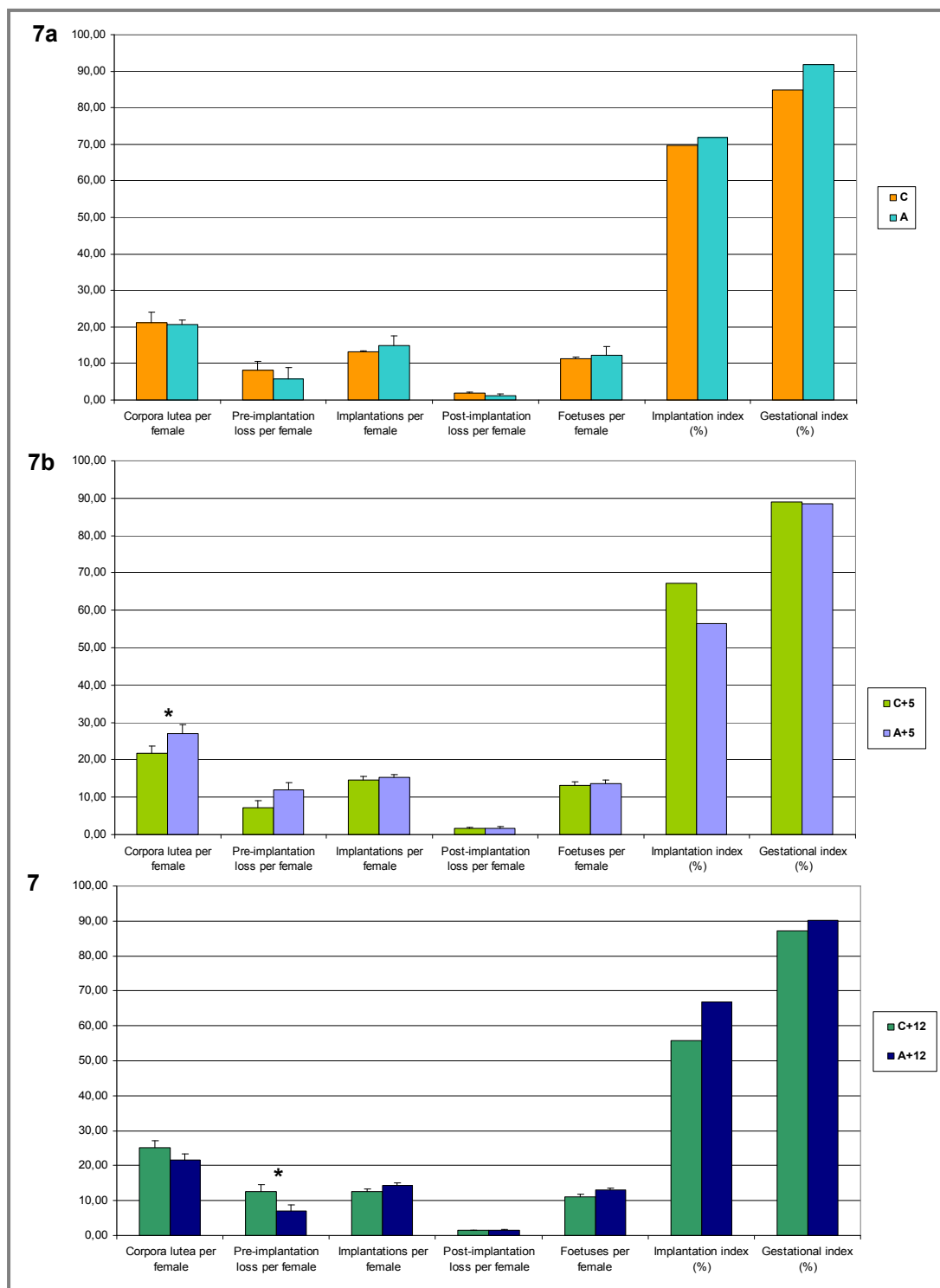
**Figure 4.** The cytogenetical parameters, with respect to total metaphases. 4a shows the comparisons between C and A; 4b, between C+5 and A+5, and 4c, the comparison between C+12 and A+12. Statistically significant differences are marked with an asterisk. The information of each parameter is completed by its standard error, above.



**Figure 5.** The cytogenetical parameters, with respect to aberrant metaphases. 5a shows the comparison between C and A; 5b, between C+5 and A+5; and 5c, between C+12 and A+12. Statistically significant differences are marked with an asterisk. The information of each parameter is completed by its standard error, above.



**Figure 6.** The reproductive parameters, with respect to pregnant female and with respect to the group. 6a shows the comparison between C and C+5 and C and C+12, and 6b, from between A and A+5 and A and A+12. Statistically significant differences in the parameters, between each of the irradiated groups and the control groups, are marked with an asterisk above the irradiated-group columns. The information of each parameter is completed by its standard error, above.



**Figure 7.** The reproductive parameters, with respect to pregnant female and with respect to the group. 4a shows the comparison between C and A, 4b, from C+5 versus A+5, and 4c, the comparison between C+12 versus A+12. Statistically significant differences are marked with an asterisk. The information of each parameter is completed by its standard error, above.

## 4. DISCUSSION

The first thorough study of the effects of the GnRHa triptorelin in front of X-irradiation with cytogenetical and reproductive parameters in an animal model is presented in this work. The study concludes that triptorelin confers radio-protection to the oocytes in the primordial follicles of adult *Rattus norvegicus* females, although the degrees of this protection depend on the parameter analysed and on the dose and type of X-ray-administration applied.

To analyse the results quantitatively, pair-wise comparisons of the global cytogenetical parameters (AM/TM, Ab/TM, Ab/AM) and of the reproductive parameters *corpora lutea*, implantations and foetuses (per female) were performed (Table 5).

### 4.1. The GnRHa triptorelin confers radio-protection

#### 4.1.1. The cytogenetical parameters

As far as we know, this is the first cytogenetical study analysing the effects of GnRHa, in females. The GnRHa triptorelin confers radio-protection in front of chromosomal instability to the cells in both single (5 Gy) and fractioned (12 Gy) doses of X-radiation (Tables 2 and 5, Figs. 4b and 4c). In the 5-Gy-and-GnRHa-treated group, aberrant metaphases per total metaphases decrease to 44% and the total aberrations per total metaphases descend to 28%, whereas in the 12-Gy-and-GnRHa-treated one, the decrease is considerably smaller (than in the 5-Gy-and-GnRHa-treated one) in both parameters (aberrant metaphases per total metaphases, 19%; total aberrations per total metaphases, 14%) (Table 5). As we can see, this radio-protection (with respect to total metaphases) is higher (and doubled) in the case of the single dose.

**Table 5.** Comparisons of the global cytogenetical parameters and of some of the reproductive parameters with the percentages of increase (+) or decrease (-) between them.

			AM/TM	%	Ab/TM	%	Ab/AM	%	CL	%	I	%	F	%
C	vs	A	x 0.75	- 25	x 0.84	- 16	x 1.13	+ 13	x 0.99	- 1	x 1.17	+ 17	x 1.17	+ 17
C+5	vs	A+5	x 0.56	- 44	x 0.72	- 28	x 0.98	- 2	x 1.26	+ 26	x 1.11	+ 11	x 1.08	+ 8
C+12	vs	A+12	x 0.81	- 19	x 0.86	- 14	x 0.92	- 8	x 0.86	- 14	x 1.10	+ 10	x 1.14	+ 14
C	vs	C+5	x 1.83	+ 83	x 1.68	+ 68	x 1.21	+ 21	x 1.03	+ 3	x 1.09	+ 9	x 1.20	+ 20
C	vs	C+12	x 1.44	+ 44	x 1.70	+ 70	x 1.26	+ 26	x 1.20	+ 20	x 1.03	+ 3	x 0.97	- 3
A	vs	A+5	x 1.37	+ 37	x 1.44	+ 44	x 1.05	+ 5	x 1.31	+ 31	x 1.03	+ 3	x 1.11	+ 11
A	vs	A+12	x 1.56	+ 56	x 1.75	+ 75	x 1.03	+ 3	x 1.05	+ 5	x 0.97	- 3	x 1.08	+ 8
C+5	vs	C+12	x 0.79	- 21	x 1.01	+ 1	x 1.04	+ 4	x 1.17	+ 17	x 0.95	- 5	x 0.91	- 9
A+5	vs	A+12	x 1.14	+ 14	x 1.22	+ 22	x 0.99	- 1	x 0.79	- 21	x 0.94	- 6	x 0.96	- 4

C	Control group
C+5	5-Gy-treated group
C+12	12-Gy-treated group
A	GnRH-analogue-treated group
A+5	GnRH-analogue and 5-Gy-treated group
A+ 12	GnRH-analogue and 12-Gy-treated group
AM/TM	aberrant metaphases per total metaphases
Ab/TM	total aberrations per total metaphases
Ab/AM	total aberrations per aberrant metaphases
CL	<i>Corpora lutea</i> per female
I	Implantations per female
F	Foetuses per female

Regarding the effects of irradiation (dose and type of administration) and of the GnRHa relating to aberrant metaphases (**Table 5, Figs. 5b and 5c**), the results suggest that the number of total aberrations per aberrant metaphases are similar and do not increase or decrease neither with the dose of X-irradiation nor with the GnRHa administration (**Table 5**). These results should warn us about the need of careful choosing of the correct parameters in order to analyse the chromosomal instability.

The results of the treatment groups (irradiated and irradiated-and-GnRHa-treated groups), with respect to total metaphases suggest various facts.

First, following what is generally known about irradiation, and although the high, fractioned dose of 12 Gy in our described conditions is equivalent to a single dose of 10 Gy (*Dr. Adolf M. Rubio, personal communication*), the female rats bear the X-ray-fractioned doses better than they do with the single doses. The fractioned dose causes similar damage in most of the parameters to that caused by the single dose (**Table 5 and Fig. 3a**), as if the effects (of this high dose) were softened with the fractioned radiation administration. In the case of aberrant metaphases per total metaphases, the damage induced is even higher (doubled) in the single dose (**Table 5 and Fig. 3a**). These results lead us to believe that the effects related to administration are predominant over those which are dose-related.

Secondly, the results regarding the single and the fractioned dose suggest that there would be a kind of threshold of radio-protection of the analogue. This threshold could depend on the dose and the type of administration. Below this threshold, its protective effect could not exist or would exist at a low level. (**Table 2, Fig. 4**).

Regarding the type of the cytogenetical aberrations detected (**Tables 2 and 4**), the structural aberrations per total metaphases show statistically significant differences between both 5-Gy-treated groups, indicating that they are significantly triptorelin-protected. Otherwise, the high variability in gaps and breaks per total metaphases (**Table 2, Fig. 4**) could be decisive in the findings of non-statistically-significant results.

In the event that we could extrapolate these results to human species, the three GnRHa- treated groups would represent patients with quiescent ovaries such as GnRHa-treated patients and prepubertal girls. The rest would represent control individuals (our control group) or patients undergoing radiotherapy (our X-ray-treated groups). In this sense, the results of the study confirm that the ovaries of prepubertal and GnRHa-treated patients are more radio-resistant than those of adult patients. This fact would be in agreement with former clinical studies [22,23].

#### **4.1.2. The reproductive parameters**

GnRHa confers 5-Gy-radio-protection to the ovaries. There is an increase in the *corpora lutea* (26%, statistically significant), in the implantations (11%) and in the fetuses (8%) per female in the 5-Gy-and-GnRHa-treated group, with respect to the 5-Gy-treated group. These results suggest that triptorelin protects the functioning of the estrous cycle (and ovulation), indicated by the *corpora lutea*, and that it could slightly improve the reproductive performance of the ovaries,

indicated by the increases in the implantations and in the foetuses (**Tables 4 and 5, Fig. 7**). No radio-protection is seen in the rest of the reproductive parameters in the 5-Gy-and-GnRHa-treated group.

GnRHa confers 12-Gy-radio-protection to the reproductive performance (statistically significant decrease in the pre-implantation losses). There is an increase in the implantations (10%) and in the foetuses (14%) per female (**Tables 4 and 5, Fig. 7c**) in the 12-Gy-and-GnRHa-treated group, with respect to its control group, also indicating a slight improvement in the reproduction of these female rats.

The prepubertal, simulated situation in our experimental design (the 5-Gy-and-GnRHa-treated group) could be considered equivalent to the prepubertal-5-Gy-irradiated female rats in Martínez-Flores *et al.* [24]. However, unlike our reproductive results, they had a post-implantation loss of 30%, contrasting to ours of 11.56%. This difference could be due to the different number of individuals analysed, among other causes.

Regarding the to-date-published reproductive studies performed in females, some of them, including rodents (female rats [15]; female mice [19]), primates [16] and humans [20], concluded that there is not such radio-protection on the female gonadal function. However, other studies concluded differently. In this sense, our results are similar to those from Jarrell *et al.* [14], who found a significant increase in the number of *corpora lutea* in female rats pre-treated with the GnRHa ethylamide followed by a 30-Gy irradiation, showing an improvement of the gonadal function in their model. Likewise, some studies in humans showed a radio-protection effect of the GnRHa [17,25,26]. In this sense, Blumenfeld *et al.* [17] and Falorio *et al.* [26] have concluded that there was a protective effect by triptorelin against irreversible ovarian damage in patients who received co-treatment with chemo, and radiotherapy. The wide range of reproductive parameters and of the experimental conditions could be an explanation for this controversy in the different studies.

#### 4.2. The GnRHa triptorelin improves the ovarian function

There is a reduction of 25% of the aberrant metaphases per total metaphases and of 16% of the total aberrations per total metaphases in the GnRHa-treated group, with respect to the control group (**Table 5**), whereas the structural aberrations per total metaphases showed statistically significant differences (**Fig. 4a**). The GnRHa triptorelin reduced the spontaneous chromosomal instability of the oocytes (of the primordial follicles in the ovaries of the adult female rats). This could be translated into an improvement of the gonadal function caused by the administration of this agonist directly related to the female germ line.

The reproductive parameters analysed indicate that there is a non-statistically-significant improvement in the reproductive performance, as in the analysis of other GnRHa-treated female rats performed by Jarrell *et al.* [15]. However, the increase of 17% in both implantations and foetuses per female in the GnRHa-treated group (**Tables 4 and 5, Fig. 7a**) suggests a slight protection by triptorelin translated into an improvement of the reproductive

conditions. As far as we know, there is only one reproductive study showing a protective effect by a GnRH antagonist: the recent study with female rats by Torres *et al.* [27].

In conclusion, the cytogenetical and reproductive analyses reveal that there is radio-protection by the GnRHa triptorelin. This GnRH agonist protects the female germ cells from chromosomal instability and helps in the restoration of the ovarian function after X-irradiation.



**ACKNOWLEDGEMENTS**

We wish to thank the Servicio de Ginecología y Obstetricia and the Servicio de Radioterapia of the Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Spain), the Servicio de Cultivo de Tejidos and the Servicio de Animales de Laboratorio of the Universidad de Murcia (Spain), the Servei de Cultius Cel·lulars (IBB) of the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain) and Dr. Adolf M. Rubio, head of the *Servei de Radiofísica i Protecció* of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Spain), for their collaboration in this project. Financial support was received from FIS (Exp. 99/09900) and from grants from the Servicio de Ginecología y Obstetricia of the Hospital Virgen de la Arrixaca (Murcia, Spain). The English of this manuscript has been corrected by Mr. Chuck Simmons, a native English-speaking Instructor of English of this University.

**CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## REFERENCES

- [1] J. Johnson, J. Canning, T. Kaneko, J.K. Pru and J.L. Tilly Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary, *Nature* 428 (2004) 145-150.
- [2] J.B. Kerr, R. Duckett, M. Myers, K.L. Britt, T. Mladenovska and J.K. Findlay Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply, *Reproduction* 132 (2006) 95-109.
- [3] J. Johnson, J. Bagley, M. Skaznik-Wikiel, H.J. Lee, G.B. Adams, Y. Niikura, K.S. Tschudy, J.C. Tilly, M.L. Cortes, R. Forkert, T. Spitzer, J. Iacomini, D.T. Scadden and J.L. Tilly Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood, *Cell* 122 (2005) 303-315.
- [4] R.M. Janssens, L. Brus, D.J. Cahill, J.A. Huirne, J. Schoemaker and C.B. Lambalk Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists, *Hum Reprod Update* 6 (2000) 505-518.
- [5] F. Parborell, A. Pecci, O. Gonzalez, A. Vitale and M. Tesone Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: regulation by epidermal growth factor and the expression of Bcl-2-related genes, *Biol Reprod* 67 (2002) 481-486.
- [6] L. Bokser, A. Zaladni and A.V. Schally Inhibition of pituitary-gonadal axis in mice by long-term administration of D-Trp-6-LHRH microcapsules, *J Reprod Fertil* 85 (1989) 569-574.
- [7] K. Ataya, M. Tadros and A. Ramahi Gonadotropin-releasing hormone agonist inhibits physiologic ovarian follicular loss in rats, *Acta Endocrinol (Copenh)* 121 (1989) 55-60.
- [8] M. Kovacs and A.V. Schally Comparison of mechanisms of action of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonist cetrorelix and LHRH agonist triptorelin on the gene expression of pituitary LHRH receptors in rats, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 12197-12202.
- [9] H.M. Behre, D. Nashan, W. Hubert and E. Nieschlag Depot gonadotropin-releasing hormone agonist blunts the androgen-induced suppression of spermatogenesis in a clinical trial of male contraception, *J Clin Endocrinol Metab* 74 (1992) 84-90.
- [10] M.P. Wirth, O.W. Hakenberg and M. Froehner Optimal treatment of locally advanced prostate cancer, *World J Urol* 25 (2007) 169-176.
- [11] A.V. Schally, J.I. Paz-Bouza, J.V. Schlosser, T. Karashima, L. Debeljuk, B. Gandle and M. Sampson Protective effects of analogs of luteinizing hormone-releasing hormone against x-radiation-induced testicular damage in rats, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 851-855.
- [12] I.D. Morris Protection against cytotoxic-induced testis damage--experimental approaches, *Eur Urol* 23 (1993) 143-147.
- [13] H. Ishiguro, Y. Yasuda, Y. Tomita, T. Shinagawa, T. Shimizu, T. Morimoto, K. Hattori, M. Matsumoto, H. Inoue, H. Yabe, M. Yabe, O. Shinohara and S. Kato Gonadal shielding to irradiation is effective in protecting testicular growth and function in long-term survivors of bone marrow transplantation during childhood or adolescence, *Bone Marrow Transplant* 39 (2007) 483-490.
- [14] J. Jarrell, E.V. YoungLai, A. McMahon, R. Barr, G. O'Connell and L. Belbeck Effects of ionizing radiation and pretreatment with [D-Leu6,des-Gly10] luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide on developing rat ovarian follicles, *Cancer Res* 47 (1987) 5005-5008.
- [15] J.F. Jarrell, A. McMahon, R.D. Barr and E.V. YoungLai The agonist (d-leu-6,des-gly-10)-LHRH-ethylamide does not protect the fecundity of rats exposed to high dose unilateral ovarian irradiation, *Reprod Toxicol* 5 (1991) 385-388.

- [16] K. Ataya, E. Pydyn, A. Ramahi-Ataya and C.G. Orton Is radiation-induced ovarian failure in rhesus monkeys preventable by luteinizing hormone-releasing hormone agonists?: Preliminary observations, *J Clin Endocrinol Metab* 80 (1995) 790-795.
- [17] Z. Blumenfeld, I. Avivi, S. Linn, R. Epelbaum, M. Ben-Shahar and N. Haim Prevention of irreversible chemotherapy-induced ovarian damage in young women with lymphoma by a gonadotrophin-releasing hormone agonist in parallel to chemotherapy, *Hum Reprod* 11 (1996) 1620-1626.
- [18] Z. Blumenfeld and A. Eckman Preservation of fertility and ovarian function and minimization of chemotherapy-induced gonadotoxicity in young women by GnRH-a, *J Natl Cancer Inst Monogr* (2005) 40-43.
- [19] R.G. Gosden, J.C. Wade, H.M. Fraser, J. Sandow and M.J. Faddy Impact of congenital or experimental hypogonadotrophism on the radiation sensitivity of the mouse ovary, *Hum Reprod* 12 (1997) 2483-2488.
- [20] A. Elis, A. Tevet, R. Yerushalmi, D. Blickstein, O. Bairy, E.J. Dann, Z. Blumenfeld, A. Abraham, Y. Manor, O. Shpilberg and M. Lishner Fertility status among women treated for aggressive non-Hodgkin's lymphoma, *Leuk Lymphoma* 47 (2006) 623-627.
- [21] G. Levan Nomenclature for G-bands in rat chromosomes, *Hereditas* 77 (1974) 37-52.
- [22] M.D. Damewood and L.B. Grochow Prospects for fertility after chemotherapy or radiation for neoplastic disease, *Fertil Steril* 45 (1986) 443-459.
- [23] J. Waxman Preserving fertility in Hodgkin's disease, *Baillieres Clin Haematol* 1 (1987) 185-190.
- [24] I. Martinez-Flores, J. Egozcue and M. Garcia Effects on female fertility and germinal cells in prepubertal and adult rats (*Rattus norvegicus*) after X-ray irradiation, *Adv Exp Med Biol* 444 (1998) 215-219.
- [25] M. Sugiyama, A. Imai, S. Takahashi, S. Hirano, T. Furui and T. Tamaya Advanced indications for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogues in gynecological oncology (review), *Int J Oncol* 23 (2003) 445-452.
- [26] S. Falorio, F. Angrilli and G. Fioritoni Gonadotropin-releasing hormone analog treatment for the prevention of treatment-related ovarian failure and infertility in women of reproductive age with Hodgkin lymphoma, *Leuk Lymphoma* 49 (2008) 1087-1093.
- [27] M. Torres Mde, N. Donadio, N.F. Donadio, A.C. Brandao and B. Heck Comparison of embryo implantation in Wistar rats that underwent ovarian stimulation using exogenous gonadotropins associated with cetrorelix acetate or leuprolide acetate, *Fertil Steril* 84 Suppl. 2 (2005) 1235-1240.

## 4.4. Treball IV



**Cromosomes i bandes cromosòmiques genèticament inestables  
en *Rattus norvegicus***

*(en redacció)*



Paral·lelament a tots aquests estudis fonamentalment quantitius (treballs I, II i III), s'ha fet una anàlisi qualitativa dels cromosomes i de les bandes cromosòmiques implicades en els efectes (i) transgeneracionals de la radiació ionitzant, (ii) de l'afidicolina i (iii) de l'anàleg agonista de la GnRH triptorelina. Altrament, la detecció dels llocs fràgils i de les seqüències telomèriques intersticials ha permès caracteritzar millor les regions inestables en l'arquitectura genòmica de l'espècie *Rattus norvegicus*, SD.



## RESULTATS

### 4.4.1. Inestabilitat cromosòmica i radioprotecció per l'anàleg agonista de l'hormona alliberadora de gonadotrofines

S'han estudiat els cromosomes i les bandes cromosòmiques implicats en la inestabilitat cromosòmica (CI) espontània i en la inestabilitat cromosòmica radioinduïda (RICI) transgeneracional de l'espècie *Rattus norvegicus* (RNO, SD), així com la seva relació amb la radioprotecció proporcionada per l'anàleg agonista de la GnRH (GnRHa).

Els diferents idiogrames en les **figures 1, 2 i 3** mostren tots els punts de trencament implicats en les alteracions cromosòmiques (AC), discontinuïtats (*gaps* i trencaments) i reordenacions de la seqüència genòmica (alteracions intracromosòmiques i intercromosòmiques).

#### **Els cromosomes**

Els resultats de l'anàlisi estadística ens mostren que hi ha cromosomes significativament més implicats i altres de menys implicats en la CI espontània i en la RICI transgeneracional (test de  $\chi^2$ ,  $p \leq 0'05$ ).

Els cromosomes RNO1 i RNO3 són els que presenten més trencaments dels esperats de manera estadísticament significativa en tots els grups de tractament (**figures 1, 2 i 3, taula 1**). En realitat, són cromosomes inestables perquè presenten CI en els grups control, en els tractats únicament per l'GnRHa i en tots els grups sotmesos a radiacions. Aquests cromosomes, juntament amb l'RNO2, inclouen les bandes cromosòmiques que es trenquen més freqüentment de l'esperat de manera estadísticament significativa en tots els grups de tractament (RNO1q22, RNO1q43, RNO2q32 i RNO3p12).

Per contra, hi ha una sèrie de cromosomes que han resultat tenir menys trencaments que els esperats (de manera estadísticament significativa). Són els cromosomes RNO16, RNO17 i RNOX, seguits dels cromosomes RNO9 i RNO14 (**taula 1**).

Els cromosomes RNO1, RNO2 i RNO3 estan implicats en un nombre considerable d'AC (RNO1 (40), RNO2 (16) i RNO3 (51), **figura 4 i taula 2**). Aquestes AC són de diversos tipus, incloent-hi translocacions, inversions, cromosomes dicèntrics, delecions i reorganitzacions cromosòmiques complexes (**figura 4, taula 2**). Cal remarcar la relació entre els cromosomes RNO3 i RNO11 i també entre els cromosomes RNO11 i RNO12, que sovint estan implicats en la mateixa alteració cromosòmica (AC). Al mateix temps, diverses AC contenen, d'una banda, els dos cromosomes homòlegs del parell RNO1 i d'altres, els dos homòlegs del parell RNO3 (**taula 2**).

#### **Les bandes cromosòmiques**

L'anàlisi estadística ens mostra que hi ha bandes cromosòmiques més implicades i altres de menys implicades de manera significativa en la RICI dels fetus de femelles irradiades.

La **taula 3** presenta la llista de les bandes cromosòmiques més freqüentment implicades o menys freqüentment implicades en trencaments (test de  $\chi^2$ ,  $p \leq 0'05$ ). Hi ha quatre bandes cromosòmiques que han resultat tenir més trencaments dels esperats en tots els grups de tractament de manera estadísticament significativa: RNO1q22, RNO1q43, RNO2q32 i RNO3p12. Altrament, hi ha dues bandes cromosòmiques amb resultats estadísticament significatius (RNO1q34 i RNO2q34) en tots quatre grups irradiats (C + 5, C + 12, A + 5 i A + 12). Cal remarcar que les bandes cromosòmiques RNO1q42 i RNO11p12 apareixen només en els grups irradiats sense GnRHa. D'altra banda, les bandes cromosòmiques RNO16q12 i RNO17q12 han resultat tenir menys trencaments dels esperats de manera estadísticament significativa.

Les bandes cromosòmiques amb resultats estadísticament significatius (**taula 3**) intervenen en diferents tipus d'AC amb reordenació de la seqüència: translocacions, fusions, cromosomes dicèntrics i reorganitzacions cromosòmiques. Hi ha tres bandes cromosòmiques (RNO1q22, RNO3p12 i RNO11p12) implicades en diverses AC diferents (**figura 4, taula 4**). La banda RNO1q43 està implicada només en una AC d'aquest tipus i algunes d'elles (RNO1q42 i RNO2q32) no estan implicades en aquest tipus d'AC encara que es trenquin més freqüentment de l'esperat de manera estadísticament significativa en diversos grups de tractament. Així doncs, el fet que una banda estigui implicada en inestabilitat cromosòmica no vol dir necessàriament que hagi d'intervenir en AC de reordenació de la seqüència del DNA.

Cal destacar la troballa d'una translocació constitucional materna [t(11;12)(p12;q10)], detectada en tots els fetus analitzats d'aquesta mare. La banda cromosòmica RNO11p12 està implicada en altres alteracions, sobretot translocacions i reorganitzacions cromosòmiques complexes, conjuntament amb la banda cromosòmica RNO3p12, que es trenca més freqüentment de l'esperat de manera estadísticament significativa en tots els grups (**taula 4**).

Cap de les quatre bandes amb més trencaments dels esperats de manera estadísticament significativa en tots el grups de tractament es corresponen amb heterocromatina constitutiva.

#### 4.4.2. Efectes de l'afidicolina a *Rattus norvegicus* <sup>(1)</sup>

S'han estudiat les bandes cromosòmiques més afectades per un mutagen químic, l'afidicolina (apc). S'han analitzat un total de nou fetus provinents de quatre femelles diferents d'RNO. S'han seguit els criteris i metodologia de l'anàlisi de la inestabilitat cromosòmica descrits a Materials i mètodes.

S'han analitzat un total de 1.326 metafases de fibroblasts fetals, en les quals s'han comptabilitzat 263 *gaps* i trencaments de cromàtide i de cromosoma. Posteriorment, el programa estadístic FSM (versió 995, Böhm *et al.*, 1995) ens ha permès detectar les bandes cromosòmiques d'interès.

(1) Aquests resultats formen part del treball II

S'han identificat disset bandes cromosòmiques d'RNO en les quals el nombre de trencaments observats és més gran que l'esperat de manera estadísticament significativa ( $p \leq 0,05$ , **taula 5**).

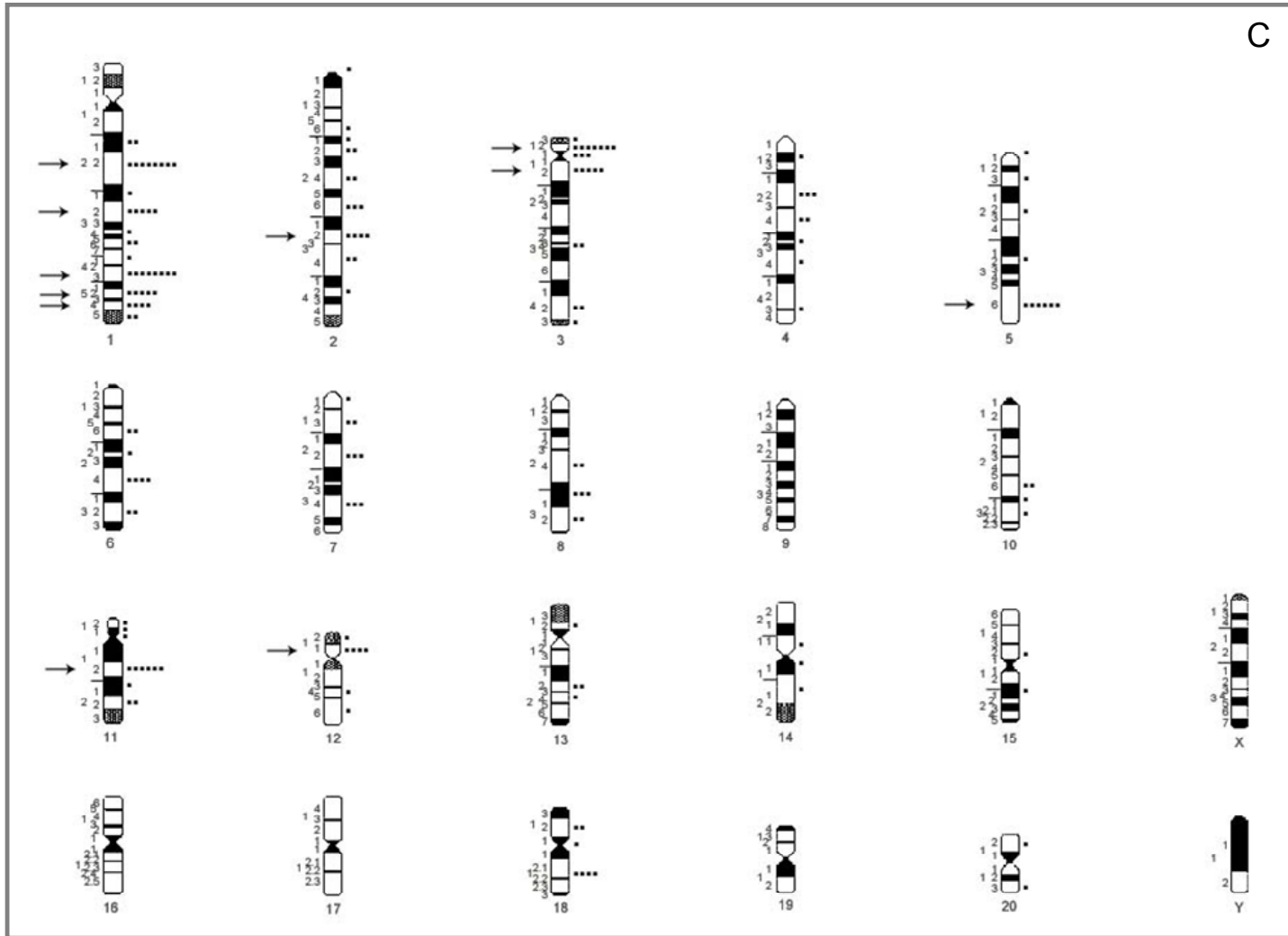
#### 4.4.3. Llocs fràgils a *Rattus norvegicus*

S'ha dut a terme la identificació dels llocs fràgils (LLF) induïts per apc en fibroblasts fetals de *Rattus norvegicus*. Per descriure'n l'expressió, s'han analitzat un total de dinou fetus provinents de tres femelles diferents. S'han seguit els criteris i la metodologia de Ruiz-Herrera *et al.*, 2002b, descrits a Materials i mètodes.

S'han analitzat un total de 1.740 metafases, en les quals s'han detectat 376 *gaps* i trencaments de cromàtide i de cromosoma. El programa estadístic FSM (versió 995) d'identificació de LLF, creat i utilitzat per Böhm *et al.* (1995), ens ha permès caracteritzar set LLF concentrats en cinc cromosomes: RNO2q24, RNO3q12, RNO3q21, RNO4q31, RNO7q34, RNOXq21 i RNOXq22 (**figura 6**).

Hi ha estudis anteriors (Robinson and Elder, 1987; Elder and Robinson, 1989) en els quals s'han analitzat els LLF en espècies de rosegadors, en RNO i ratolí, però la metodologia i els criteris emprats són diferents i això ens ha dificultat l'anàlisi comparativa amb els nostres resultats. El LLF RNOXq21 en fibroblasts fetals d'RNO també ho és en limfòcits d'RNO (Robinson and Elder, 1987). De tota manera, tots els LLF que hem caracteritzat en RNO colocalitzen amb LLF de l'espècie humana (HSA), exceptuant-ne RNOXq21 (**figura 6**, Human Gene Mapping 11, 1991). Els LLF RNO7q34 i RNOXq22 són destacables ja que colocalitzen també amb LLF d'altres espècies de primats no humans: *Macaca fascicularis* (Ruiz-Herrera *et al.*, 2002b), *Mandrillus sphinx* (Ruiz-Herrera *et al.*, 2005a) i *Cebus apella* (Ruiz-Herrera *et al.*, 2004). RNO7q34 colocalitza també amb LLF d'alguns homínids (Smeets and Van de Klunder, 1990).

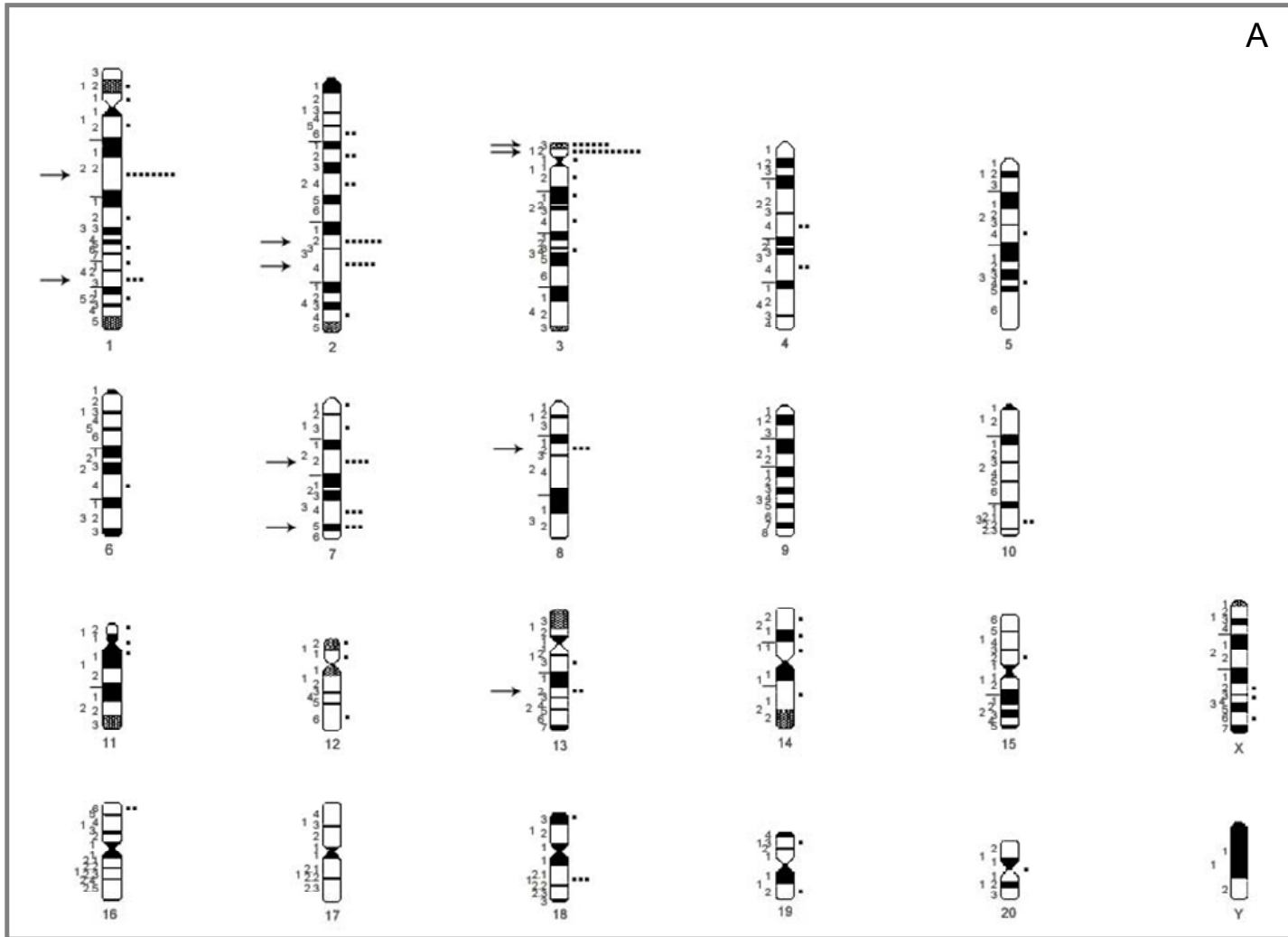
1a



C

**Figura 1a.** Idiograma de bandes G dels cromosomes de *R. norvegicus* que mostren les bandes cromosòmiques implicades en punts de trencament en els grups control (C). S'hi indiquen les vegades que s'han observat trencaments en cada banda cromosòmica (■) i les bandes cromosòmiques amb un nombre estadísticament significatiu més alt de trencaments (→) de l'esperat.

1b

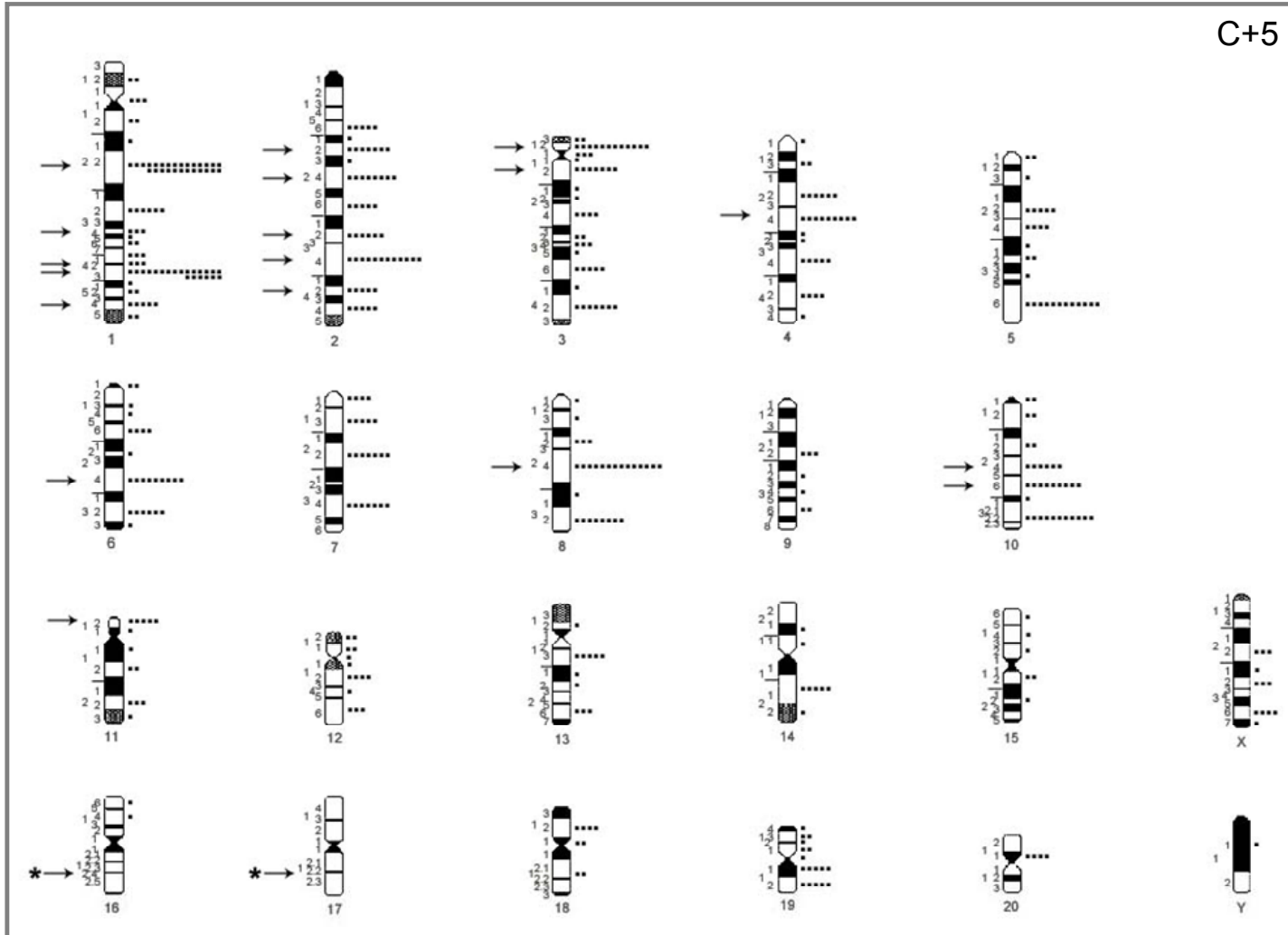


A

**Figura 1b.** Idiograma de bandes G dels cromosomes de *R. norvegicus* que mostren les bandes cromosòmiques implicades en punts de trencament en els grups de tractament amb l'GnRH<sub>a</sub> (A). S'hi indiquen les vegades que s'han observat trencaments en cada banda cromosòmica (■) i les bandes cromosòmiques amb un nombre estadísticament significatiu més alt de trencaments (→) de l'esperat.

2a

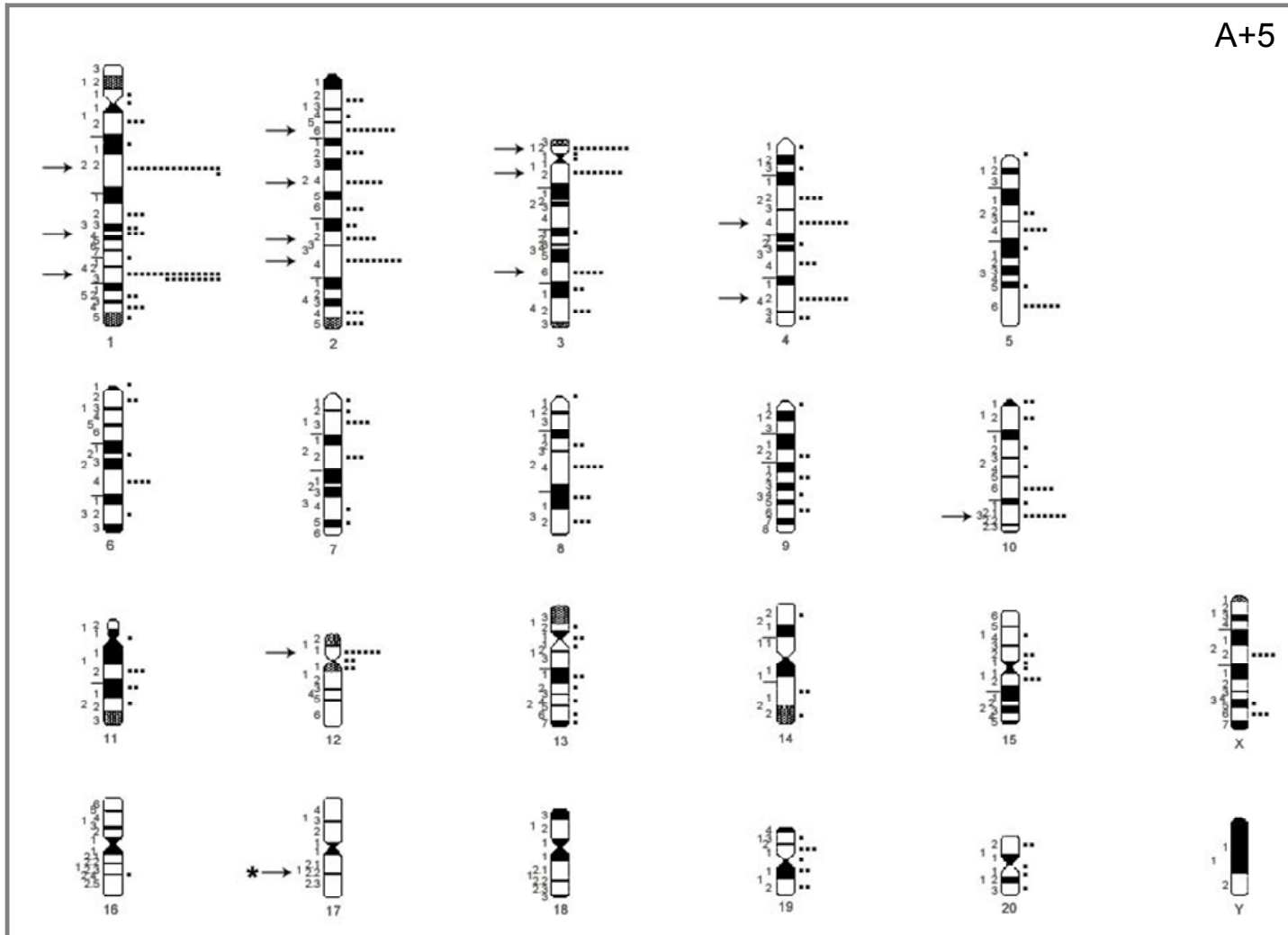
C+5



**Figura 2a.** Idiograma de bandes G dels cromosomes de *R. norvegicus* que mostren les bandes cromosòmiques implicades en punts de trencament en els grups irradiats a 5 Gy (C + 5). S'hi indiquen les vegades que s'han observat trencaments en cada banda cromosòmica (■) i les bandes cromosòmiques amb un nombre estadísticament significatiu més alt (→) i més baix (\*) de trencaments de l'esperat.

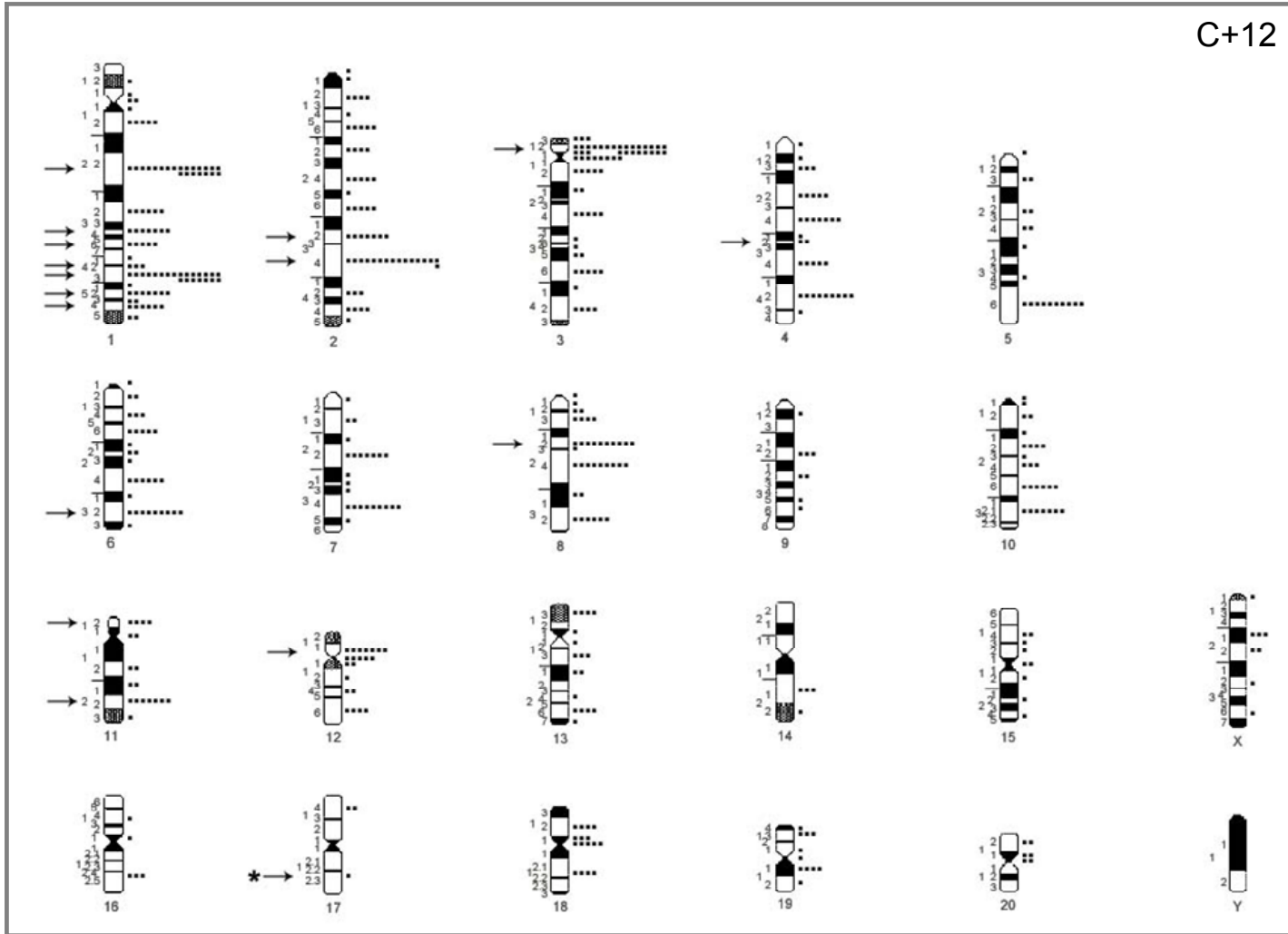
2b

A+5



**Figura 2b.** Idiograma de bandes G dels cromosomes de *R. norvegicus* que mostren les bandes cromosòmiques implicades en punts de trencament en els grups tractats amb l'GnRH $\alpha$  i irradiats a 5 Gy (A + 5). S'hi indiquen les vegades que s'han observat trencaments en cada banda cromosòmica (■) i les bandes cromosòmiques amb un nombre estadísticament significatiu més alt (→) i més baix (\*) de trencaments de l'esperat.

3a

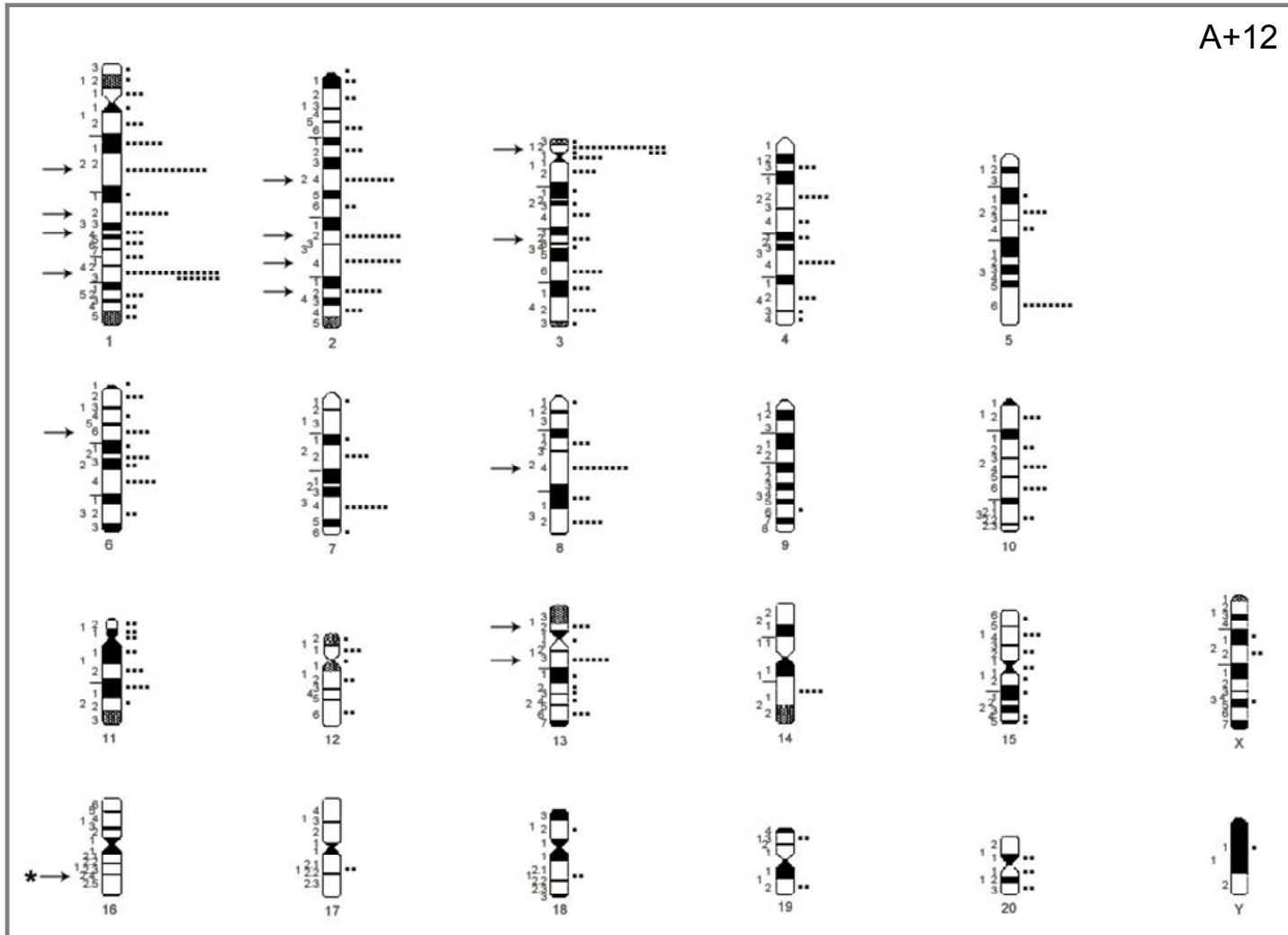


**Figura 3a.** Idiograma de bandes G dels cromosomes de *R. norvegicus* que mostren les bandes cromosòmiques implicades en punts de trencament en els grups irradiats a 12 Gy (C + 12). S'hi indiquen les vegades que s'han observat trencaments en cada banda cromosòmica (■), les bandes cromosòmiques amb un nombre estadísticament significatiu més alt (→) i més baix (\*) de trencaments de l'esperat.



3b

A+12



**Figura 3b.** Idiograma de bandes G dels cromosomes de *R. norvegicus* que mostren les bandes cromosòmiques implicades en punts de trencament en els grups tractats amb GnRH*a* i irradiats a 12 Gy (A + 12). S'hi indiquen les vegades que s'han observat trencaments en cada banda cromosòmica (■), les bandes cromosòmiques amb un nombre estadísticament significatiu més alt (→) i més baix (\*) de trencaments de l'esperat.

**Taula 1.** Cromosomes implicats de manera estadísticament significativa en la inestabilitat cromosòmica <sup>(1)</sup>

Cromosomes	C	A	C + 5	C + 12	A + 5	A + 12	Total	Cromosomes
1	■	■	■	■	■	■	■	1
2	■	■	■	■	■	■	■	2
3	■	■	■	■	■	■	■	3
4								4
5				■			■	5
6								6
7		■						7
8				■			■	8
9	■		■	■		■	■	9
10			■		■		■	10
11	■							11
12	■			■	■		■	12
13								13
14			■	■	■	■	■	14
15			■	■	■	■	■	15
16	■		■	■	■	■	■	16
17	■		■	■	■	■	■	17
18					■	■	■	18
19								19
20							■	20
X	■		■	■	■	■	■	X
Totals	8	4	9	11	10	9	15	Totals

C controls

A tractats amb triptorelina

C + 5 irradiats a 5 Gy

C + 12 irradiats a 12 Gy

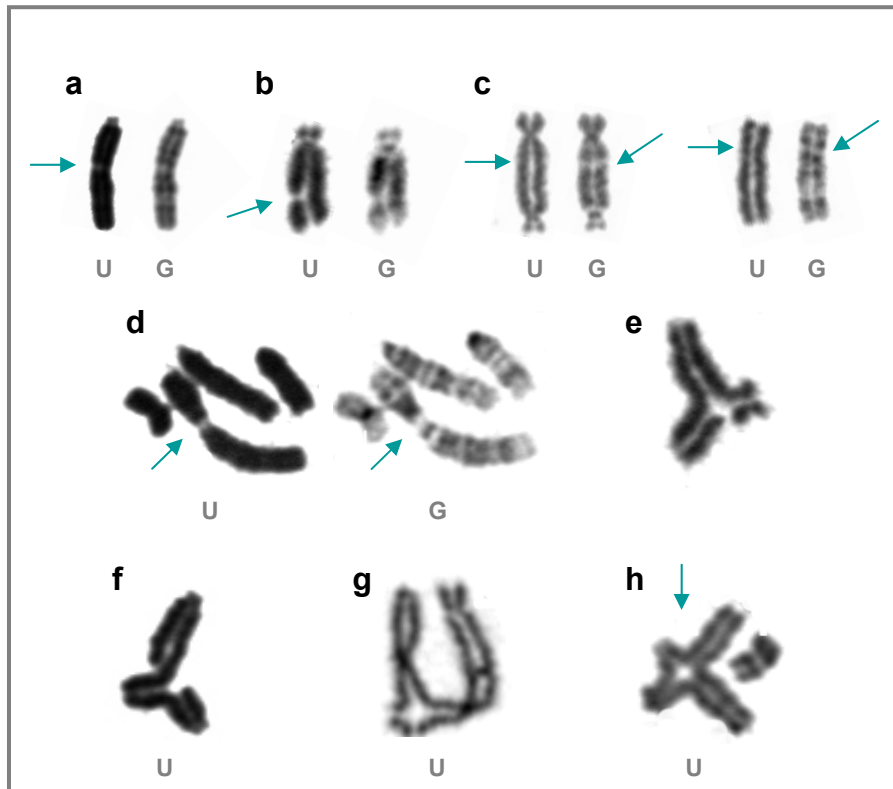
A + 5 irradiats a 5 Gy i tractats amb triptorelina

A + 12 irradiats a 12 Gy i tractats amb triptorelina

(1) Resultats obtinguts amb un test de  $\chi^2$  amb correcció de Yates i tenint en compte la llargada en parells de base ([www.ensembl.org/Rattus norvegicus](http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus))

En vermell Cromosomes amb nombre significativament més alt de punts de trencament que l'esperat

En blau Cromosomes amb nombre significativament més baix de punts de trencament que l'esperat



**Figura 4.** Exemples d'alteracions cromosòmiques trobades durant l'anàlisi citogenètica: (a) *gap* de cromàtide chtg(2q24); (b) trencament de cromàtide chtb(3q36); (c) cromosoma dicèntric dic(1;3)(q22;q36) amb els seus corresponents acèntrics fusionats f(1;3)(q22q55;q36q43); (d) translocació t(3;11)(p12;p11) i (e-h) diferents reorganitzacions cromosòmiques entre dos cromosomes. U: tinció uniforme; G: tècnica de bandes G.

**Taula 2.** Implicació en alteracions cromosòmiques<sup>(1)</sup> dels cromosomes RNO1, RNO2 i RNO3

Cromosoma	Alteració cromosòmica	Descripció de l'alteració cromosòmica	nre
<b>RNO1</b>	<b>t(1;1)</b>	(2) t(1;1)(p13;p?)	
	<b>t(1;3)</b>	(3) f(1;3)(q22q55;q36q43)	
	<b>t(1;?)</b>	t(1;?)	
	<b>f(1;3)</b>	(3) t(1;3)(q34;p12)	
	<b>f(1;?)</b>	f(1;?)	
	<b>inv(1)</b>	inv(1)(p12q51)	
	<b>re(1;2)</b>	(3) re(1;2)(q22;q34)	
	<b>re(1;4)</b>	re(1;4)(q22;q12)	
	<b>re(1;5)</b>	re(1;5)(q43;q36)	
	<b>re(1;5)</b>	re(1;5)(q52/54;q22)	
	<b>re(1;7)</b>	re(1;7)	
	<b>re(1;8;?)</b>	re(1;8;?)	2
	<b>re(1;12)</b>	re(1;12)(q35;p12)	
	<b>re(1;13)</b>	re(1;13)(q33;q27)	
	<b>re(1;18)</b>	re(1;18)(q55;p12)	
	<b>re(1;X)</b>	re(1;X)(q54;q36)	
	<b>re(1;?)</b>	re(1;?)(p52;q?)	
	<b>re(1;?)</b>	re(1;?)(q32;q?)	
	<b>re(1;?)</b>	re(1;?)(q32;?)	
	<b>re(1;?)</b>	re(1;?)(q?;q?)	2
	<b>re(1;?)</b>	re(1;?)(?;?)	
	<b>dic(1;3)</b>	(3) dic(1;3)(q22;q36)	
	<b>del chs(1)</b>	del chs(1p?)	
	<b>del cht(1)</b>	del cht(1p12p13)	3
	<b>del cht(1)</b>	del cht(1p12/1p13)	
	<b>del cht(1)</b>	del cht(1q52q55)	3
	<b>del cht(1)</b>	del cht(1q54q55)	2
	<b>del cht(1)</b>	del cht(1q55), microdeleció	
	<b>del cht(1)</b>	del cht(1q41?q55)	
	<b>del cht(1)</b>	del cht(1q54/1q55)	
<b>del cht(1)</b>	del cht(1)	3	
<b>RNO2</b>	<b>f(2;4)</b>	f(2;4?)	
	<b>f(2;6)</b>	f(2;6)(q10;q10)	
	<b>f(2;13)</b>	f(2;13)(q10;q13q27)	
	<b>re(1;2)</b>	(3) re(1;2)(q22;q34)	
	<b>re(2;5)</b>	re(2;5)(q34;q36)	
	<b>re(2;10)</b>	re(2;10)(q32;q26)	
	<b>re(2;12)</b>	re(2;12)(q42;q12)	
	<b>del cht(2)</b>	del cht(2q32q45)	
	<b>del cht(2)</b>	del cht(2q34q45)	
	<b>del cht(2)</b>	del cht(2q42q45)	
	<b>del cht(2)</b>	del cht(2q44q45)	5
	<b>del cht(2)</b>	del cht(2q45q45)	

(1) s'hi inclouen totes les alteracions cromosòmiques (exceptuant-ne les discontinuïtats *gaps* i trencaments de cromosoma i de cromàtide)

nre nombre de vegades en què s'observa l'alteració cromosòmica

(2) alteració cromosòmica amb tots dos cromosomes homòlegs implicats

(3) alteració cromosòmica entre els cromosomes més freqüentment implicats en alteracions cromosòmiques

**Taula 2** (cont.). Implicació en alteracions cromosòmiques<sup>(1)</sup> dels cromosomes RNO1, RNO2 i RNO3

Cromosoma	Alteració cromosòmica	Descripció de l'alteració cromosòmica	nre
<b>RNO3</b>	<b>t(1;3)</b>	t(1;3)(q34;p12)	
	<b>t(3;3)</b>	(2) t(3;3)(q10;q10)	
	<b>t(3;10)</b>	t(3;10)(q10;q10)	
	<b>t(3;11)</b>	t(3;11)(p12;p12)	2
	<b>t(3;11)</b>	t(3;11)(p12;p11)	
	<b>t(3;12)</b>	t(3;12)(q10;q10)	
	<b>t(3;?)</b>	t(3;?)(?;?)	
	<b>f(1;3)</b>	(3) f(1;3)(q22q55;q36q43)	
	<b>f(3;3)</b>	(2) f(3;3)(p13;p12)	
	<b>f(3;3)</b>	(2) f(3;3)(p12;p12)	
	<b>f(3;3)</b>	(2) f(3;3)(q10;q10)	
	<b>f(3;6)</b>	f(3;6)(p13;q11)	
	<b>f/t(3;?)</b>	f/t(3;?)(p13;q10)	
	<b>f/t(3;11)</b>	f/t(3;11)(p13;p12)	
	<b>f/t(3;18)</b>	f/t(3;18)(p13;p13)	
	<b>re(3;3)</b>	(2) re(3;3)(p12;p12)	
	<b>re(3;11)</b>	re(3;11)(p12;p12)	2
	<b>re(3;14)</b>	re(3;14)(q36;q21)	
	<b>re(3;20)</b>	re(3;20)(q12;q13)	
	<b>re(3;?)</b>	re(3;?)(q31;?)	
	<b>re(3;?)</b>	re(3;?)(q?;q?)	
	<b>re(3;?)</b>	re(?;3)(?;q24)	
	<b>dic(1;3)</b>	(3) dic(1;3)(q22;q42)	
	<b>del chs(3)</b>	del chs(3p13p13)	
	<b>del chs(3)</b>	del chs(3p12p13)	3
	<b>del chs(3)</b>	del chs(3q36q43)	
	<b>del chs(3)</b>	del chs(3p12p13)	3
	<b>del chs(3)</b>	del chs(3q13p13)	
	<b>del chs(3)</b>	del chs(3q42q43)	
	<b>del chs(3)</b>	del chs(3p13p13)	
	<b>del cht(3)</b>	del cht(3p12p13)	9
	<b>del cht(3)</b>	del cht(3p11p13)	
	<b>del cht(3)</b>	del cht(3q24q43)	
<b>del cht(3)</b>	del cht(3q42q43)	3	
<b>del cht(3)</b>	del cht(3q43), microdeleció		

(1) s'hi inclouen totes les alteracions cromosòmiques (exceptuant-ne les discontinuïtats *gaps* i trencaments de cromosoma i de cromàtide)

nre nombre de vegades en què s'observa l'alteració cromosòmica

(2) alteració cromosòmica amb tots dos cromosomes homòlegs implicats

(3) alteració cromosòmica entre els cromosomes més freqüentment implicats en alteracions cromosòmiques

**Taula 3.** Bandes cromosòmiques implicades de manera estadísticament significativa en la inestabilitat cromosòmica<sup>(1,2)</sup>

Bandes	C	A	C+5	C+12	A+5	A+12
1q22	1q22	1q22	1q22	1q22	1q22	1q22
1q32	1q32					1q32
1q34			1q34	1q34	1q34	1q34
1q36				1q36		
1q42			1q42	1q42		
1q43	1q43	1q43	1q43	1q43	1q43	1q43
1q52	1q52			1q52		
1q54	1q54		1q54	1q54		
2q16					2q16	
2q22			2q22			
2q24			2q24		2q24	2q24
2q32	2q32	2q32	2q32	2q32	2q32	2q32
2q34		2q34	2q34	2q34	2q34	2q34
2q42			2q42			2q42
3p13		3p13				
3p12	3p12	3p12	3p12	3p12	3p12	3p12
3q12	3q12		3q12		3q12	
3q32						3q32
3q34			3q34			
3q36					3q36	
4q24			4q24		4q24	
4q32				4q32		
4q42					4q42	
5q36	5q36		5q36			
6q22						6q22
6q24			6q24			
6q32				6q32		
7q22		7q22				
7q35		7q35				
8q22		8q22		8q22		
8q24			8q24			8q24
10q24			10q24			
10q26			10q26			
10q32					10q32	
11p12			11p12	11p12		
11q12	11q12					
11q22				11q22		
12p11	12p11			12p11	12p11	
13p12						13p12
13q13						13q13
13q22		13q22				
16q12			16q12			16q12
17q12			17q12	17q12	17q12	
	43	11	10	22	17	15

(1) Resultats obtinguts amb un test de  $X^2$  amb correcció de Yates i tenint en compte la llargada en parells de bases ([www.ensembl.org/Rattus\\_norvegicus](http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus))

(2) Els trencaments en els centròmers i en el cromosoma RNOY no es tenen en compte en l'anàlisi estadística

C Controls

A Tractats amb triptorelina

C + 5 Irradiats a 5 Gy

C + 12 Irradiats a 12 Gy

A + 5 Tractats amb triptorelina i irradiats a 5 Gy

A + 12 Tractats amb triptorelina i irradiats a 12 Gy

En vermell Bandes cromosòmiques amb un nombre significativament més alt de punts de trencament que l'esperat

En blau Bandes cromosòmiques amb un nombre significativament més baix de punts de trencament que l'esperat

En taronja Bandes cromosòmiques a C i A

En verd Bandes cromosòmiques a C + 5, C + 12, A + 5 i A + 12

En violeta Bandes cromosòmiques només a C + 5 i C + 12

En negreta Bandes cromosòmiques cromosòmiques amb resultats estadísticament significatius en tots els grups

**Taula 4.** Implicació en alteracions cromosòmiques<sup>(1)</sup> de les bandes estadísticament significatives més rellevants

Bandes	Alteració cromosòmica	nre
<b>1q22</b>	f(1;3)(q22q55;q36q43) dic(1;3)(q22;q42) re(1;2)(q22;q34) re(1;4)(q22;q12)	
<b>1q34</b>	t(1;3)(q34;p12)	
<b>1q42</b>	no	
<b>1q43</b>	re(1;5)(q43;q36)	
<b>1q54</b>	re(1;5)(q52/54;q22) re(1;X)(q54;q36)	
<b>2q32</b>	no	
<b>2q34</b>	re(1;2)(q22;q34)	
<b>3p12</b>	t(1;3)(q34;p12) t(3;11)(p12;p12) t(3;11)(p12;p11) f(3;3)(p13;p12) f(3;3)(p12;p12) re(3;3)(p12;p12) re(3;11)(p12;p12)	2      2
<b>11p12</b>	t(3;11)(p12;p12) t(11;12)(p12;p12) t(11;12)(p12;p11) t(11;12)(p12;q10) (*) f/t(3;11)(p13;p12) r(11p12q12)+ace chs(11q12q23) re(3;11)(p12;p12) re(4;10;11)(q32;q26;11p12) re(11;12)(p12;q11)	2 2     2

(1) s'hi inclouen totes les alteracions cromosòmiques (exceptuant-ne les discontinuïtats *gaps* i trencaments de cromàtide)

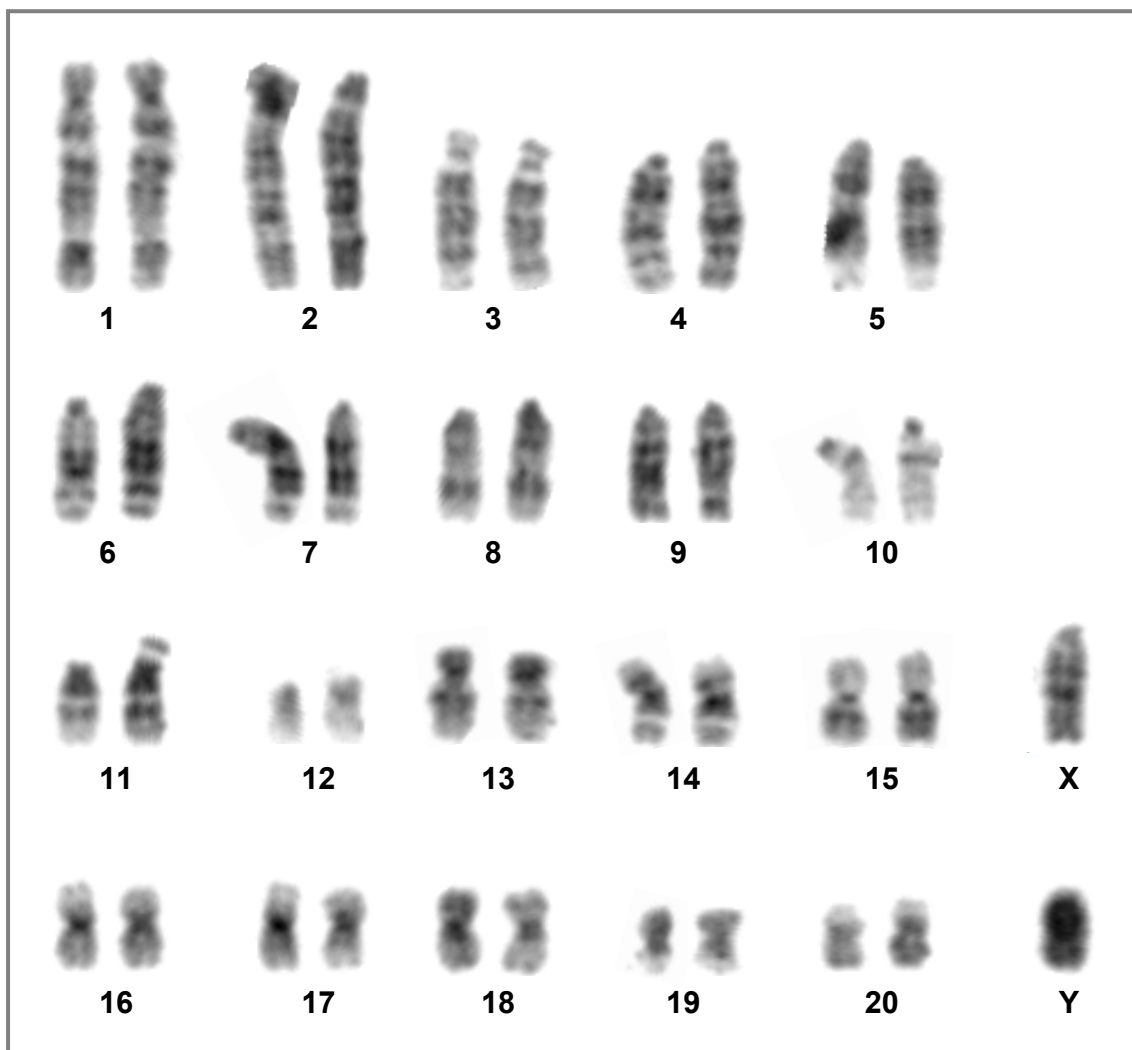
nre número de vegades en les què s'observa l'alteració cromosòmica

(\*) translocació constitucional materna, identificada en tots els fetus analitzats d'aquesta mare

**Taula 5.** Bandes cromosòmiques més afectades de manera estadísticament significativa per afidicolina

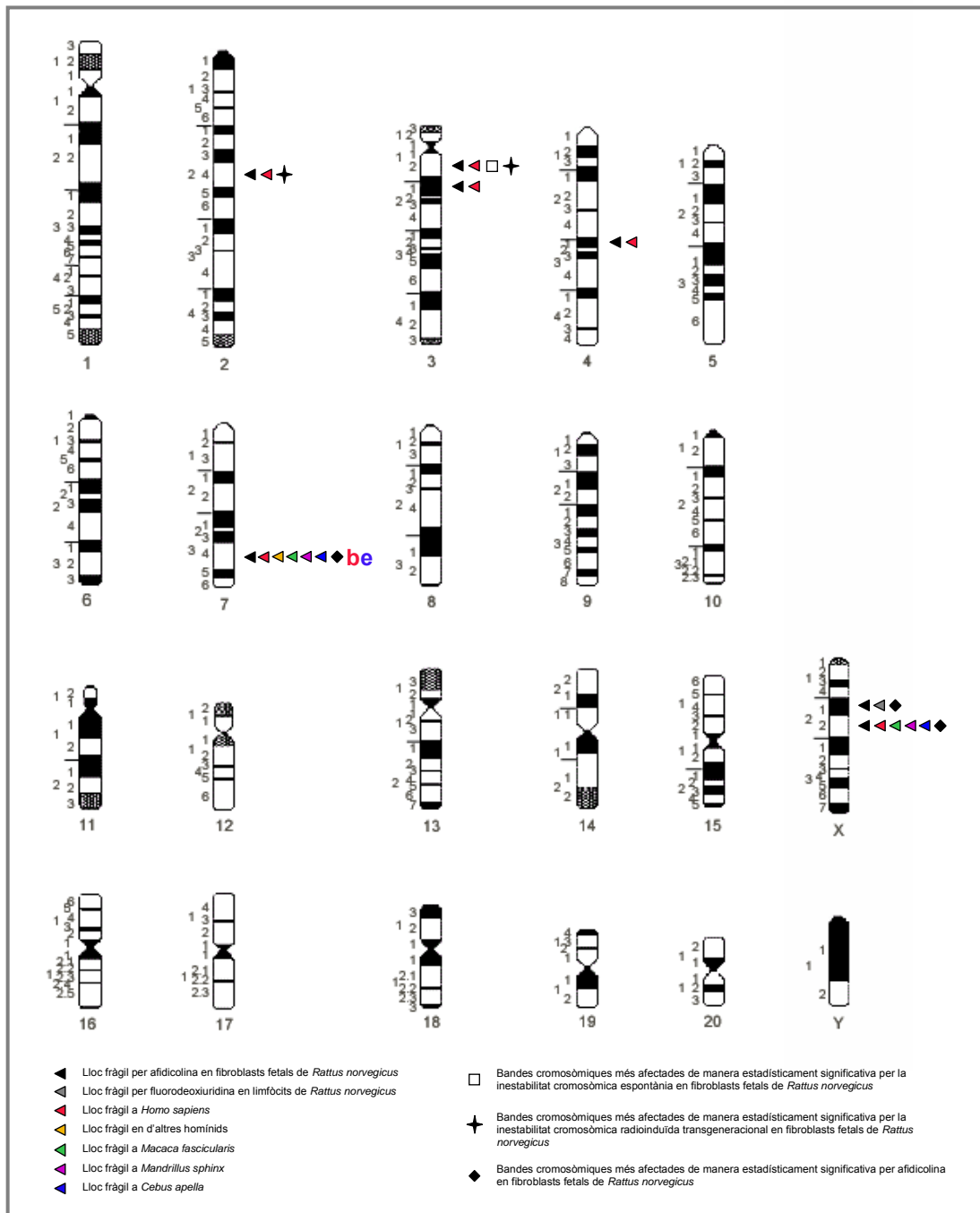
Bandes
1q22 (*)
1q52 (*)
2q24 (*)
3q12 (*)
3q36 (*)
4q22
4q24 (*)
4q31
5q36 (*)
6q24 (*)
7q13
7q34
11q22 (*)
15q21
18q12
Xq21
Xq22
17

(\*) coincidència amb les bandes amb resultats estadísticament significatius per RICI transgeneracional en rata

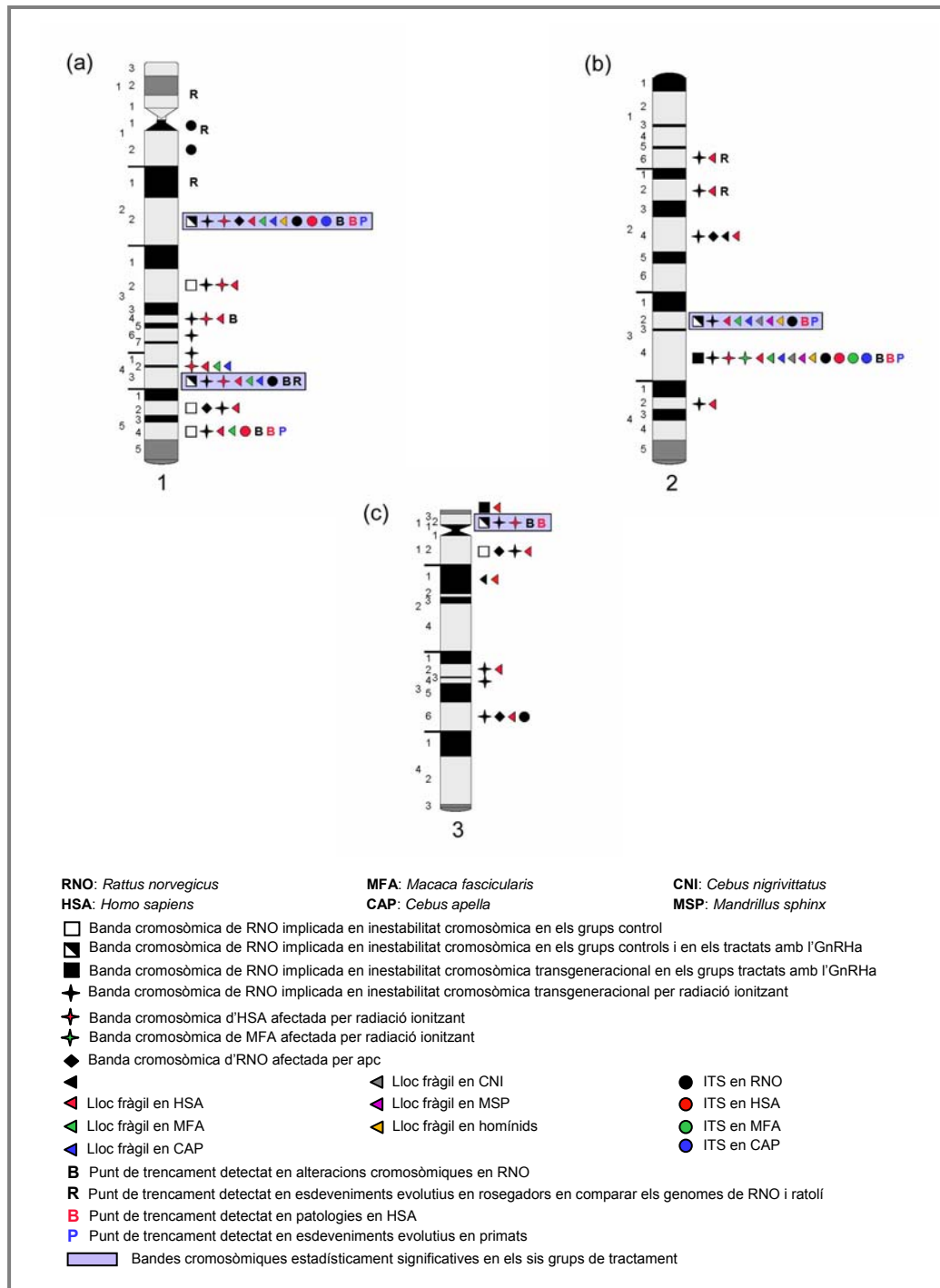


**Figura 5.** Cariotip amb bandes G de l'espècie *Rattus norvegicus*, caracteritzats per l'anàlisi citogenètica.





**Figura 6.** Idiograma de bandes G dels cromosomes de l'espècie *Rattus norvegicus* que mostren els llocs fràgils per afidicolina en fibroblasts fetals, la seva colocalització amb llocs fràgils de la mateixa i d'altres espècies i la seva coincidència amb regions cromosòmiques inestables de l'espècie.



**Figura 7.** Idiogrames dels cromosomes (a) RNO1, (b) RNO2 i (c) RNO3. S'hi indiquen les bandes cromosòmiques implicades en la inestabilitat cromosòmica espontània, en la inestabilitat cromosòmica transgeneracional per radiacions ionitzants; així com les considerades llocs fràgils (LLF) per afidicolina en fibroblasts fetals i les que contenen seqüències telomèriques intersticials (ITS) en *Rattus norvegicus*. S'hi indica també si són homòlogues amb bandes que es trenquen de manera estadísticament significativa per radiació ionitzant, amb LLF i amb ITS en altres espècies; i si són homòlogues amb bandes implicades en patologies humanes i en esdeveniments evolutius en els grups dels rosegadors i dels primats.

## DISCUSSIÓ

En aquest treball es presenta la primera anàlisi qualitativa dels efectes transgeneracionals de la radiació ionitzant amb GnRH i sense. Les eines mitjançant les quals s'han caracteritzat les regions genòmicament inestables de l'espècie d'RNO han estat les pròpies de la citogenètica clàssica i de la citogenètica molecular.

En general, els cromosomes de mida mitjana/petita presenten menys punts de trencament que els esperats, mentre que els cromosomes de mida gran/mitjana en tenen més que l'esperat (**taula 1**).

Els cromosomes RNO1 i RNO3 són els més inestables del cariotip d'RNO: són els més afectats de manera estadísticament significativa, tant pel que fa a la inestabilitat cromosòmica espontània com a la CI radioinduïda transgeneracional (**figures 1, 2 i 3, taula 1**).

En el cas dels cromosomes RNO16 i RNO17, aquesta significació a la baixa podria ser causada per raons metodològiques (treball I). Els cromosomes 16 i 17 són cromosomes amb una morfologia molt semblant. Durant l'anàlisi citogenètica, en nombroses ocasions, aquest cromosomes no es podien distingir entre ells. De la mateixa manera, de vegades, tot i identificar-ne el cromosoma, no es podia determinar si l'alteració es trobava en el braç p o q. Aquests trencaments no s'han inclòs ni en el recompte de bandes ni en els resultats finals (treball I).

En canvi, si parlem de la resta de cromosomes de mida mitjana amb un nombre significativament més baix de trencaments que l'esperat (RNO9, RNO14, RNO15, RNOX), no hi ha biax en els resultats pel que fa a la identificació dels cromosomes. Aquests cromosomes no s'han mostrat cromosòmicament inestables ni de manera espontània ni radioinduïda. De tota manera, en l'exhaustiva anàlisi portada a terme, s'hi han identificat discontinuïtats i altres AC.

Entre aquests cromosomes amb un nombre de trencaments significativament més baix de l'esperat, cal destacar el cromosoma RNOX que, malgrat que es mostra estable pel que fa als efectes transgeneracionals de la RI, és molt sensible als efectes del mutagen químic apc (RNOXq21 i RNOXq22, **figura 6, taula 5**).

De les quaranta bandes cromosòmiques més afectades de manera estadísticament significativa per RICl transgeneracional, nou ho són també pel mutagen químic apc (22,5 %). Dues (5 %) coincideixen amb LLF d'RNO i sis d'aquestes bandes (15 %) contenen ITS (considerats freqüents i molt freqüents, treball I) identificats en RNO. La banda cromosòmica RNO11q12, que presenta només CI espontània, també conté ITS. A més, de les bandes considerades més importants per CI (estadísticament significatives en els sis grups de tractament), només la banda RNO1q22 està afectada de manera significativa per apc, a la vegada que conté ITS (**figura 6, taules 3 i 5**).

Pel que fa a les disset bandes més afectades de manera estadísticament significativa pel mutagen químic apc, nou coincideixen amb bandes afectades per la RICl transgeneracional (52,9 %). D'altra banda, dels set LLF en RNO, només dues (RNO2q24, RNO3q12; 28,6 %) coincideixen amb bandes afectades per aquesta RICl transgeneracional (**figura 6, taules 3 i 5**).

Malgrat la diferent metodologia emprada, el LLF RNOXq21 també apareix en limfòcits d'RNO per fluorodeoxiuridina (Robinson i Elder, 1987).

Com podem veure, les bandes afectades pel mutagen químic i les afectades per la RICl transgeneracional són majoritàriament diferents. Això ens fa pensar en un efecte genotòxic dirigit pel que fa a l'agent químic i a un efecte més general, i menys *controlable*, de l'agent físic. Els raigs X tenen un gran poder de penetració als diferents teixits dels éssers vius, i, tal com ja s'ha comentat, poden afectar directament la molècula del DNA, o bé indirectament, afectant altres molècules (Kirsch-Volders *et al.*, 2003; Mateuca *et al.*, 2006). En canvi, l'acció de l'apc és bloquejar la forquilla de replicació del DNA la qual, per diferents mecanismes moleculars, porta a la manifestació de la inestabilitat de la regió.

Pel que fa a les ITS (freqüents i més freqüents, treball I), sis són incloses en bandes cromosòmiques significatives per RICl (35,29 %) i una és inclosa en la banda RNO11q12, que presenta CI espontània.

En relació amb la CI espontània, l'anomenem així perquè en desconeixem la raó de l'aparició. Les causes podrien ser la posició del cromosoma dins el nucli, la composició determinada de la seqüència nucleotídica i l'estructura tridimensional (arquitectura) dels cromosomes. L'arquitectura genòmica té característiques que es poden definir des d'un punt de vista químic (interacció de proteïnes), físic (torsions de DNA), i de la seqüència pròpiament genètica. Qualsevol canvi a qualsevol nivell en aquesta estructura pot produir una inestabilitat en la molècula de DNA que de manera *immediata* en el temps, o retardada, o fins i tot en la generació següent, portarà a la seva manifestació citogenètica.

De les onze bandes amb CI espontània, deu presenten RICl (90,9 %), la qual cosa mostra que la inestabilitat es manté, excepte en el cas de RNO11q12, en què només presenta CI espontània (**figures 1, 2 i 3, taula 3**). No podem afirmar si és que la CI espontània es manté i la RI afecta a aquestes bandes, que es trenquen amb facilitat, a més d'afectar-ne d'altres, o bé si és que aquests trencaments no són producte de la RI, sinó del manteniment de la CI en aquestes bandes. En canvi, pel que fa al mutagen químic, de les onze bandes amb CI espontània, només quatre estan afectades per l'apc (36,36 %), fet que concordaria amb l'especificitat de la diana de l'apc, que és la forquilla de replicació.

L'efecte radioprotector de la triptorelina en rata ha quedat palès pel que fa a la inestabilitat cromosòmica (treball III). No obstant això, desconeixem quin és l'efecte radioprotector concret de la triptorelina en els cromosomes i de les bandes cromosòmiques. En realitat, l'efecte de l'GnRHa en relació amb la molècula de DNA sempre s'ha de considerar indirecte, en algun punt de la seqüència d'esdeveniments provocats per l'administració de l'anàleg, ja que l'acció pròpiament dita del GnRHa, en el cas del nostre experiment, és en el bloqueig de l'eix hipotàlem-hipòfisi-gònada. Pel que fa als nostres resultats respecte a les bandes cromosòmiques, n'hi ha onze d'estadísticament significatives en els grups sense

anàleg però que no ho són en els grups irradiats i tractats amb l'GnRH $\alpha$  (**taula 3**). Això vol dir que la radioprotecció va *dirigida* a aquestes bandes caracteritzades? La qüestió roman oberta.

Quant a l'homologia de bandes cromosòmiques afectades per RICI transgeneracional en RNO amb bandes afectades per la RI en HSA (**figura 7**; Barrios *et al.*, 1989), sis de les onze bandes cromosòmiques significativament més rellevants en RNO (54,5 %, **figura 7, taula 3**) són homòlogues a bandes d'HSA afectades per la RI (Barrios *et al.*, 1989). Cal destacar que aquestes bandes en HSA són causades per l'efecte directe d'aquesta RI.

Els cromosomes RNO1, RNO2 i RNO3 han estat estudiats de forma global i exhaustiva en relació amb altres regions cromosòmiques inestables d'RNO així com en relació amb bandes homòlogues corresponents a altres espècies (**figura 7**). Les quatre bandes cromosòmiques estadísticament significatives en tots els grup de tractament (RNO1q22, RNO1q43, RNO2q32 i RNO3p12) són homògues a: (i) bandes implicades en esdeveniments evolutius en rosegadors, a partir de l'anàlisi de regions homòlogues entre RNO i l'espècie de ratolí *Mus musculus* (MMU, Helou *et al.*, 2001), (ii) bandes implicades en esdeveniments evolutius en primats (Yunis i Prakash, 1982; Clemente *et al.*, 1990; Ruiz-Herrera *et al.*, 2002b; García *et al.*, 2002), (iii) bandes implicades en els efectes directes de la RI en HSA (Barrios *et al.*, 1989) i/o (iv) bandes implicades en patologies en HSA (Kaiser, 1984; Fryns *et al.*, 1986; Kleezkowska *et al.*, 1987; Madan, 1995; Cohen *et al.*, 1996; Mitelman *et al.*, 1997). Altrament, totes, excepte RNO3p12, són homòlogues a bandes d'altres espècies de primats amb LLF (**figura 6**; Human Gene Mapping 11; Ruiz-Herrera *et al.*, 2002b; 2004; Smeets and Van de Klunder, 1990).

Com a conclusió, podem afirmar que el genoma de rata conté cromosomes i bandes cromosòmiques clarament inestables, tant des del punt de vista dels efectes transgeneracionals de la RI (RICI), com pel que fa als efectes d'un mutagen químic, com és l'apc. En nombroses ocasions, aquestes regions són inestables tant pel que fa a aquest agent físic, com per l'agent químic, alhora que colocalitzen amb LLF i ITS de la mateixa espècie *Rattus norvegicus* i són homòlogues a bandes, també inestables, d'altres espècies de mamífers, fonamentalment primats.

## 5. Discussió

*Qui no comet mai un error, mai no fa un descobriment.*

Samuel Smiles



Aquest treball és el primer que presenta una anàlisi exhaustiva i sistematitzada de les cèl·lules somàtiques de la descendència de femelles adultes de l'espècie *Rattus norvegicus* amb la finalitat de determinar:

(a) L'existència de dany citogenètic en la línia germinal de rates femella induït per la RI i la seva heretabilitat. La RI provoca efectes transgeneracionals? (treballs I, II, III i IV).

(b) L'existència de disfunció ovàrica (efectes reproductius) en rates femella induïda per la RI. Determina la RI problemes reproductius? (treball III).

(c) L'existència d'interacció entre els efectes transgeneracionals de la RI i els efectes de mutàgens químics directes. Els possibles efectes transgeneracionals de la RI, presenten efectes additius quan la  $F_1$  se sotmet a un mutagen químic? (treballs II i IV).

(d) L'existència de radioprotecció d'un anàleg agonista de la GnRH enfront dels efectes de la radiació ionitzant i com és la modulació del dany radioinduit. Els ovaris prepuberals són radioresistents? Hi ha modulació en aquesta possible radioresistència? (treballs III i IV).

(e) L'existència de regions genòmicament inestables en l'arquitectura cromosòmica de *Rattus norvegicus*. Si n'hi hagués, tenen algun tipus de memòria evolutiva? (treballs I i IV).

A partir de tots aquests estudis en cèl·lules somàtiques provinents de fetus de femelles irradiades de l'espècie *Rattus norvegicus*, s'ha demostrat que hi ha una inestabilitat cromosòmica radioinduída transgeneracional (treballs I, II, III i IV). Aquesta RICI es considera conseqüència important de la RI als oòcits i d'aquestes femelles i s'observa en els fibroblasts fetals provinents de la fecundació dels fol·licles primordials irradiats. Aquesta RICI ha estat mesurada i determinada per diferents freqüències d'AC estructurals, que inclouen tant les discontinuïtats com les reordenacions de la seqüència del DNA.

Des d'un punt de vista citogenètic, també s'ha demostrat que els efectes de la RI a la següent generació d'individus ocorren tant pel que fa a l'administració aguda de la radiació (dosi de 5 Gy) com pel que fa a la fraccionada (dosi de 12 Gy). Això no obstant, els resultats són similars en ambdós grups de tractament, tot i que provenen de dosis i de tipus d'administració de RI diferents (treball III), com si la administració fraccionada provoqués un dany similar a l'aguda. Això ens fa pensar que els efectes relacionats amb el tipus d'administració predominen en relació amb l'efecte de dosi (treball III). Pel que fa a l'estudi reproductiu, amb els nostres paràmetres no s'observa un efecte de la radiació.

En l'àmbit basal, hi ha una CI espontània tant pels paràmetres citogenètics quantitius com pels qualitius (treballs III i IV). Aquesta CI espontània es manté constant en els diferents treballs desenvolupats (treballs I; II i III). La presència d'una CI equivalent també ha estat observada en cèl·lules fetals de l'espècie humana (de la Chica *et al.*, 2005).

Considerem d'interès la troballa d'un efecte protector del GnRH enfront a la CI espontània, que es traduiria en una millora de la funció gonadal (treball III). Aquesta millora és



evident quant als paràmetres citogenètics estudiats, i s'observa com a tendència a la millora, pel que fa a de les condicions reproductives de les femelles (treball III).

El nostre estudi ha demostrat que la triptorelina confereix radioprotecció als oòcits i dels fol·licles primordials de les rates adultes, encara que el grau de protecció depèn del paràmetre d'anàlisi utilitzat, citogenètic o reproductiu, i també de la dosi i del tipus d'administració de la RI (treball III). Cal destacar que els paràmetres citogenètics indiquen que la radioprotecció d'aquest GnRHa és *molt* més pronunciada a dosi aguda (treball III).

Des del final del segle XX, estudis clínics (Damewood i Grochow, 1986; Waxman, 1987) han demostrat que un estat prepuberal de les gònades, tant masculines com femenines, les faria menys sensibles a lesions d'agents citotòxics. Per tant, es va postular que si s'aconseguia induir un estat *quiescent* dels ovaris, es protegiria les gònades. Això és justament el que fa l'administració continuada de la triptorelina. Aquest GnRHa indueix una parada de l'eix hormonal hipotàlem–hipòfisi–ovari, produint unes condicions hormonals semblants a les de les nenes prepuberals.

El nostre estudi confirma estudis histològics anteriors referents als efectes radioprotectors d'GnRHa en rata (Ataya *et al.*; 1989; Albarracín, 1996), estudis clínics fets en nenes prepuberals i en pacient adultes (Damewood i Grochow, 1986; Waxman, 1987), i també altres estudis clínics fets en pacients tractades i en no tractades amb GnRHa i sotmeses a radioteràpia (Blumenfeld *et al.*, 1996; Blumenfeld i Eckman, 2005). Els nostres resultats en rata indicarien que els ovaris prepuberals i els ovaris de pacients adultes tractades amb GnRHa són més radioresistents que els ovaris de pacients adultes no tractades amb anàleg (treball III).

Els efectes directes sobre els fibroblasts fetals del mutagen químic utilitzat (apc) han resultat importants des del punt de vista citogenètic. Aquests efectes directes són clarament superiors quan el mutagen químic s'aplica a cèl·lules amb RICI transgeneracional, la qual cosa indica que la RICI potenciarà clarament els efectes de l'apc (treball II). Els nostres resultats a femella anirien en el mateix sentit que els observats en altres treballs en rata mascle (Vorotsoba, 2000) i en ratolins femella (Dasenbrock *et al.*, 2005).

L'espècie *Rattus norvegicus* presenta un gran nombre d'ITS distribuïdes al llarg de tot el seu genoma. D'aquestes, un 14 % (17 de 121) es consideren ITS freqüents. Hi destaca el fet que aquesta espècie no presenti ITS en blocs, típiques de rosegadors (Bertoni *et al.*, 1996; Castiglia *et al.*, 2002). Al llarg de l'estudi exhaustiu de les bandes cromosòmiques (treballs I i IV), ha quedat palès que, com a mínim, una part d'aquestes seqüències estan implicades en esdeveniments evolutius (treball I), en esdeveniments d'IC espontània i radioinduída transgeneracional i en els efectes de l'apc (treballs I i IV).

S'han identificat els LLF en fibroblasts fetals induïts per l'apc. En la majoria dels casos hi ha coincidència amb LLF d'altres espècies estudiades i també amb altres esdeveniments inestables i evolutius (treball IV).

Des d'un punt de vista qualitatiu, s'ha determinat que les bandes cromosòmiques en RNO no es trenquen a l'atzar, sinó que hi ha regions que pateixen més AC que altres i, per tant, que són més inestables (treball I). S'han caracteritzat els cromosomes i les bandes cromosòmicament inestables del cariotip de *Rattus norvegicus* pel que fa a les AC radioinduides i espontànies i s'han relacionat amb altres bandes cromosòmicament inestables de l'espècie (treballs I, II i IV).

Els cromosomes de més llargada (RNO1, RNO2 i RNO3) són els que contenen significativament més regions inestables, tant pel que fa als efectes transgeneracionals de la RI (RICI), com pel que fa als efectes del mutagen químic apc; a la CI espontània, als LLF i a les ITS de l'espècie RNO. A més, en moltes ocasions, les regions inestables caracteritzades al llarg de tot el cariotip d'RNO coincideixen amb LLF i amb ITS d'altres espècies de mamífers (primats). Tot això indica que hi ha regions en el cariotip de rata en què la fragilitat és molt destacada, ja sigui per causa de la seqüència, de la conformació tridimensional o per altres raons que desconeixem. Aquesta inestabilitat es manté pel que fa als agents físic i químic estudiats i es conserva entre espècies i, en conseqüència, al llarg de l'evolució dels mamífers.

Fins aquí hem concretat els resultats respecte dels objectius formulats, però resten algunes (moltes) preguntes obertes.

(a) Quant als efectes de la RI,

La pobra resposta trobada pel que fa als paràmetres reproductius, en contrast amb els clars resultats citogenètics, ens fan pensar que des del punt de vista reproductiu els efectes de la RI no són prou importants per ser palesos amb els indicadors utilitzats. El fet que els efectes de la RI no impliquin una diferència gonadal clara entre individus tractats i no tractats pel que fa a l'ovulació, a les implantacions, a les pèrdues preimplantacionals i postimplantacionals, no vol dir que no hi pugui haver algun efecte deleteri. Aquests efectes podrien ser detectables amb altres paràmetres reproductius. Els canvis en el nombre i la qualitat de l'estoc d'oòcits entre femelles irradiades i no irradiades es podrien detectar mesurant-ne tant la durada de la vida reproductiva com el nombre de llogrigades ( $F_1$ ), així com estudiant la capacitat reproductiva d'aquestes llogrigades. Aquest darrer paràmetre ja implicaria una manifestació de RICI en la segona generació ( $F_2$ ). Vet aquí un nou repte per desentrellar.

(b) Amb relació a la radioprotecció,

La radioprotecció pel GnRHa triptorelina es desdibuixa pel que fa a la dosi fraccionada. De fet, ens trobem davant d'uns efectes deleteris de la RI més baixos en aquests grups en comparació amb els grups irradiats a dosi aguda. Fins a quin punt, doncs, és més *beneficiós* el tipus d'administració que la dosi de radiació administrada?

S'ha observat una disminució de la RICI en la descendència de les femelles irradiades i tractades amb l'anàleg. Com millorarà això la qualitat de vida així com l'eficiència reproductiva de la llodrigada?

La caracterització de bandes estadísticament significatives només existents en els grups sense anàleg convida a preguntar-se: quines característiques té l'efecte radioprotector concret de la triptorelina en els cromosomes?

(c) Quant als llocs fràgils,

Se n'ha caracteritzat un nombre reduït en els fibroblasts fetals. Com és que se n'han trobat tan pocs si el cariotip dels rosegadors està ple de regions inestables (treball IV) pel fet que és un cariotip molt reorganitzat (Stanyon i col., 1999; Cavagna *et al.*, 2002)? Analitzant altres tipus cel·lulars d'RNO, es mantindrien els LLF ja determinats?

(d) Pel que fa a l'estudi de les regions cromosòmiques inestables,

L'estudi exhaustiu de totes les bandes cromosòmiques del cariotip d'RNO amb significació estadística afegiria informació rellevant als nostres resultats? L'aprofundiment en l'estudi de les homologies d'aquestes regions cromosòmiques inestables d'RNO amb l'espècie humana, indicarien la implicació de gens importants en patologies humanes?

## 6. Conclusions

*Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is not to stop questioning.*

Albert Einstein



1. Hi ha inestabilitat cromosòmica radioinduída transgeneracional. Els efectes de l'exposició a la radiació ionitzant d'òocits I de rates femelles adultes es transmeten a la seva descendència. Aquesta inestabilitat cromosòmica transgeneracional es presenta tant amb una administració aguda de la dosi (5 Gy), com de manera fraccionada (dosi de 12 Gy).

2. Els fibroblasts fetals de l'espècie *Rattus norvegicus* presenten inestabilitat cromosòmica espontània. Aquesta inestabilitat cromosòmica espontània es manté en tots els experiments que s'han fet.

3. L'administració del mutagen químic afidicolina als cultius de fibroblasts fetals de l'espècie *Rattus norvegicus* provoca dany citogenètic. La inestabilitat cromosòmica radioinduída transgeneracional en potencia els efectes.

4. L'anàleg agonista de l'hormona alliberadora de gonadotrofines, la triptorelina, confereix radioprotecció als òocits I dels fol·licles primordials de les femelles adultes irradiades de l'espècie *Rattus norvegicus*. El grau de radioprotecció d'aquest fàrmac depèn del paràmetre analitzat, de la dosi i del tipus d'administració de la radiació ionitzant. En paràmetres citogenètics, la radioprotecció d'aquest anàleg de l'hormona alliberadora de gonadotrofines pot arribar a ser de fins a un 44 %.

5. La triptorelina té un efecte protector enfront de la inestabilitat cromosòmica espontània, que es traduiria en una millora de la funció gonadal. Aquesta millora és evident quant als paràmetres citogenètics estudiats, i s'observa com a tendència pel que fa a les condicions reproductives de les femelles de l'espècie *Rattus norvegicus*.

6. S'han identificat disset seqüències telomèriques intersticials classificades com a freqüents i molt freqüents en l'espècie *Rattus norvegicus*. El 41,18 % d'aquestes seqüències telomèriques intersticials estan relacionades amb altres regions inestables d'aquesta espècie. Altrament, s'han caracteritzat set llocs fràgils induïts per l'afidicolina en fibroblasts fetals de l'espècie *Rattus norvegicus*. El 85,7 % d'aquests llocs fràgils coincideixen amb llocs fràgils de l'espècie humana. Tant les seqüències telomèriques intersticials com els llocs fràgils caracteritzats estan implicats en processos evolutius i en esdeveniments d'inestabilitat cromosòmica de l'espècie.

7. Si tenim en compte els efectes transgeneracionals de la radiació ionitzant, els efectes d'un mutagen químic, la inestabilitat cromosòmica espontània, els llocs fràgils i les seqüències telomèriques intersticials, les zones més inestables de l'espècie *Rattus norvegicus* es localitzen en els cromosomes RNO1, RNO2 i RNO3. Les bandes cromosòmiques RNO1q22, RNO1q43, RNO2q32 i RNO3p12 són les més inestables del cariotip d'aquesta espècie.



## 6. Bibliografia

*If we knew what it was we were doing, it would not be called research, would it?*

Albert Einstein





**A**

Albarracín J.L. (1996). Papel de un análogo de la GnRH (Triptorelina) en la protección de las lesiones ováricas producidas por radiaciones ionizantes: estudio experimental en ratas. Tesis doctoral. Fac. Medicina. Universitat de Múrcia.

Álvarez L., Evans J.W., Wilks R., Lucas J.N., Brown M., Giaccia A.J. (1993) Chromosomal radiosensitivity at intrachromosomal telomeric sites. *Genes Chromosomes and Cancer* **8**: 8-14.

Álvarez R., Tusell L., Genescà A., Miró R., Caballín M.R., Ribas M., Barquinero F., Egozcue J. (1997) Dose-response relationship for the induction of chromosomal abnormalities in irradiated human spermatozoa. *Environ. Mol. Mutagen.* **29**: 357–366.

Andrades-Miranda J., Zanchin N.I.T., Oliveira L.F.B., Langguth A.R., Mattevi M.S: (2002) (T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>) telomeric sequence hybridisation indicating centric fusion rearrangements in the karyotype of the rodent *Oryzomys subflavus*. *Genetica* **114**: 11–16.

Ashley T., Ward D.C. (1993) A “hot spot” of recombination coincides with an interstitial telomeric sequence in the Armenian hamster. *Cytogenet. Cell Genet.* **62**: 169–171.

Ataya K., Tadros M., Ramahi A. (1989) Gonadotropin-releasing hormone agonist inhibits physiologic ovarian follicular loss in rats. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **121**: 55-60.

Ataya K., Pydyn E., Ramahi-Ataya A., Orton C.G. (1995) Is radiation-induced ovarian failure in rhesus monkeys preventable by luteinizing hormone-releasing hormone agonists?: Preliminary observations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**: 790-795.

Azzalin C.M., Mucciolo E., Bertoni L., Giulotto E. (1997) Fluorescence *in situ* hybridization with a synthetic (T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>n</sub> polynucleotide detects several intrachromosomal telomere-like repeats on human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* **78**:112-115.

Azzalin C.M., Nergadze S.G., Giulotto E. (2001) Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. *Chromosoma* **110**: 75-82.

**B**

Balajee A.S., Oh H.J., Natarajan A.T. (1994) Analysis of restriction enzyme-induced chromosome aberrations in the interstitial telomeric repeat sequences of CHO and CHE cells by FISH. *Mutat. Res.* **307**: 307–313.

Balajee A.S., Dominguez I., Bohr V.A., Natarajan A.T. (1996) Immunofluorescent analysis of the organization of telomeric DNA sequences and their involvement in chromosomal aberrations in hamster cells. *Mutation Research* **372**: 163-172.

Barber R., Plumb M.A., Boulton E., Roux 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. USA* **99**: 6877-6882.

Barber R.C. , Dubrova Y.E. (2006) The offspring of irradiated parents, are they stable?. *Mutat. Res.* **598** 50-60.

Barber R.C., Hickenbotham P., Hatch T., Kelly D., Topchiy N., Almeida G.M., Jones G.D., Johnson G.E., Parry J.M., Rothkamm, K. Dubrova Y.E. (2006) Radiation-induced transgenerational alterations in genome stability and DNA damage. *Oncogene* **25**: 7336-7342.

Barrios L., Miró R., Caballín M.R., Fuster C., Guedea F., Subias A., Egozcue J. (1989) Cytogenetic effects of radiotherapy. Breakpoint distribution in induced chromosome aberrations. *Cancer Genet. Cytogenet.* **41**: 61–70.

Behre H.M., Nashan D., Hubert W., Nieschlag E. (1992) Depot gonadotropin-releasing hormone agonist blunts the androgen-induced suppression of spermatogenesis in a clinical trial of male contraception. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **74**: 84-90.

Bertoni L., Attolini C., Tessera L., Mucciolo E., Giulotto E. (1994) Telomeric and non-telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in gene amplification and chromosome stability. *Genomics* **24**: 53–62.

Bertoni L., Attolini C., Favarelli M., Simi S., Giulotto E. (1996) Intrachromosomal telomere-like DNA sequences in Chinese hamster. *Mammalian Genome* **7**: 853–855.

Biljan M.M., Mahutte N.G., Dean N., Hemmings R., Bissonette F., Tan S.L. (1998) Effects of pretreatment with an oral contraceptive on the time required to achieve pituitary suppression with gonadotropin-releasing hormone analogues and on subsequent implantation and pregnancy rates. *Fertil. Steril.* **70** (6): 1063-1069.

Blumenfeld Z., Avivi I., Linn S., Epelbaum R., Ben-Shahar M., Haim N. (1996) Prevention of irreversible chemotherapy-induced ovarian damage in young women with lymphoma by a gonadotrophin-releasing hormone agonist in parallel to chemotherapy. *Hum. Reprod.* **11**: 1620-1626.

Blumenfeld Z. (2001) Ovarian rescue/Protection from chemotherapeutic agents. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* **8**(1): S60-S64.

Blumenfeld Z., Eckman A. (2005) Preservation of fertility and ovarian function and minimization of chemotherapy-induced gonadotoxicity in young women by GnRH-a. *J. Natl. Cancer. Inst. Monogr.* **34**: 40-43.

Böhm U., Dahm P.F., McAllister B.F., Greenbaum I.F. (1995) Identifying chromosomal fragile sites from individuals: a multinomial statistical model. *Hum. Genet.* **95**(3): 249-56.

Bokser L., Zalatnai A., Schally A.V. (1989) Inhibition of pituitary-gonadal axis in mice by long-term administration of D-Trp-6-LHRH microcapsules. *J. Reprod. Fertil.* **85**: 569-574.

Bolzán A.D., Páez G.L., Bianchi M.S. (2001) FISH analysis of telomeric repeat sequences and their involvement in chromosomal aberrations induced by radiomimetic compounds in hamster cells. *Mutat. Res.* **479**: 187–196.

Borrell A., Ponsà M., Egozcue J., Rubio A., Garcia M. (1998a) Chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes from *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini) after X-ray irradiation. *Mutat. Res.* **401**: 65–76.

Borrell A., Ponsà M., Egozcue J., Rubio A., Garcia M. (1998b) Chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes from *Macaca fascicularis* and *Erythrocebus patas* (Cercopithecidae, Catarrhini) after X-ray irradiation. *Mutat. Res.* **403**: 185–198.

Bouffler S.D., Morgan W.F., Pandita T.K., Slijepcevic P. (1996) The involvement of telomeric sequences in chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* **366**: 129–135.

Bouffler S.D., Blasco M.A., Cox R., Smith P.J. (2001) Telomeric sequences, radiation sensitivity and genomic instability. *Int. J. Radiat. Biol.* **77**: 995–1005. Review.

Boutouil M., Fetni R., Qu J., Dallaire L., Richer C., Lemieux N. (1996) Fragile site and interstitial telomere repeat sequences at the fusion point of a *de novo* (Y;13) translocation. *Hum. Genet.* **98**: 323–327.

Busson Le Coniat M., Brizard F., Smadja N.V., Maarek O., Der Sarkissian H., Berger R. (2000) Interstitial telomere repeats in translocations of hematopoietic disorders. *Leukemia* **14**: 1630–1633.

Byrne J., Mulvihill J.J., Myers M.H., Connelly R.R., Naughton M.D., Krauss M.R., Steinhorn S.C., Hassinger D.D., Austin D.F., Bragg K., Holmes G.F., Holmes F.F., Latourette H.B., Weyer P.J., Meigs J.W., Teta M.J., Cook J.W., Strong L.C. (1987) Effects of treatment on fertility in long-term survivors of childhood or adolescent cancer. *N. Engl. J. Med.* **317**(21): 1315–21.

Byrne J., Rasmussen S.A., Steinhorn S.C., Connelly R.R., Myers M.H., Lynch C.F., Flannery J., Austin D.F., Holmes F.F., Holmes G.E., Strong L.C., Mulvihill J.J. (1998) Genetic disease in offspring of long-term survivors of childhood and adolescent cancer. *Am. J. Hum. Genet.* **62**: 45–52.

Byskow A.G., Faddy M.J., Lemmen J.G., Andersen C.Y. (2005) Eggs forever? *Differentiation* **73**: 438–446.

## C

Camats N., Ruiz-Herrera A., Parrilla J.J., Acien M., Payá P, Giulotto E., Egozcue J., Garcia F., Garcia M. (2006) Genomic instability in rat: breakpoints induced by ionising radiation and interstitial telomeric-like sequences. *Mutat. Res.* **595**: 156–166.

Camats N., García F., Parrilla J.J., Calaf J., Martín M., Garcia Caldés M. (2008) Trans-generational radiation-induced chromosomal instability in the female enhances the action of chemical mutagens. *Mutat. Res.* **640**: 16–26.

Carr A.M., Hoekstra M.F. (1995) The cellular responses to DNA damage. *Trends in cell biology* **5**: 32–40.

Castiglia R., Gornung E., Corti M. (2002) Cytogenetic analyses of chromosomal rearrangements in *Mus minutoides/musculoides* from North-West Zambia through mapping of the telomeric sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> and banding techniques. *Chromosome Res.* **10**: 399–406.

Cavagna P., Stone G., Stanyon R. (2002) Black rat (*Rattus rattus*) genomic variability characterized by chromosome painting. *Mammalian Genome* **13**: 157–163.

Check J.H., Katsoff B. (2008) Ovulation induction and pregnancy in a woman with premature menopause following gonadotropin suppression with the gonadotropin releasing hormone antagonist, cetrorelix--a case report. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* **35**(1): 10-12.

Cherry J.M., Blackburn E.H. (1985) The internally located telomeric sequences in the germ-line chromosomes of *Tetrahymena* are at the ends of transposon-like elements. *Cell* **43**: 747-758.

Clemente I.C., Ponsà M., Garcia M., Egozcue J (1990) Chromosome evolution in the Cercopithecidae and its relationship to human fragile sites and neoplasia. *Int. J. Primatol.* **11**: 377-398.

Cohen O., Cans C., Cuiellel M., Gilardi J.L., Roth H., Mermet M.A., Jalbert P., Demongeot J (1996) Cartographic study: breakpoints in 1574 families carrying human reciprocal translocations. *Hum. Genet.* **97**: 659-667.

Coquelle A., Pipiras E., Toledo F., Buttin G., Debatisse M. (1997) Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell* **89**: 215-225.

## D

Damewood M.D., Grochow L.B. (1986) Prospects for fertility after chemotherapy or radiation for neoplastic disease. *Fertil. Steril.* **45**: 443-459.

Dasenbrock C., Tillmann T., Ernst H., Behnke W., Kellner R., Hagemann G., Kaefer V., Kohler M., Rittinghausen S., Mohr U., Tomatis L. (2005) Maternal effects and cancer risk in the progeny of mice exposed to X-rays before conception. *Exp. Toxicol. Pathol.* **56**: 351-360.

Davis L., Kennedy S.S., Moore J., Prentice A. (2007) Modern combined oral contraceptives for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **18**(3): CD00119.

Day J.P., Limoli C.L., Morgan W.F. (1998) Recombination involving interstitial telomere repeat-like sequences promotes chromosomal instability in Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* **19**: 259-265.

de la Chica R.A., Ribas I., Giraldo J., Egozcue J., Fuster C., (2005) Chromosomal instability in amniocytes from fetuses of mothers who smoke. *JAMA* **293**: 1212-1222.

Desmaze C., Alberti C., Martins L., Pottier G., Sprung C.N., Murnane J.P., Sabatier L. (1999) The influence of intersitital telomeric sequences on chromosome instability in human cells. *Cytogenet. Cell Genet.* **86**: 288-295.

Desmaze C., Pirzio L.M., Blaise R., Mondello C., Giulotto E., Murnane J.P., Sabatier L. (2004) Interstitial telomeric repeats are not preferentially involved in radiation-induced chromosome aberrations in human cells. *Cytogenet. Genome Res.* **104**(1-4): 123-30.

Devi P.U., Satyamitra M. (2005) Tracing radiation induced genomic instability *in vivo* in the haemopoietic cells from fetus to adult mouse. *Br. J. Radiol.* **78**: 928-933.

Dickinson H.O. Parker L. (2002) Leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in children of male Sellafield radiation workers. *Int. J. Cancer* **99**: 437-444.

Dubrova Y.E., Plumb M.A. (2002) Ionising radiation and mutation induction at mouse minisatellite loci. The story of the two generations. *Mutat. Res.* **499**: 143-150.

Dubrova Y.E. (2003a) Long-term genetic effects of radiation exposure. *Mutat. Res.* **544**: 433-439.

Dubrova Y.E. (2003b) Radiation-induced transgenerational instability. *Oncogene* **22**: 7087-7093.

Durante M., Grossi G.F., Yang T.C. (1996) Radiation-induced chromosomal instability in human mammary epithelial cells. *Adv. Space Res.* **18**: 99-108.

## E

Egozcue J., Antich J., Ballesta F., Goyanes V., Izquierdo L., Tamparillas M., Tavares A. (1978) *Genética Médica*. Ed. Expaxs.

Elder F.F.B., Robinson T.J. (1989) Rodent common fragile sites: Are they conserved? Evidence from mouse and rat. *Chromosoma* **97**: 459-464.

Elis A., Tevet A., Yerushalmi R., Blickstein D., Bairy O., Dann E.J., Blumenfeld Z., Abraham A., Manor Y., Shpilberg O., Lishner M. (2006) Fertility status among women treated for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* **47**(4): 623-627.

Emons G, Schally A.V. (1994) The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers. *Hum. Reprod.* **15**(9): 1364-1379.

Emons G., Müller V., Ortmann O., Schulz K.D. (1998) Effects of LHRH-analogues on mitogenic signals transduction in cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **65**: 199-206.

## F

Fagundes V., Yonenaga-Yassuda Y. (1998) Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. *Chromosome Res.* **6**: 643-648.

Falorio S., Angrilli F. Fioritoni G. (2008) Gonadotropin-releasing hormone analog treatment for the prevention of treatment-related ovarian failure and infertility in women of reproductive age with Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **49**: 1087-1093.

Faravelli M., Azzalin C.M., Bertoni L., Chernova O., Attolini C., Mondello C., Giulotto E. (2002) Molecular organization of internal telomeric sequences in Chinese hamster chromosomes. *Gene* **283**: 11-16.

Farr C., Fantes J., Goodfellow P., Cooke H. (1991) Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7006-7010.

Fernández J.L., Gosálvez J., Goyanes V. (1995) High frequency of mutagen-induced chromatid exchanges at interstitial telomere-like DNA sequence blocks of Chinese hamster cells. *Chromosome Res.* **3**: 281-284.

Finato A.O., Varella-Garcia M., Tajara E.H., Taddei V.A., Murielle-Versute E. (2000) Intrachromosomal distribution of telomeric repeats in *Eumops glaucinus* and *Euntops perotis* (Molossidae, Chiroptera). *Chromosome Res.* **8**: 563-569.

Freeman M.E. (1988) The ovarian cycle of the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Capt. 45. Ed. Raven Press Ltd. New York. 1893-1945.

Fryns J.P., Kleczkowska A., Van den Berghe H. (1986) Paracentric inversions in man. *Hum Genet.* **73**: 205-213.

Furui T., Imai A., Takagi A., Tamaya T., Takagi H., Matsunami K., Shiraki S. (2000) Differential efficacy of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist treatment on pedunculated and degenerated myomas: a retrospective study of 630 women. *J. of Obstetrics and Gynaecology* **20**(5): 504-506.

## G

Garagna S., Broccoli D., Redi C.A., Searle J.B., Cooke H.J., Capanna E. (1995) Robertsonian metacentrics of the house mouse lose telomeric sequences but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area. *Chromosoma* **103**: 685-692.

Garagna S., Zuccotti M., Capanna E., Redi C.A. (2002) High-resolution organization of mouse telomeric and pericentromeric DNA, *Cytogenet. Genome Res.* **96**: 125-129.

García F., Ruiz-Herrera A., Egozcue J., Ponsà M., Garcia M (2002) Chromosome homologies between *Cebus* and *Ateles* (Primates) based on ZOO-FISH and G-banding comparisons. *Am. J. Primatol.* **57**: 177-188.

Garcia M. (1987) *Estudis de la primera profase meiótica a fetus femella humans*. Tesi doctoral. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona.

Garcia M., Dietrich A.J.J., Freixa L., Vink A.C.G., Ponsà M., Egozcue J. (1987) Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light and electron microscopy. *Hum. Genet.* **77**: 223-232.

Garcia M., Dietrich A., Pujol R., Egozcue J. (1989) Nucleolar structures in chromosome and SC preparations from human oocytes at first meiotic prophase. *Human Genet.* **82**: 147-153.

Garcia Caldés M., Camats N., Pujol R. (2006). Efectos hereditarios de las radiaciones ionizantes en hembras de mamíferos. En: *Genética Toxicológica*. Capt. XIV. Ed. De Los Cuatro Vientos. 359-392.

Glover T.W., Stein C.K. (1987) Induction of sister chromatid exchanges at common fragile sites. *Am. J. Hum. Genet.* **41**: 882-890.

Glover T.W., Arlt M.F., Casper A.M., Durkin S.G. (2005) Mechanisms of common fragile site instability. *Hum. Mol. Genet.* **14**(2): 197-205. Review.

Go Y., Rakotoarisoa G., Kawamoto Y., Randrianjafy A., Koyama N., Hirai H. (2000) PRINS analysis of telomeric sequence in seven lemurs. *Chromosome Res.* **8**: 57-65.

Gosden R.G., Wade J.C., Fraser H.M., Sandow J., Faddy M.J. (1997) Impact of congenital or experimental hypogonadotrophism on the radiation sensitivity of the mouse ovary. *Hum. Reprod.* **12**(11): 2483-2488.

Gougeon A. (2005) Régénération des ovocytes: fantasme ou réalité? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* **33**: 819-823.

Grützner F., Himmelbauer H., Paulsen M., Ropers H., Haaf T. (1999) Comparative mapping of mouse and rat chromosomes by fluorescence *in situ* hybridation. *Genomics* **55**: 306-313.

## H

Hartwell, L.H., Kastan, M.B. (1994) Cell cycle control and cancer. *Science* **266**: 1821-1828.

Hastie N.D., Allshire R.C. (1989) Human telomeres: fusion and interstitial sites. *Trends Genet.* **5**: 326-331.

Heim S., Mitelman F. (1987) Nineteen of 26 cellular oncogenes precisely localized in the human genome map to one of the 83 bands involved in primary cancer-specific rearrangements. *Hum Genet.* **75**: 70-72.

Helou K., Walentinsson A., Levan G., Stahl F. (2001) Between rat and mouse zoo-FISH reveals 49 chromosomal segments that have been conserved in evolution. *Mammalian Genome* **12**: 765-771.

Hirai H. (2001) Relationship of telomere sequences and constitutive heterochromatin in the human and apes as detected by PRINS. *Methods Cell Sci.* **23**:29-35.

Huang H., Qian J., Proffit J., Wilber K., Jenkins R., Smith D.I. (1998) FRA7G extends over a broad region: coincidence of human endogenous retroviral sequences (HERV-H) and small polydispersed circular DNAs (spcDNA) and fragile sites. *Oncogene* **16**: 2311-2319

Human Gene Mapping 11 (1991) *Cytogenet. Cell Genet.* **58**: 1-220.

## I

Ijdo J.W., Baldini A., Ward D.C., Reeders S.T., Wells R.A. (1991) Origin of human chromosome 2: an ancestral telomere-telomere fusion. *Proc. Natl. Sci. USA* **88**: 9051-9055.



International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. International System for Human Cytogenetic Nomenclature 1995 (ISCN1995). XV Congress of the Scandinavian Association of Geneticists. 1994.

Ishiguro H., Yasuda Y., Tomita Y., Shinagawa T., Shimizu T., Morimoto T., Hattori K., Matsumoto M., Inoue H., Yabe H., Yabe M., Shinohara O., Kato S. (2007) Gonadal shielding to irradiation is effective in protecting testicular growth and function in long-term survivors of bone marrow transplantation during childhood or adolescence. *Bone Marrow Transplant.* **39**: 483-490.

## J

Janssens R.M., Brus L., Cahill D.J., Huirne J.A., Schoemaker J., Lambalk C.B. (2000) Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists. *Hum. Reprod. Update.* **6**(5): 505-518.

Jarrell J., YoungLai E.V., McMahon A., Barr R., O'Connell G., Belbeck L. (1987) Effects of ionizing radiation and pretreatment with [D-Leu6,des-Gly10] luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide on developing rat ovarian follicles. *Cancer Res.* **47**: 5005-5008.

Jarrell J.F., McMahon A., Barr R.D., YoungLai E.V. (1991) The agonist (d-leu-6,des-gly-10)-LHRH-ethylamide does not protect the fecundity of rats exposed to high dose unilateral ovarian irradiation. *Reprod. Toxicol.* **5**: 385-388.

Johannisson R., Mörmel R., Brandenburg B. (1994) Synaptonemal complex damage in fetal mouse oocytes induced by ionizing irradiation. *Mutat. Res.* **311**: 319-328.

Johnson J., Canning J., Kaneko T., Pru J.K., Tilly J.L. (2004) Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* **428**: 145-150.

Johnson J., Bagley J., Skaznik-Wikiel M., Lee H-J., Adams G.B., Niiikura Y., Tschuby K.S., Tilly J.C., Cortes M.L., Forkert R., Spitzer T., Iacomini J., Scadden D.T., Tilly J.L (2005a) Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* **122**: 303-315.

Johnson J., Skaznik-Wikiel M., Lee H-J., Niiikura Y., Tilly J.C., Tilly J.L (2005b) Setting the record straight on data supporting postnatal oogenesis in female mammals. *Cell Cycle* **4** (11): 1471-1477.

## K

Kadhim M.A., Lorimore, S.A., Townsend, K.M., Goodhead, D.T., Buckle, V.J., Wright, E.G. (1995). Radiation-induced genomic instability delayed cytogenetic aberrations and apoptosis in primary human bone marrow cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **67**: 287-293.

- Kadhim M.A., Wright E.G. (1998) Radiation-induced transmissible (sic) chromosomal instability in haemopoietic stem cells. *Adv. Space Res.* **22**: 587-596.
- Kadhim M.A. (2003) Role of genetic background in induced instability, *Oncogene* **22**: 6994-6999.
- Kaiser P. (1984) Pericentric inversions. *Hum. Genet.* **68**: 1-47.
- Kanao T., Okamoto T., Miyachi Y., Nohara N. (2003) Parental exposure to low-dose X-rays in *Drosophila melanogaster* induces early emergence in offspring, which can be modulated by transplantation of polar cytoplasm. *Mutat. Res.* **527**: 1-6.
- Kashima K., Nanashima A., Yasutake T., Sawai T., Tsuji T., Hidaka S., Akama F., Miyashita K., Tagawa Y., Nagayasu T. (2006) Decrease of telomeres and increase of interstitial telomeric sites in chromosomes of short-term cultured gastric carcinoma cells detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Anticancer Res.* **26(4B)**: 2849-2855.
- Katinka M.D., Burgain F.M. (1992) Interstitial telomeres are hotspots for illegitimate recombination with DNA molecules injected into the macronucleus of *Paramecium primaurelia*. *EMBO J.* **11**: 725-732.
- Kaufmann W.K., Paules R.S. (1996). DNA damage and cell cycle checkpoints. *The FASEB Journal* **10**: 238-247.
- Kerr J.B., Duckett R., Myers M., Britt M.M., Mladenovska T., Findlay J.K. (2006) Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply. *Reproduction* **132(1)**: 95-109.
- Kilburn A.E., Shea M.J., Sargent R.G., Wilson J.H. (2001) Insertion of a telomere repeat sequence into a mammalian gene causes chromosome instability. *Mol. Cell Biol.* **21**: 126-135.
- Kimball R. F. (1987). The development of ideas about gene mutations and chromosomal aberrations by radiation and chemicals. *Mutat. Res.* **186**: 1-34.
- Kirsch-Volders M., Vanhauwaert A., Eichenlaub-Ritter U., Decordier I. (2003). Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol. Lett.* **140-141**: 63-74.
- Kleezhowska A., Fryns J.P., van den Berghe H. (1987) Pericentric inversions in man: personal experience and review of the literature. *Hum. Genet.* **75**: 333-338.
- Kola I. (2004) Putting the rat on the map. *Nature Biotech.* **22(5)**: 529-531.
- Kovacs M.S., Evans J.W., Johnstone I.M., Brown J.M. (1994) Radiation-induced damage, repair and exchange formation in different chromosomes of human fibroblasts determined by fluorescence *in situ* hybridization. *Radiat. Res.* **137**: 34-43.
- Kovacs M., Schally A.V. (2001) Comparison of mechanisms of action of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonist cetrorelix and LHRH agonist triptorelin on the gene expression of pituitary LHRH receptors in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 12197-12202.
- Krishnaja A.P., Sharma N.K. (2006) Differential radiation effects in smokers - culture time dependence of the yield of gamma ray-induced chromosome damage in first division metaphases. *Int. J. Radiat. Biol.* **82**: 363-377.

Kropáčová K., Slovinská L., Misurova E. (2002) Cytogenetic changes in the liver of progeny of irradiated male rats. *J. Radiat. Res.* **43**: 125-133.

Kunz G.J., Sherman T.I., Klein K.O. (2007) Luteinizing hormone (LH) and estradiol suppression and growth in girls with central precocious puberty: is more suppression better? Are pre-injection LH levels useful in monitoring treatment? *Pediatr. Endocrinol. Metab.* **20**(11): 1189-1198.

## L

Le Beau M.M., Rowley J.D. (1984) Heritable fragile sites in cancer. *Nature* **308**: 607-608.

Lee C., Sasi R., Lin C.C. (1993) Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjak chromosomes; further evidence for tandem chromosome fusions in the karyotype evolution of the Asian muntjaks. *Cytogenet. Cell Genet.* **63**: 156-159.

Lee H.-J., Sakamoto H., Luo H., Skaznik-Wikiel M., Friel A.M., Niikura T., Tilly J.C., Niikura Y., Kliein R., Styer A.K., Zuberberg L.R., Tilly J., Rueda B.R. (2007) Loss of CABLES1, a cyclin-dependent kinase-interacting protein that inhibits cell cycle progression, results in germline expansion at the expense of oocyte quality in adult female mice. *Cell Cycle* **6**(21): 2678-2610.

Lerrant Y., Kottler M.L., Bergametti F., Moumni M., Blumberg-Tick J., Counis R. (1995) Expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene is altered by GnRH agonist desensitization in a manner similar to that of gonadotropin beta-subunit genes in normal and castrated rat pituitary. *Endocrinology* **136**(7):2803-2808.

Levan G. (1974) Nomenclature for G-bands in rat chromosomes. *Hereditas* **77**: 37-52.

Limoli C.L., Kaplan M.I., Corcoran J., Meyers M., Boothman D.A., Morgan W.F. (1997) Chromosomal instability and its relationship to other end points of genomic instability. *Cancer Res.* **57**: 5557-5563.

Limoli C.L., Kaplan M.I., Giedzinski E., Morgan W.F. (2001) Attenuation of radiation-induced genomic instability by free radical scavengers and cellular proliferation. *Free. Radic. Biol. Med.* **31**: 10-19.

Limongi M.Z., Pelliccia F., Rocchi A. (2003) Characterization of the human common fragile site FRA2G. *Genomics* **81**: 93-97.

Liu W.S., Fredga K. (1999) Telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences are associated with nucleolus organizer regions (NORs) in the wood lemming, *Chromosome Res.* **7**: 235-240.

Lin K.W., Yan J. (2008) Endings in the middle: Current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutat. Res.* **658**: 95-110.

Lizarralde M., Bolzán A., Bianchi M. (2003) Karyotype evolution in South American subterranean rodents *Ctenomys magellanicus* (Rodentia: Octodontidae): chromosome

rearrangements and (TTAGGG) $_n$  telomeric sequence localizations in  $2n = 34$  and  $2n = 36$  chromosomal forms. *Hereditas* **139**: 13–17.

Lorimore S.A., Coates P.J., Wright E.G. (2003) Radiation-induced genomic instability and bystander effects: inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation. *Oncogene* **22**: 7058-7069.

Lyon M.F., Renshaw R. (1988) Induction of congenital malformation in mice by parental irradiation: transmission to later generations. *Mutat. Res.* **198**: 277-283.

## M

Madan K. (1995) Paracentric inversion: a review. *Hum Genet.* **96**: 503-515.

Mangelsdorf M., Ried K., Woollatt E., Dayan S., Eyre H., Finnis M., Hobson L., Nancarrow J., Venter D., Baker E., Richards R.I. (2000) Chromosomal fragile site FRA16D and DNA instability in cancer. *Cancer Res* **60**:1683-1689.

Marder B.A., Morgan W.F. (1993) Delayed chromosomal instability induced by DNA damage. *Mol. Cell Biol.* **13**: 6667-6677.

Martínez-Flores I. (1997) Estudio de la primera profase meiótica de la rata (*Rattus norvegicus*). Efectos de las radiaciones ionizantes en ovocitos inmaduros de ratas irradiadas en diferentes edades de desarrollo. Tesis doctoral. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona.

Martínez-Flores I., Egozcue J., Garcia M. (1998) Effects on female fertility and germinal cells in prepubertal and adult rats (*Rattus norvegicus*) after X-ray irradiation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **444**: 215-219.

Martínez-Flores I., Saez C., Egozcue J., Garcia M. (2000) Effects of ionizing radiation on oocytes of prepubertally irradiated rats. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**: 1403-1407.

Martínez-Flores I., Egozcue J., Cabero L., Garcia M. (2001) Synaptic behaviour of some structural and numerical chromosome anomalies in female and male rats (*Rattus norvegicus*) *Histol. Histopathol.* **16**(3): 701-706.

Mateuca R., Lombaert N., Aka P.V., Decordier I., Kirsch-Volders M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* **88**(11): 1515-31.

McAllister B., Greenbaum I.F. (1997) How common are common fragile sites: variation of aphidicolin-induced chromosomal fragile sites in a population of the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). *Hum. Genet.* **100**:182-188.

Mechsner S., Bartley J., Halis G., Lange J., Loddenkemper C., Ebert A.D. (2002) Endometrial carcinoma using GnRH analogues therapy in endometriosis. *Zentralbl. Gynakol.* **124**(10): 478-481.

Mefford H.C., Trask B.J. (2002) The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 91–102. Review.

- Meirow D., Assad G., Dor J., Rabinovici J. (2004) The GnRH antagonist cetrorelix reduces cyclophosphamide-induced ovarian follicular destruction in mice. *Hum. Reprod.* **19**(6): 1294-1299.
- Metcalfe C.J., Elridge M.D., McQuade L.R. Johnston P.G. (1997) Mapping the distribution of the telomeric sequence (T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>n</sub> in rock-wallabies, *Petrogale* (Marsupialia: Macropodidae), by fluorescence *in situ* hybridization. The penicillata complex. *Cytogenet. Cell Genet.* **78**: 74-80.
- Metcalfe C.J., Elridge M.D., Toder R., Johnston P.G. (1998) Mapping the distribution of the telomeric sequence (T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>n</sub> in the Macropodoidea (Marsupialia), by fluorescence *in situ* hybridization. The swamp wallaby, *Wallabia bicolor*. *Chromosome Res.* **6**: 603-610.
- Meyne J., Ratliff R.L., Moyzis R.K. (1989) Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7049-7053.
- Meyne J., Baker R.J., Hobart H.H., Hsu T.C., Ryder O.A., Ward O.G., Wiley J.E., Wurster-Hill D.H., Yates T.L., Moyzis R.K. (1990) Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* **99**: 3-10.
- Miró R., Clemente I.C., Fuster C., Egozcue J. (1987) Fragile sites, chromosome evolution, and human neoplasia. *Hum. Genet.* **75**: 345-349.
- Mishmar D., Rahat A., Scherer S.W., Nyakatura G., Hinzmann B., Kohwi Y., Mandel-Gutfroind Y., Lee J.R., Drescher B., Sas D.E., Margalit H., Platzer M., Weiss A., Tsui L.C., Rosenthal A., Kerem B. (1998) Molecular characterization of a common fragile site (FRA7H) on human chromosome 7 by the cloning of a simian virus 40 integration site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 8141-8146.
- Mitelman F., Mertens F., Johansson B. (1997) A breakpoint map recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasias. *Nat. Genet.* **15**: 413-474.
- Mohr U., Dasenbrock C., Tillmann T., Kohler M., Kamino K., Hagemann G., Morawietz G., Campo E., Cazorla M., Fernandez P., Hernandez L., Cardesa A., Tomatis L. (1999) Possible carcinogenic effects of X-rays in a transgenerational study with CBA mice. *Carcinogenesis* **20**: 325-332.
- Mondello C., Pirzio L., Azzalin C.M., Giulotto E. (2000) Instability of interstitial telomeric sequences in the human genome, *Genomics* **68**: 111-117.
- Morelli C., Karayianni E., Magnanini C., Mungall A.J., Thorland E., Negrini M., Smith D.I., Barbanti-Brodano G. (2002) Cloning and characterization of the common fragile site FRA6F harboring a replicative senescence gene and frequently deleted in human tumors. *Oncogene* **21**:7266-7276.
- Morgan W.F., Corcoran J., Hartmann A., Kaplan M.I., Limoli C.L., Ponnaiya B. (1998) DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability. *Mutat. Res.* **404**: 125-128.
- Morgan W.F. (2003) Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other nontargeted effects of exposure to ionizing radiation? *Oncogene* **22**: 7094-7099.

Morris I.D. (1993) Protection against cytotoxic-induced testis damage-- experimental approaches. *Eur. Urol.* **23**(1): 143-147.

Mothersill C., Kadhim M.A., O'Reilly S., Papworth D., Marsden S.J., Seymour C.B., Wright E.G. (2000) Dose- and time-response relationships for lethal mutations and chromosomal instability induced by ionizing radiation in an immortalized human keratinocyte cell line. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**: 799-806.

Moyzis R.K., Buckingham J.M., Cram L.S., Dani M., Deaven L.L., Jones M.D., Meyne J., Ratliff R.L., Wu J.R. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 6622-6626.

Musio A., Rainaldi G., Sbrana I. (1996) Spontaneous and aphidicolin-sensitive fragile site 3cen co-localizes with the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in Chinese hamster cells. *Cytogenet. Cell Genet.* **75**: 159-163.

Musio A., Mariani T. (1999) Distribution of interstitial telomere-related sequences in the human genome and their relationship with fragile sites. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **18**: 11-15.

## N

Nanda I., Schneider-Rasp S., Winking H., Schmid M. (1995) Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements. *Chromosome Res.* **3**: 399-409.

Natarajan A.T. (1984) Origin and significance of chromosomal alterations. In *Mutation in man*. Ed. Springer Verlag Berlin Heidelberg. 156-176.

Natarajan A.T. (1993). Mechanisms for induction of mutations and chromosome alterations. *Environ. Health Perspect.* **101** Suppl. 3: 225-229.

Nergadze S.G., Rocchi M., Azzalin C.M., Mondello C., Giulotto E. (2004) Insertion of Telomeric Repeats at Intrachromosomal Break Sites During Primate Evolution. *Genome Res.* **14**(9):1704-10.

Nilsson S., Helou K., Walentinsson A., Szpirer C., Nerman O., Stahl F. (2001) Rat-mouse and rat-human comparative maps based on gene homology and high-resolution Zoo-FISH. *Genomics* **74**: 287-298.

Niwa O. (2003) Induced genomic instability in irradiated germ cells and in the offspring; reconciling discrepancies among the human and animal studies. *Oncogene* **22**: 7078-7086.

Niwa O. (2006) Indirect mechanisms of genomic instability and the biological significance of mutations at tandem repeat loci. *Mutat. Res.* **598**: 61-72.

Nomura T. (2003) Transgenerational carcinogenesis: induction and transmission of genetic alterations and mechanisms of carcinogenesis. *Mutat. Res.* **544**: 425-432.

Nomura T. (2006) Transgenerational effects of radiation and chemicals in mice and humans. *J. Radiat. Res.* **47** Suppl. B:83-97.

## P

Parborell F., Pecci A., Gonzalez O., Vitale A., Tesone M. (2002) Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: regulation by epidermal growth factor and the expression of Bcl-2-related genes. *Biol. Reprod.* **67**: 481-486.

Park V.M., Gustashaw K.M., Wathen T.M. (1992) The presence of interstitial telomeric sequences in constitutional chromosomes abnormalities. *Am. J. Hum. Genet.* **50**: 914-923.

Parmar H., Phillips R.H., Lightman S.L., Edwards L.E. (1985a) Early tumor exacerbation in patients treated with long acting analogues of gonadotrophin releasing hormone. *B.M.J.* **291**: 1645.

Parmar H., Phillips R.H., Lightman S.L., Edwards L.E., Allen L., Schally A.V. (1985b) Randomised controlled study of orchidectomy vs long-acting D-Trp-6-LHRH microcapsules in advanced prostatic carcinoma. *Lancet.* **2**(8466): 1201-5.

Parmar H., Rustin G., Lightman S.L. (1988a) Response to D-Trp-6-luteinising hormone releasing hormone (Decapeptyl) microcapsules in advanced ovarian cancer. *B. M. J.* **296**: 1229.

Parmar H., Phillips R.H., Rustin G., Lightman S.L., Schally A.V. (1988b) Therapy of advanced ovarian cancer with D-Trp-6-LH-RH (decapeptyl) microcapsules. *Biomed. Pharmacother.* **42**(8): 531-538.

Parmar H., Phillips R.H., Edwards L.E., Charlton C., Lightman S.L. (1991) Medical or surgical orchidectomy? *B.M.J.* **302**: 1272.

Pass D., Freeth G. (1993) The Rat. *ANZCCART News* **6**(4): 1-4.

Pellegrino K.C., Rodrigues M.T., Yonenaga-Yassuda Y. (1999) Chromosomal evolution in the Brazilian lizards of genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic rain forests: banding patterns and FISH of telomeric sequences. *Hereditas* **131**: 15-21.

Pellicia F., Micheli A., Oliveri G. (1985) Inter- and intra-chromosomal distribution of chromatid breaks induced by X-rays during G<sub>2</sub> in human lymphocytes. *Mutat. Res.* **150**: 293-298.

Pluta A.F., Zakian V.A. (1989) Recombination occurs during telomere formation in yeast. *Nature* **337**: 429-433.

Pogribny I., Raiche J., Slovack M., Kovalchuk O. (2004) Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**: 1253-1261.

Pour P.M., Redding T.W., Paz-Bouza J.I., Schally A.V. (1988) Treatment of experimental ovarian carcinoma with monthly injection of the agonist D-Trp-6-LH-RH: a preliminary report. *Cancer Lett.* **41**(1): 105-110.

Pujol R., Garcia M., Freixa L., Egozcue J. (1988) Sequential study of the synaptonemal complex in rat (*Rattus norvegicus*) oocytes by light and electron microscopy. *Genetica* **77**(3): 179-187.

Pujol R. (1994) Estudi de la primera profase meiótica a oòcits de *Rattus norvegicus*. Efectes citogenètics de les radiacions ionitzants. Tesi doctoral. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.

Pujol, R., Cusidó, L., Rubio, A., Egozcue, J., Garcia, M. (1996). Effect of X-rays on germ cells in female fetuses of *Rattus norvegicus* irradiated at three different times of gestation. *Mutat. Res.* **356**: 247-253.

Pujol, R., Cusidó, L., Rubio, A., Egozcue, J., Garcia, M. (1997). X-ray-induced synaptonemal complex damage during meiotic prophase in female fetuses of *Rattus norvegicus*. *Mutat. Res.* **379**: 127-134.

## R

Rat Genome Sequencing Project Consortium (RGSPC) (2004) *Nature* **428**: 493-521.

Ribas M., Miró R., Gelabert A., Egozcue J. (1999) Chromosome instability in lymphocytes from two patients affected by three sequential primary cancers: the role of fragile sites. *Cancer Genet Cytogenet* **110**:133-135.

Ried K., Finnis M., Hobson L., Mangelsdorf M., Dayan S., Nancarrow J., Woollatt E., Kremmidiotis G., Gardner A., Venter D., Baker E., Richards R. (2000) Common chromosomal fragile site FRA16D sequence: identification of the FOR gene spanning FRA16D and homozygous deletions and translocations breakpoints in cancer cells. *Hum. Mol. Genet.* **9**:1651-1663.

Robinson T.J., Elder F.F.B. Multiple common fragile sites are expressed in the genome of the laboratory rat (1987). *Chromosoma* **96**: 45-49.

Robles P., Roig I., Garcia R., Ortega A., Egozcue J., Cabero L.L., Garcia M. (2007) Pairing and synapsis in oocytes from female fetuses with euploid and aneuploid chromosome complements. *Reproduction.* **133**(5): 899-907.

Robles P. (2008) Trisomía 21: Origen y caracterización meiótica. Tesis doctoral. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona.

Roig I. (2005) Aparellament i sinapsi en oòcits humans. Tesis doctoral. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona.

Roig I., Robles P., Garcia R., Martínez-Flores I., Cabero L., Egozcue J., Liebe B., Scherthan H., Garcia M. (2005a) Chromosome 18 pairing behavior in human trisomic oocytes. Presence of an extra chromosome extends bouquet stage. *Reproduction.* **129**(5): 565-75.

Roig I., Robles P., Garcia R., Martín M., Egozcue J., Cabero L., Barambio S., Garcia M. (2005b) Evolution of the meiotic prophase and of the chromosome pairing process during human fetal ovarian development. *Hum Reprod.* **20**(9): 2463-9.

Roig I., Garcia R., Robles P., Cortvrindt R., Egozcue J., Smitz J., Garcia M. (2006) Human fetal ovarian culture permits meiotic progression and chromosome pairing process. *Hum. Reprod.* **21**(6):1359-1367.

Rossi E., Floridia G., Casali M., Danesino C., Chiumello G., Bernardi F., Magnani I., Papi L., Mura M., Zuffardi O. (1993) Types, stability, and phenotypic consequences of



chromosome rearrangements leading to interstitial telomeric sequences. *J. Med. Genet.* **30**: 926–931.

Ruiz-Herrera A., García F., Azzalin C., Giulotto E., Egozcue J., Ponsà M., García M. (2002a) Distribution of intrachromosomal telomeric sequences (ITS) on *Macaca fascicularis* (Primates) chromosomes and their implication for chromosome evolution. *Hum. Genet.* **110**: 578-586.

Ruiz-Herrera A., Ponsà M., García F., Egozcue J., García M. (2002b) Fragile sites in human and *Macaca fascicularis* chromosomes are breakpoints in chromosome evolution. *Chromosome Res.* **10**: 33-44.

Ruiz-Herrera A., García F., Froenicke L., Ponsà M., Egozcue J., García M., Stanyon R (2004) Conservation of aphidicolin-induced fragile sites in Papionini (Primates) species and humans. *Chromosome Res.* **12**(7): 683-690.

Ruiz-Herrera A., García F., Giulotto E., Attolini C., Egozcue J., Ponsà M., García M. Evolutionary breakpoints are co-localized with fragile sites and intrachromosomal telomeric sequences in primates. *Cytogenet. Genome Res.* **108**: 234–247 (2005a).

Ruiz-Herrera A., García F., Mora L., Egozcue J., Ponsà M., García M. Evolutionary conserved chromosomal segments in the human karyotype are bounded by unstable chromosome bands. *Cytogenet. Genome Res.* **108**: 161-174 (2005b).

## S

Salvador N. (2001) Biología general del reactivo biológico. En: Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal. Capt. 2. Ed McGraw-Hill. Interamericana. 23-82.

Savage J.R.K. (1990). Mechanisms of chromosome aberrations. *Mutation Env.* **B**: 385-396.

Savage J.R.K. (2004). On the nature of visible gaps and breaks. *Cytogenet Genome Res* **104**: 46–55.

Schally A.V., Coy D.H., Arimura A. (1980) LH-RH agonists and antagonists. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **18**(5): 318-324.

Schally A.V., Paz-Bouza J.I., Schlosser J.V., Karashima T., Debeljuk L., Gandle B., Sampson M. (1987) Protective effects of analogs of luteinizing hormone-releasing hormone against X-radiation-induced testicular damage in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 851-855.

Seabright M. (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* **2**(7731): 971-972.

Sharma G.G., Sharma T. (1998) Unusual chromosomal organization of telomeric sequences and expeditious karyotypic differentiation in the recently evolved *Mus terricolor* complex. *Cytogenet. Cell Genet.* **80**: 204–208.

Shimada A., Shima A. (2004) Transgenerational genomic instability as revealed by a somatic mutation assay using the medaka fish. *Mutat. Res.* **552**: 119-124.

- Shiraishi K., Shimura T., Taga M., Uematsu N., Gondo Y., Ohtaki M., Kominami R., Niwa O. (2002) Persistent induction of somatic reversions of the pink-eyed unstable mutation in F<sub>1</sub> mice born to fathers irradiated at the spermatozoa stage. *Radiat. Res.* **157**: 661-667.
- Silva M.J., Yonenaga-Yassuda Y. (1997) New karyotypes of two related species of *Oligoryzomys* genus (Cricetidae, Rodentia) involving centric fusion with loss of NORs and distribution of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences. *Hereditas* **127**: 217-229.
- Silva M.J., Yonenaga-Yassuda Y. (1998a) Heterogeneity and meiotic behaviour of B and sex chromosomes, banding patterns and localization of (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences by fluorescence *in situ* hybridization in the neotropical water rat *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae). *Chromosome Res.* **6**: 455-462.
- Silva M.J., Yonenaga-Yassuda Y. (1998b) Karyotype and chromosomal polymorphism of an undescribed *Akodon* from Central Brazil, a species with the lowest known diploid chromosome number in rodents. *Cytogenet. Cell Genet.* **81**: 46:50.
- Silva M.J., Yonenaga-Yassuda Y. (1999) Autosomal and sex chromosomal polymorphisms with multiple rearrangements and a new karyotype in the genus *Rhipidomys* (Sigmodontinae, Rodentia). *Hereditas* **131**: 211-220.
- Simi S., Attolini C., Giulotto E. (1998) Intrachromosomal telomeric repeats and stabilization of truncated chromosomes in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* **397**: 229-233.
- Siris E.S., Leventhal B.G., Vaitukaitis J.L. Effects of childhood leukemia and chemotherapy on puberty and reproductive function in girls. (1976). *N. Engl. J. Med.* **294**: 1143-1146.
- Skaznik-Wikiel M., Tilly J.C., Lee H-J., Niiikura Y., Kaneko-Tarui T., Johnson J., Tilly J.L. (2007) Serious doubt over 'Eggs forever?' *Differentiation* **75**: 93-99.
- Slijepcevic P., Xiao Y., Dominguez I., Natarajan A.T. (1996) Spontaneous and radiation-induced chromosomal breakage at intersitial telomeric sites. *Chromosoma* **104**: 596-604.
- Slovinská L., Elbertova A., Misurova E. (2004) Transmission of genome damage from irradiated male rats to their progeny. *Mutat. Res.* **559**: 29-37.
- Smeets D.F., van de Klundert F.A. Common fragile sites in man and three closely related primate species (1990). *Cytogenet. Cell Genet.* **53**: 8-15.
- Stanyon R., Yang F., Cavagna P., O'Brien P.C.M., Bagga M., Ferguson-Smith M.A., Wienberg J. (1999) Reciprocal chromosome painting shows that genomic rearrangement between rat and mouse proceeds ten times faster than between humans and cats. *Cytogenet. Cell Genet.* **84**: 150-155.
- Streffer C. (2004) Bystander effects, adaptive response and genomic instability induced by prenatal irradiation *Mutat. Res.* **568**: 79-87.
- Sugiyama M., Imai A., Takahashi S., Hirano S., Furui T., Tamaya T. (2003) Advanced indications for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogues in gynecological oncology. *Int. J. Oncol.* **23**: 445-452. Review.

Sumner A.T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* **75**: 304-306.

Sutherland G.R. (1979) Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. *Am. J. Hum. Genet.* **31**: 125-135.

Sutherland G.R., Richards R.I. (1999) Fragile sites-cytogenetic similarity with molecular diversity. *Am. J. Hum. Genet.* **64**: 354-359.

Szpirer C., Szpirer J., Klinga-Levan K., Stahl F., Levan G. (1996) The rat: An experimental animal in search of a genetic map. *Folia Biol.* **42**: 175-226.

## T

Tateno H., Mikamo K. (1989) Effects of neonatal ovarian X-irradiation in the Chinese hamster. II. Absence of chromosomal and developmental damages in surviving oocytes irradiated at the pachytene and resting dictyate stages. *J. Radiat. Res. (Tokyo)*. **30**(3): 209-17.

Tease C., Fisher G. (1991). The influence of maternal age on radiation-induced chromosome aberrations in mouse oocytes. *Mutat. Res.* **262**: 57-62.

Tease C., Fisher G. (1996a) Cytogenetic and genetic studies of radiation-induced chromosome damage in mouse oocytes. I. Numerical and structural chromosome anomalies in metaphase II oocytes, pre- and post-implantation embryos. *Mutat. Res.* **349**: 145-153.

Tease C., Fisher G. (1996b) Cytogenetic and genetic studies of radiation-induced chromosome damage in mouse oocytes. II. Induced chromosome loss and dominant visible mutations. *Mutat. Res.* **349**: 155-162.

Thorland E.C., Myers S.L., Persing D.H., Sarkar G., McGovern R.M., Gostout B.S., Smith D.I. (2000) Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res.* **60**: 5916-5921.

Torres M., Donadio N., Donadio N.F., Brandao A.C. Heck B. (2005) Comparison of embryo implantation in Wistar rats that underwent ovarian stimulation using exogenous gonadotropins associated with cetrorelix acetate or leuprolide acetate. *Fertil. Steril.* **84** Suppl. 2: 1235-1240.

## U

UNSCEAR (1986). Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Report to the General Assembly with Annexes. United Nations Sales publication. E.86. IX 9. United Nations. New York.

**V**

Vermeesch J.R., de Meurichy W., van den Berghe H, Marynen P., Petit P. (1996) Differences in the distribution and nature of the interstitial telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in the chromosomes of the Giraffidae, okapi (*Okapia johnstoni*), and giraffe (*Giraffa camelopardalis*): evidence for ancestral telomeres at the okapi polymorphic rob(5;26) fusion site. *Cytogenet. Cell Genet.* **72**: 310-315.

Vermeesch J.R., Petit P., Speleman F., Devriendt K., Fryns J.P., Marynen P. (1997) Interstitial telomeric sequences at the junction site of a jumping translocation. *Hum. Genet.* **99**: 735-737.

von Alten J., Fister S., Schulz H., Viereck V., Frosch H., Emons G., Gründker C. (2006) GnRH analogs reduce invasiveness of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **100**: 13-21.

Vorobtsova I.E., Aliyakparova L.M., Anisimov V.N. (1993) Promotion of skin tumors by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two generations of descendants of male mice exposed to X-ray irradiation. *Mutat. Res.* **287**: 207-216.

Vorobtsova I.E. (2000) Irradiation of male rats increases the chromosomal sensitivity of progeny to genotoxic agents. *Mutagenesis* **15**: 33-38.

Vyas R.C., Darroudi F., Natarajan A.T. (1991). Radiation-induced chromosomal breakage and rejoining in interphase-metaphase chromosomes of human lymphocytes. *Mutat. Res.* **249**: 25-29.

**W**

Waxman J. (1987) Preserving Fertility in Hodgkin's Disease. *Ballière's Clin. Haematol.* **1** (1): 185-190.

Weissman A., Barash A., Shapiro H., Casper R.F. (1998) Ovarian hyperstimulation following the sole administration of agonistic analogues of gonadotrophin releasing hormone. *Hum. Reprod.* **13** (12): 3421-3424.

Whitehead E., Shalet S.M., Morris-Jones P.M., Beardwell C.G., Deakin D.P. (1982) Gonadal function after combination chemotherapy for Hodgkin's disease in childhood. *Archives of Disease in Childhood* **47**: 287-291.

Wilke C.M., Hall B.K., Hoge A., Paradee W., Smith D.I., Glover T.W. (1996) FRA3B extends over a broad region and contains a spontaneous HPV16 integration site: direct evidence for the coincidence of viral integration sites and fragile sites. *Hum. Mol. Genet.* **5**:187-195.

Wirth M.P., Hakenberg O.W., Froehner M. (2007) Optimal treatment of locally advanced prostate cancer. *World J. Urol.* **25**: 169-176.

Witt K.L., Bishop J.B. (1996) Mutagenicity of anticancer drugs in mammalian germ cells. *Mutat. Res.* **355**: 209:234.

Wu J., Morimyo M., Hongo E., Higashi T., Okamoto M., Kawano A., Ohmachi Y. (2006) Radiation-induced germline mutations detected by a direct comparison of parents and first-generation offspring DNA sequences containing SNPs. *Mutat. Res.* **596**: 1-11.

## Y

Yano T., Yano N., Matsumi H., Morita Y., Tsutsumi O., Schally A.V., Taketani Y. (1997) Effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogs on the rat ovarian follicle development. *Horm. Res.* **48** Suppl. 3: 35-41.

Yunis J.J., Prakash O. (1982) The origin of man: A chromosomal pictorial legacy. *Science* **215**: 1425-1530.

Yunis J.J. (1983) The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* **221**: 227-236.

Yunis J.J., Soreng A.L. (1984) Constitutive fragile sites in cancer. *Science* **226**: 1199-1204.

## Z

Zneimer S.M., Cotter P.D., Stewart S.D. (2000) Telomere-telomere (end to end) fusion of chromosomes 7 and 22 with an interstitial deletion of chromosome 7p11.2→p15.1: phenotypic consequences and possible mechanisms. *Clin. Genet.* **58**: 129-133.

Zou Y., Yi X., Wright W.E., Shay J.W. (2002) Human telomerase can immortalize Indian Muntjac cells. *Exp. Cell Res.* **281** 63-76.

Zuckerman S. (1951) The number of oocytes in the mature ovary. *Rec. Prog. Horm. Res.* **6**: 63-109

## Referències on line

[www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)

[www.ratmap.gen.gu.se](http://www.ratmap.gen.gu.se)

[embryology.med.unsw.edu.au](http://embryology.med.unsw.edu.au)

## 7. Abreviatures

*Absence of evidence is not evidence of absence.*

Carl Sagan



## ABREVIATURES

A	grup/ps de femelles tractades amb GnRH $\alpha$
A + 12	grup/ps de femelles tractades amb GnRH $\alpha$ i irradiades a 12 Gy
A + 5	grup/ps de femelles tractades amb GnRH $\alpha$ i irradiades a 5 Gy
Ab	alteració/ions cromosòmica/iques
AC	alteració/ions cromosòmica/iques
ace chs	fragment de cromosoma
ace cht	fragment de cromàtide
ace	fragment acèntric
apc	afidicolina
APC	grup/ps amb tractament de mutagen químic afidicolina
C Fe	codi del fetus estudiat
C Ma	codi de la femella tractada
C	grup/ps de femelles control
C + 12	grup/ps de femelles irradiades a 12 Gy
C + 5	grup/ps de femelles irradiades a 5 Gy
chsb	trencament de cromosoma
chsg	<i>gap</i> de cromosoma
chtb	trencament de cromàtide
chtg	<i>gap</i> de cromàtide
CI	inestabilitat cromosòmica
CL	cossos lutis
del chs	deleció de cromosoma
del cht	deleció de cromàtide
dic	cromosoma dicèntric
DSB	trencament/ts de DNA de doble cadena
dup	duplicació
F	fetus
f	fusió
FSH	hormona estimuladora del fol·licle
GI	inestabilitat genòmica
Gn	gonadotrofines
GnRH	hormona alliberadora de gonadotrofines
GnRH $\alpha$	anàleg/gs agonista/tes de l'hormona alliberadora de gonadotrofines
HSA	espècie <i>Homo sapiens</i>
I	implantacions
ins	inserció
inv	inversió
IR	grup/ps de femelles irradiades



---

IR-APC	grup/ps de femelles irradiades i amb cultius tractats amb apc
ITS	seqüència/ies telomèrica/iques intersticial/ls
LH	hormona luteïnitzant
LLF	lloc/cs fràgil/ls
M An	metafases analitzades
mar	cromosoma marcador
r	cromosoma en anell
re	reorganització cromosòmica
RI	radiació ionitzant
RICI	inestabilitat cromosòmica radioinduída
RIGI	inestabilitat genòmica radioinduída
RNO	rata, espècie <i>Rattus norvegicus</i>
SD	soca Sprague-Dawley de l'espècie <i>Rattus norvegicus</i>
SSB	trencament/ts de DNA de cadena senzilla
t	translocació





## Agraïments

*Mai no es va tan lluny com quan no se sap on es va.*

Oliver Cromwell



Buf!... ja estic... ja he acabat...!

Fa uns quants anys –algú potser ho recordarà– vaig dir: '*si als 30 no he acabat, ho deixo!*'. Ai ai... com podeu veure, no ho vaig fer (i me n'alegro).

Des del juliol del 2000 fins ara ha passat molt temps. Massa? No ho sé, si arribo a saber que és tan dur això de les tesis... doncs suposo que segurament ho hauria fet igualment. Sóc una mica massoca, què hi farem...

Hi ha hagut moments de tot, dies molt macos, on tot et surt rodó, quan tens temps de fer tot el que havies planejat (pooocs, molt pooocs), quan les tècniques et surten bé, quan amb un *porta* et *poleixes* les 100 metafases, quan pots analitzar sense interrupció amb la ràdio a tot drap, quan tens algú al microscopi o a la poiata del costat que va comentant la jugada... quan no t'has de quedar fins tard... i dies desastre (i no diré quins...).

Durant tot aquest camí he conegut molta gent. Alguns m'heu ajudat molt, moltíssim; altres m'heu fet costat, heu compartit estones de feina i moments fora de la feina amb mi; altres senzillament us heu interessat per mi o heu preguntat per mi.

Us dono les gràcies a tots!

M'agradaria, però, donar les gràcies a gent molt especial, que m'han acompanyat durant el meu trajecte, durant la meva tesi.

Primer de tot, a les meves *jefes*, Montse i Paqui. Gràcies per tot. Montse, gràcies per confiar en mi, per tenir tanta paciència, per totes les oportunitat que m'has ofert, per preocupar-te pel meu futur, per *donar-me canya* quan calia, pels *springs* finals. Paqui, gràcies ser-hi sempre que t'he necessitat, per aconsellar-me, per no enfadar-te mai, per donar-me el teu punt de vista, per tranquil·litzar-me i per preocupar-te per mi.

A les *citogirls*,

Osti tu... us en recordeu quan teníem la ràdio engegada (a tot drap!) tot el dia? Aquella ràdio tan velleta que va portar la Laia? Quins moments...

Laura... quina tia més alegre, més natural, més espontània, (la veritat és que quan et vaig conèixer, vas ser un xoc per mi!), és que tens unes sortides... no canviïs mai. Laia, què diferents que som eh?! (Tu també em vas marcar des del primer dia) Gràcies per ajudar-me sempre t'ho he demanat, per tenir les idees tan clares, per ser tan franca, per ser tan autèntica. Marta, que vols que et digui, que conèixer-te ha estat un plaer. És que em sento tant bé amb tu... ets una persona sensacional. Ets a la que he de donar més les gràcies no només perquè m'has fet costat durant tot aquest temps, sino perquè m'has anima't, sempre has cregut en mi, m'has ofert la teva mà, encara que no t'ho hagués demanat.. (que sí..., que ja ho sé que em costa demanar ajuda). M'has ajudat tant!

I les fondues... lo millor de lo millor, les prèvies: aquells vídeos, creacions teatrals, guions, *brainstormings*, rodatges a hores intempestives... el *catxondeo*, vaja.

He considerat casa meva aquest laboratori mig destartat durant tot aquest temps. En part, pel fet d'haver-hi treballat tants i tant dies, a horaris normals, a deshores, caps de setmana, festius, nits, però sobretot per les persones que en formàvem part. Nenes, gràcies per les llargues xerrades, per explicar-me el que fós, per fer-me confiança, per ajudar-me tant, per crear tan bon rotllo al laboratori, per ser les meves amigues. Sou fantàstiques!

I la gent de l'IBB? Mare meva quins artistassos, quines *fondues*. Txino, gràcies per ser-hi sempre que t'hem necessitat. David, gràcies per animar-me i per desmitificar una mica tot això de les tesis (que ja anava bé de tant en tant). A tots els que us heu interessat per la *curiosa* situació de citogenètica a l'IBB durant tots aquest anys, gràcies.

A la gent de Biologia Cel·lular de Medicina, moltes gràcies.

Imma: m'has ajudat molt i sempre t'estaré agraïda. Enyoraré les xerrades al passadís, al laboratori, al teu despatx. Gràcies per deixar-ho tot i ajudar-me sempre que t'ho he demanat. Sàpigues que sempre recordaré aquella conversa que vàrem tenir només arribar a aquesta casa... Ets una tia (i amiga) excepcional!

A la gent del meu grup: a la Raquel (encantadora), al Miguel (el meu mexicà preferit!), al Pedro (el més bona persona), a l'Ignasi (què bé que s'hi està a casa teva!) i a l'Aurora (la més internacional). Potser cadascú ha anat bastant al seu rotllo i, de fet, ja era el que tocava, oi?, però crec que ens hem entès bastant bé, no? Gràcies per ajudar-me sempre!

A la Carme Fusté, per interessar-te per mi i per ser tan propera durant tots aquests anys. A la resta de la unitat (i no voldria deixar-me a ningú!): al Javi (ets un tio guai!), a l'Esther Prat, a la Núria Pujol (ens hem retrobat!), a la Laia Uroz (què maca que ets), a la Maria Oliver, a l'Albert Obradors (el més entusiasta), a la Mariona Rius, a la Montserrat Codina, a la Cristina Gutiérrez i al Jorge Sánchez (els americans!), a l'Aïda Casanovas, a la Cristina Hernando, a la Mònica Santos, a l'Ariadna Escalona, a la Gemma Monyarch, a la Rosana de la Chica, a la Núria Arnedo, a l'Ana Donate, al Sergio, a la Yolanda, a la Vanessa, a l'Agustí, a la Gemma Daina, a la Nora Fernández (profè!), al Pere Puig, a l'Àngels Niubo, a l'Ana Utrabo, al Jordi Benet, a la Joaquina Navarro, a la Rosa Miró i a la Cristina Templado, moltes gràcies per ajudar-me i per aguantar-me!

A la gent de Biologia Cel·lular de Ciències,

Nerea, ets una tia supermaca, m'ha agradat molt conèixer-te. Assumpta, que *sui generis*... un plaer conversar amb tu. Cristina, ets una noia fantàstica. Qui ho havia de dir, quan ens vam conèixer fa tants anys, que acabaríem al mateix lloc? Has estat una sorpresa mooolt agradable. A la resta, com que no em vull deixar a ningú... prefereixo no posar noms (va..., en posaré alguns, però no us sentiu exclosos...) Nuno, Sheila, Zaida, Mariona, Óscar, Marta F, Ester, Judit, Sílvia, Gema... Gràcies a tothom pel vostre bon rotllo i la bona acollida, per obrir-me les portes (fins i tot els caps de setmana... ja sabeu qui vull dir), per reservar-me hores i

deixar-me els cytos o el que fós quan ho vaig necessitar. I per últim, al Josep Egozcue, per ser una persona tan especial, propera i inspiradora.

Als de Vall d'Hebrón,

Primer de tot, gràcies a la Núria Torán i al Joan Carles Ferreres. Gràcies per totes les hores passades, per animar-me a acabar, pels vostres consells, pel vostre sentit de l'humor i per tota la vostra ajuda. Al Javier de la Torre, per la seva acollida quan vaig arribar. Al Santiago Ramón y Cajal, per creure en la recerca.

Als del laboratori d'AP: Javier Hernández, Teresa Moliné, Rosa Somoza, Cristina Teixidó, Laura Fernández, Laura López, Berta Pons, Eli Argelaget, Laura Coch, Gemma Armengol, Eva Álvarez, Teresa Osteso, Anna Solsona, M. Ángeles i resta de gent que ha passat pel laboratori. Sou una gent mooolt especial per mi i no sabeu el que m'ha ajudat tota la conya que hem portat tot aquest temps amb lo de *doctora cap amunt i doctora cap avall...* sou autèntics! Moltes gràcies guapos!

Pel que fa a gent del meu grup, els d'endocrinologia pediàtrica a l'IR-HUVH, gràcies a la Laura Audí i a l'Antonio Carrascosa, per creure en mi i donar-me aquesta oportunitat. Laura, gràcies per haver estat tan comprensiva i per haver-me donat el temps que fés falta per acabar. Gràcies a la Mònica, la Pilar i l'Ester per tenir tanta paciència!

Als de Balagué Center, un record molt especial a la Neus Baena, a la Magui, a la Mari L, a la Mari C, a l'Ana B, a la Marta M, la Montse P, el Gerard, i a la resta (no em voldria deixar a ningú!). Neus, gràcies per donar-me l'oportunitat de treballar amb vosaltres i per confiar en mi des del primer moment. La meva primera feina com a biòloga no l'oblidaré mai.

Als de Cerba: a la Desi, a la M. Àngels Rigola, a la Cristina i a la resta de personal, tant tècnics i biòlegs (tampoc no em vull deixar ningú!), moltíssimes gràcies. Amb vosaltres em vaig introduir en el meravellós món de la citogenètica. No ho oblidaré mai. M. Àngels, gràcies per haver cregut en mi des del principi. Desi, gràcies per ensenyar-me a cariotipar; Cristina, gràcies per ensenyar-me les tècniques. Gràcies a tots per tenir tanta paciència i per fer-me sentir tan bé al laboratori.

*¡Murcianos! A los del SACE: a Antonia Bernabé, a Juana Reverte, a Dori y a Pepe: gracias por abrirme las puertas del servicio, por preocuparos por mi cada día que estuve allí, por hacerme sentir como en casa. ¡Nunca os olvidaré! Al Dr Juan José Parrilla, a Maribel Acien, a Pilar Payá y a Manolo Remezal: ¡gracias por todo!*

Als meus amics, als que sempre heu estat al meu costat, als que m'heu inspirat (Cristina del Sant Josep), als que he conegut durant el llarg recorregut, als que he retrobat al cap del temps, als que heu seguit pel mateix camí, a tots els que realment m'importeu: Marta (ets molt especial), Elisabet (ànims! tu pots!), Lorena (marassa!), Magda (tants anys!), Sílvia P



(ja et queda poc!), Martí i Laura (els que he tingut més a la vora els últims anys, sou fantàstics!), Chema (estic tan contenta per tu), a la resta de la Penya Xunga (és que no em vull deixar ningú perquè sou tants!, em sento tan bé amb vosaltres...), a la gent de les *damniparties* (nenes sou genials!) i d'altres sopars i trobades recents (ja sabeu qui vull dir... *all in!*), a la gent de Guissona (amics retrobats i amics de tota la vida), als meus companys de *tai chi* (sou tan macos!), a la gent de la UAB (com que no em vull deixar a ningú, pero aquí, i si no us he posat... perdoneu!): gràcies per ser-hi!

I per últim, a les persones més importants de la meva vida,

Mare, et dono les gràcies per creure en mi sempre, per estimular totes les meves aficions, per les lliçons de vida que cada dia m'has donat (fins i tot sense ser-ne conscient), per ser com ets, per estar sempre disponible, per estimar-me tant!

Pare, gràcies per ser tan pacient, per no dir mai que no, per ser tan comprensiu amb el camí que he triat, per creure en mi, per ajudar-me tant, per ser tan bo.

Jordi, gràcies per les nostres converses, per aquells moments d'estimulació intel·lectual i científica, per acompanyar-me en tots els moments més alts i més baixos, pel teu punt de vista tan humà i sensat de les coses, per ser el millor germà que es pot tenir, per ser tan gran.

Cristina, gràcies per ser la meva nova germana i demostrar-m'ho.

Avi, gràcies pel seu sentit de l'humor i per passar-nos-el!... el *norantero* més xispós del món!

També gràcies a la iaia, a l'àvia i al padrí, us porto en el meu cor.

I a la resta de la meva família, tiets, tietes, cosins i cosines, moltes gràcies pel vostre suport!

*El treball en el qual trobem plaer cura la pena que causa.*

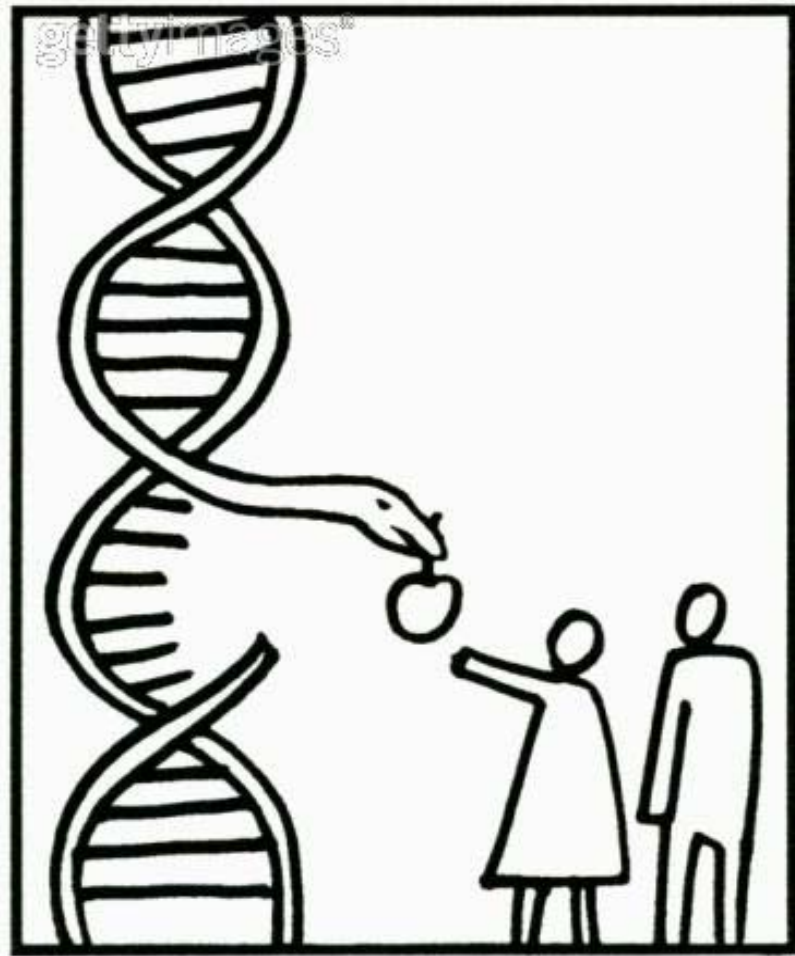
William Shakespeare

*L'amor és l'única cosa que creix quan es reparteix.*

Antoine de Saint-Exupéry























**Inestabilitat cromosòmica transgeneracional i radioprotecció en rata**

**Núria Camats Tarruella**

**Tesi doctoral**

**2009**