



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Posicionament cromosòmic
en cèl·lules de l'espermatogènesi
de *Mus musculus*

Mireia Solé i Canal

Tesi doctoral 2018





Universitat Autònoma de Barcelona

Posicionament cromosòmic
en cèl·lules de l'espermatogènesi de *Mus musculus*

Mireia Solé i Canal

Memòria presentada per optar al Grau de Doctora en Biologia Cel·lular per la Universitat
Autònoma de Barcelona

Tesi doctoral inscrita en el Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia,
Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona

Directors:

Dra. Zaida Sarrate i Navas

Dr. Joan Blanco Rodríguez

Bellaterra · 2018



Universitat Autònoma de Barcelona

La Dra. **Zaida Sarrate i Navas**, professora del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

i el Dr. **Joan Blanco Rodríguez**, professor del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEN

Que **Mireia Solé i Canal** ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació que s'exposa en la memòria titulada "**Posicionament cromosòmic en cèl·lules de l'espermatogènesi de *Mus musculus***" per optar al grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball s'ha dut a terme a la Unitat de Biologia Cel·lular del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè així consti, signen el present certificat.

Dra. Zaida Sarrate i Navas

Dr. Joan Blanco Rodríguez

Mireia Solé i Canal

Bellaterra, 13 de novembre de 2018



Universitat Autònoma de Barcelona

La present tesi doctoral s'ha desenvolupat amb el finançament dels projectes:

- CF-180034, Universitat Autònoma de Barcelona
- SGR2014-524, Generalitat de Catalunya

Mireia Solé i Canal ha estat beneficiària d'una beca predoctoral per a Personal Investigador en Formació (PIF, 2015), concedida per la Universitat Autònoma de Barcelona.

ÍNDEX DE CONTINGUTS

RESUM	1
SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓ	5
Territoris cromosòmics	7
Factors que condicionen la territorialitat cromosòmica	9
Aspectes funcionals de la territorialitat cromosòmica	14
Territoris cromosòmics en l'espermatogènesi	17
Alteracions del patró de distribució dels territoris cromosòmics en l'espermatogènesi i la seva relació amb la infertilitat	25
2. OBJECTIUS	27
3. MATERIALS I MÈTODES	31
Mostres biològiques	33
Protocols de processament	33
Protocol 1: disgregació del teixit testicular	33
Protocol 2: adhesió cel·lular a portaobjectes polilisinitzats	34
Protocol 3: fixació cel·lular	36
Protocol 4: tractaments previs al procés d'hibridació	37
Protocol 5: hibridació in situ fluorescent	38
Protocol 6: identificació i captura de cromosomes	41
Protocol 7: immunofluorescència	43
Protocol 8: processament i anàlisi d'imatges	47
Protocol 9: tractament de dades i anàlisi estadística	50
4. RESULTATS	59
Espermatogoni-espermatòcit I a l'estadi de preleptotè inicial	61
Anàlisi del volum cromosòmic	62
Anàlisi de la distribució radial	65
Anàlisi de la distribució relativa	70
Anàlisi de l'encavalcament de cromosomes amb regions NOR	73
Espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè	74
Anàlisi del volum cromosòmic	74

Anàlisi de la distribució radial	77
Anàlisi de la distribució relativa	82
Anàlisi de l'encavalcament de cromosomes amb regions NOR	82
Espermatòcits i a l'estadi de paquitè	86
Anàlisi del volum cromosòmic	87
Anàlisi de la distribució radial	88
Anàlisi de la distribució relativa	93
Anàlisi de l'encavalcament de cromosomes amb regions NOR	97
Espermàtides rodones	97
Anàlisi del volum cromosòmic	98
Anàlisi de la distribució radial	99
Anàlisi de la distribució relativa	105
Anàlisi de l'encavalcament de cromosomes amb regions NOR	109
Espermatozoides	110
Anàlisi del volum cromosòmic	110
Anàlisi de la distribució radial	112
Anàlisi de la distribució relativa	118
Anàlisi de la distribució longitudinal	119
Anàlisi comparatiu del posicionament cromosòmic	124
5. DISCUSSIÓ	125
Proximitat dels cromosomes homòlegs	127
Volum nuclear ocupat pels cromosomes	130
Posicionament radial	130
Posicionament relatiu	137
Posicionament longitudinal als espermatozoides	142
Perspectives futures	143
6. CONCLUSIONS	145
BIBLIOGRAFIA	149
ANNEX	167

RESUM

Els cromosomes ocupen regions específiques del nucli anomenades territoris cromosòmics. En cèl·lules somàtiques, el posicionament dels cromosomes està condicionat per la densitat gènica, l'activitat transcripcional i el contingut de guanina-citosina. Aquestes associacions evidencien l'existència d'una relació funcional entre la territorialitat cromosòmica i l'expressió gènica. Disposem de poques dades sobre el posicionament cromosòmic durant l'espermatogènesi. Alguns autors suggereixen que la distribució dels cromosomes en cèl·lules espermatogèniques podria condicionar el correcte desenvolupament de l'espermatogènesi i tenir implicacions en l'expressió gènica de l'embrió.

L'objectiu d'aquesta tesi doctoral va ser establir un model tridimensional de la territorialitat cromosòmica durant les diferents fases del procés de l'espermatogènesi de *Mus musculus*. Per assolir aquest objectiu es va desenvolupar una metodologia per a l'estudi tridimensional del posicionament cromosòmic en cèl·lules germinals i espermatozoides amb la finalitat de descriure el posicionament i identificar els factors que regulen la territorialitat dels cromosomes en aquests tipus cel·lulars.

Es va utilitzar teixit testicular procedent d'individus de la soca C57BL/6J de *Mus musculus*. La metodologia desenvolupada va consistir en l'aplicació dels següents procediments: i) fixació cel·lular preservant la tridimensionalitat nuclear, ii) hibridació in situ fluorescent de tots els cromosomes de ratolí, iii) captura d'imatges amb microscòpia confocal, iii) identificació cel·lular mitjançant immunofluorescència, iv) anàlisi d'imatges utilitzant el programa Matlab, v) obtenció de dades numèriques i anàlisi estadística. Aquesta metodologia va permetre l'estudi del posicionament de tots els cromosomes del genoma de ratolí en cinc estadis cel·lulars que cobreixen la totalitat del procés espermatogènic: espermatogoni-preleptotè inicial, espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè, espermatòcits I a l'estadi de paquitè, espermàtides rodones i espermatozoides. Per cada estadi es van obtenir dades del volum de cada cromosoma, la posició dels cromosomes en relació a l'eix centre-perifèria nuclear i les freqüències d'encavalcament entre cromosomes.

Els resultats van posar de manifest que el posicionament radial i relatiu dels cromosomes durant l'espermatogènesi és dinàmic i no aleatori. Són nombroses les evidències observades que permeten concloure que els esdeveniments cromosòmics que condueixen a la recombinació

meiòtica determinen la dinàmica de posicionament dels cromosomes homòlegs des de l'etapa d'espermatogoni fins a l'etapa de paquitè. En aquest sentit s'ha observat que els cromosomes homòlegs comparteixen el mateix territori cromosòmic en etapes properes a l'inici de la meiosi. A més, l'estructura de *bouquet* condiona l'organització territorial del nucli a l'etapa de paquitè en funció de la mida cromosòmica, observant-se els cromosomes més petits preferentment a la part perifèrica del nucli. D'altra banda, l'anàlisi dels resultats indica que l'activitat gènica és un paràmetre que condiona el posicionament radial dels cromosomes durant tot el procés de l'espermatogènesi. La part interna del nucli presenta una concentració de material genètic superior al valor esperat. A més, els cromosomes amb més quantitat de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi o espermiogènesi (en el cas de les espermàtides rodones), mostren més volum cromosòmic a la zona mitja-interna del nucli. Finalment, hem observat que els cromosomes sexuals presenten un posicionament radial dinàmic durant l'espermatogènesi, directament relacionat amb els processos d'inactivació transcripcional que experimenten al llarg del procés. En relació al posicionament relatiu entre cromosomes, els resultats van mostrar que les interaccions entre cromosomes al nucli de les cèl·lules germinals i dels espermatozoides no són aleatòries suggerint implicacions funcionals rellevants. Tot i així, no s'han identificat els factors que determinen aquesta posició relativa a excepció de l'efecte de la mida en l'estadi de paquitè i en les espermàtides rodones. Finalment, també s'ha pogut concloure que el posicionament dels cromosomes respecte l'eix longitudinal del nucli dels espermatozoides no és aleatori suggerint la importància d'un posicionament longitudinal ordenat pels processos d'alliberament i activació del genoma patern després de la fecundació.

SUMMARY

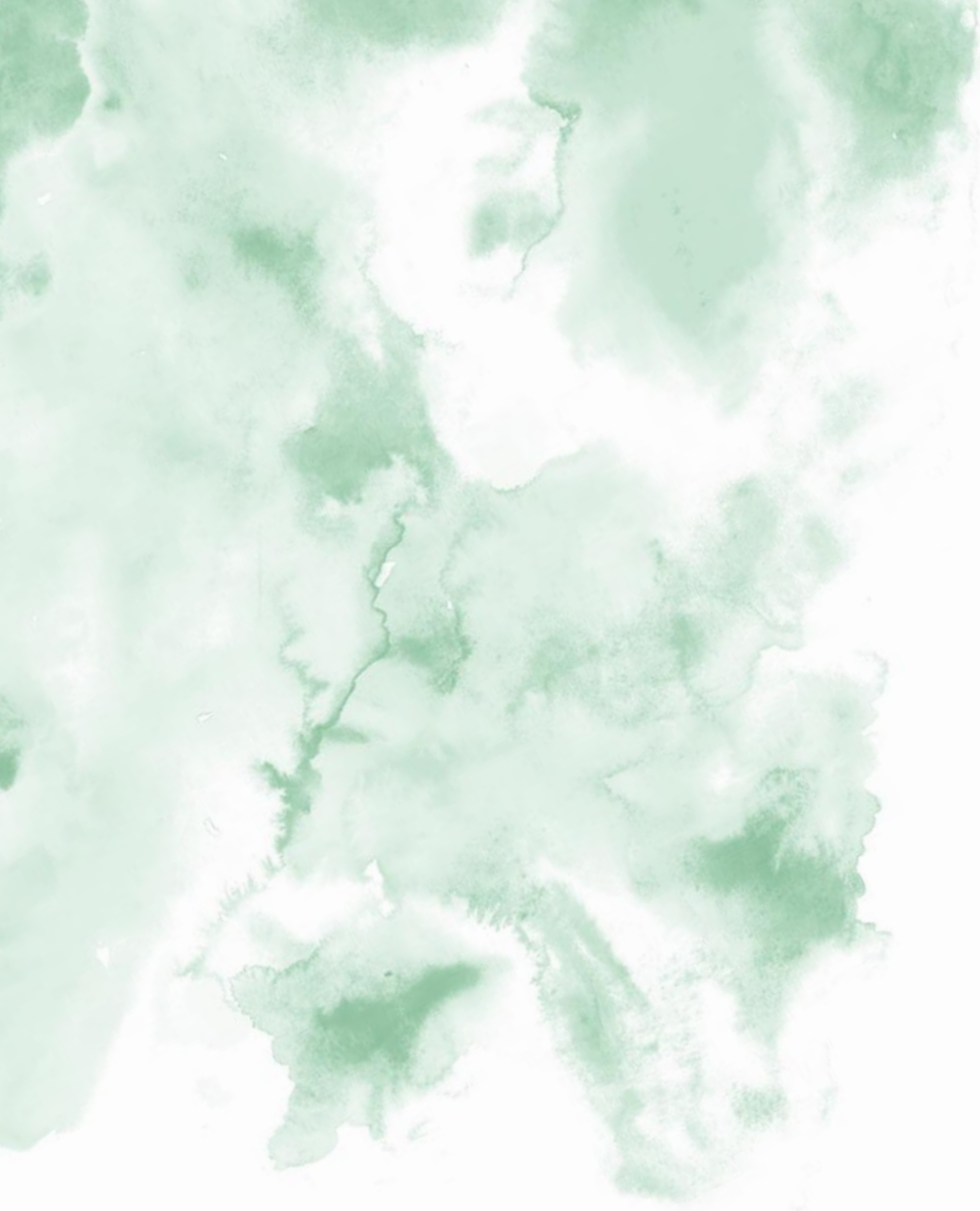
Chromosomes occupy specific regions of the nucleus called chromosome territories. In somatic cells, the positioning of the chromosomes is conditioned by gene density, transcriptional activity and the guanine-cytosine content. These associations demonstrate the existence of a functional relationship between chromosomal territoriality and gene expression. Little is known about chromosomal positioning during spermatogenesis. Some authors have suggested that the chromosomes distribution in spermatogenic cells could affect spermatogenesis development and have implications for embryo gene expression.

The objective of this doctoral thesis was to establish a three-dimensional model of chromosomal territoriality during the different stages of the *Mus musculus* spermatogenesis. To achieve this objective, we have developed a methodology for performing three-dimensional study of chromosomes positioning in germ cells and spermatozoa with the aim to describe the chromosome positioning, and to identify the factors that regulate the territoriality of the chromosomes in these cell types.

Testicular tissue from individuals of C57BL6J *Mus musculus* strain was used. The methodology developed consisted in the following procedures: i) optimized cell fixation to preserve the three-dimensionality of the nuclei, ii) fluorescence in situ hybridization of all mouse chromosomes, iii) three-dimensional image captures by confocal microscopy, iii) cell identification by immunofluorescence iv) image analysis using Matlab, v) numerical data extraction and statistical analysis. This methodology allowed the study of all chromosomes positioning of the mouse genome in five cellular stages, which cover the whole spermatogenic process: spermatogonia-early preleptotene, spermatocytes I at mid preleptotene-zygotene stages, spermatocytes I at pachytene stage, round spermatids and spermatozoa. For each stage, data of the nuclear volume occupied by each chromosome were obtained, the position of chromosomes according to the central-peripheral nuclear axis and the overlapping frequency between chromosomes.

Results showed that radial and relative positioning of chromosomes during spermatogenesis is dynamic and non-random. Several evidences were observed indicating that the chromosomal events that lead to meiotic recombination determine the dynamics of homologue chromosomes position from spermatogonia to pachytene stage. In this sense, it has been observed that

homologous chromosomes share the same chromosomal territory in stages near the beginning of meiosis. In addition, the bouquet distribution affects the territoriality organization of the nucleus at pachytene stage in accordance to chromosomal size, being the smallest chromosomes preferably observed in the nucleus periphery. On the other hand, several pieces of data suggest that gene activity is closely associated with the radial positioning of chromosomes throughout the spermatogenesis process. For instance, the nucleus interior presents a higher concentration of genetic material than the expected value. In addition, chromosomes with more number of genes involved spermatogenesis process or spermiogenesis (in the case of round spermatids), show more chromosomal volume in the middle-internal area of the nucleus. Finally, we have observed that sex chromosomes present a dynamic radial positioning during spermatogenesis, directly related to the transcriptional inactivation processes that they experience throughout the process. In relation to the relative positioning between chromosomes, the results showed that the interactions between chromosomes in the nucleus of germ cells and spermatozoa are not random, suggesting relevant functional implications. Even so, it has not been identified any factors that determine the relative position to the exception of the effect chromosome size at pachytene stage and round spermatids. Finally, it has also been concluded that the chromosome positioning in relation to the longitudinal axis of the sperm nucleus is not random, suggesting the importance of an ordered longitudinal positioning for the processes of release and activation of the paternal genome after fertilization.



1. INTRODUCCIÓ

TERRITORIS CROMOSÒMICS

Els cromosomes ocupen regions específiques del nucli anomenades territoris cromosòmics que esdevenen un dels pilars fonamentals de l'organització de la cromatina i de l'arquitectura nuclear i, a més a més, mostren importants implicacions funcionals en la regulació i el manteniment del genoma.

Origen del concepte

A les acaballes del segle XIX, Carl Rabl va observar que els cromosomes presentaven un patró d'organització concret en els nuclis de les cèl·lules mitòtiques de *Salamandra maculata* i *Proteus* (Rabl 1885): els centròmers i els telòmers es disposaven de manera polaritzada en l'espai. Després d'aquestes observacions, Rabl va suggerir que l'organització cromosòmica observada en les cèl·lules mitòtiques es mantindria fins a l'interfase. No obstant, qui va introduir el terme *territori cromosòmic* va ser Theodor Boveri en els seus estudis dels blastòmers de *Parascaris equorum* (Boveri 1909), amb els quals, tot i les evidents limitacions de les tècniques de l'època, va postular que cada cromosoma visible a la mitosi conserva la seva individualitat durant la interfase i ocupa un espai concret del nucli (Revisat per Cremer i Cremer 2006).

Durant el segle XX, alguns estudis realitzats mitjançant la microscòpia òptica evidenciaven l'existència dels territoris cromosòmics. Per exemple, Stack i col·laboradors (1977) van observar diferents dominis de cromosomes interfàsics realitzant extensions de cèl·lules d'arrel de ceba (*Allium Cepa*) i de *Cricetulus griseus* en diferents fases del cicle cel·lular. No obstant, l'anàlisi de la territorialitat cromosòmica mitjançant la microscòpia electrònica va revelar la presència, al nucli interfàsic, de fibres intercalades de cromatina d'entre 10 i 30 nm de diàmetre sense evidències de la presència de cromosomes individualitzats (DuPraw i Bahr 1969, Wischnitzer 1973). Com a conseqüència, el concepte *territoris cromosòmics* va caure temporalment en l'oblit. De fet, durant la dècada dels anys 70 i 80, la majoria dels investigadors creien que el nucli estava format per una xarxa de filaments de cromatina entrellaçats.

No va ser fins el 1982, quan el professor Cremer i els seus col·laboradors van demostrar l'existència de l'organització dels cromosomes en diferents territoris. Ho van fer de la següent manera: primerament, van induir dany a l'àcid desoxiribonucleic (DNA, de l'anglès *deoxyribonucleic acid*) de cèl·lules vives diploides a G1 mitjançant un feix molt estret de llum làser ultraviolada (UV). Posteriorment, van marcar la reparació del dany de DNA mitjançant 3H-

timidina i es van conduir les cèl·lules a la fase mitòtica on, degut a l'aspecte condensat que presenten els cromosomes, van poder identificar el nombre de cromosomes que havien sofert dany. Arribat a aquest punt, la seva hipòtesi consistia en que si el dany estava present en un gran nombre de cromosomes, seria l'evidència de que els cromosomes es disposen en forma de filaments de cromatina entrelaçats (**Figura 1.1 A**) i, si pel contrari, només alguns cromosomes per nucli havien sofert dany, voldria dir que els cromosomes ocupen territoris individuals concrets (**Figura 1.1 B**). Efectivament, tan sols pocs cromosomes per nucli van sofrir dany. Així doncs, d'aquesta manera es confirmava, tot i que indirectament, l'existència dels territoris cromosòmics.

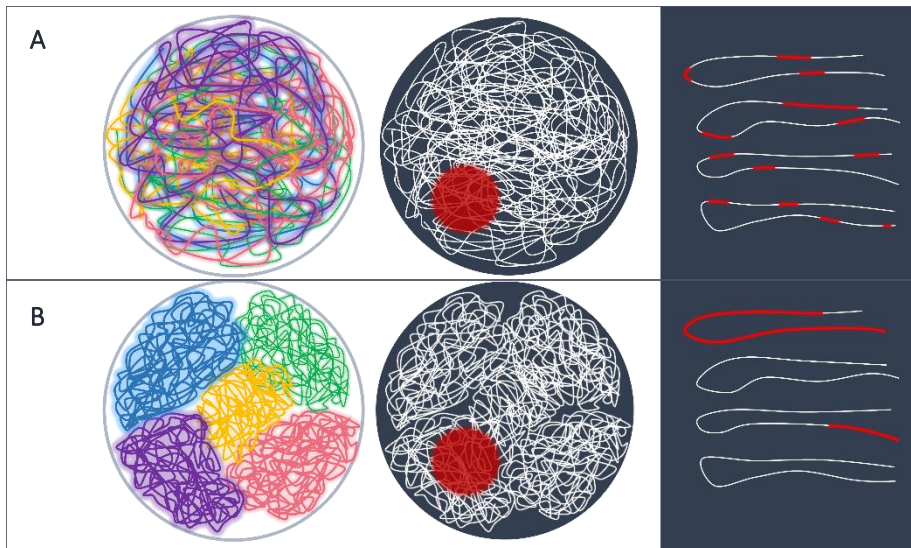


Figura 1.1 Il·lustració gràfica del raonament experimental de la primera evidència de l'organització territorial dels cromosomes en interfase (Cremer et al. 1982). Els cromosomes es representen en línies de colors. El punt vermell simbolitza el dany realitzat mitjançant llum làser UV. Figura adaptada de Cremer et al. 1982.

Més tard, l'arribada de les tècniques d'hibridació in situ fluorescent (FISH, fluorescence in situ hybridization) als anys 80 van permetre la visualització directa dels territoris cromosòmics. Els primers experiments que es van realitzar utilitzant aquesta tècnica, es van dur a terme en cèl·lules que només contenien entre un i tres cromosomes humans procedents de línies híbrides de ratolí o hámster (Manuelidis et al. 1985; Schardin et al. 1985). Després, amb la utilització de la citometria de flux, l'amplificació per PCR i les noves tècniques de supressió de seqüències

repetitives presents en diferents cromosomes es van generar una gran quantitat de sondes específiques de cromosomes (Lichter et al. 1988; A Bolzer et al. 1999).

De fet, encara avui en dia, la tècnica de FISH en combinació amb la microscòpia òptica confocal i la reconstrucció tridimensional de les imatges és la metodologia escollida per a l'estudi de l'organització espacial dels territoris cromosòmics (Cremer et al. 2012a). Aplicant aquesta tècnica, no només s'ha pogut determinar la territorialitat cromosòmica dels nuclis de diferents tipus cel·lulars sinó que també s'han trobat diferents factors que la condicionen.

FACTORS QUE CONDICIONEN LA TERRITORIALITAT CROMOSÒMICA

Per tal de determinar el patró de distribució espacial dels territoris cromosòmics a dins del nucli, primer cal establir un element de referència. Sovint, se n'utilitzen tres: el centre del nucli, el que anomenarem posicionament radial; els altres cromosomes, el que anomenarem posicionament relatiu i altres orgànuls o elements nuclears. Així doncs, utilitzant aquests elements, diversos estudis han evidenciat un posicionament no aleatori dels cromosomes en el nucli de les cèl·lules somàtiques que es veu influenciat per una sèrie de factors tal i com es detalla a continuació.

Pel que fa al posicionament radial, s'ha evidenciat l'existència d'una correlació entre el posicionament dels cromosomes al llarg de l'eix centre-perifèria del nucli amb algunes característiques intrínseques dels cromosomes. Per exemple, els cromosomes amb un alt contingut gènic es localitzen preferentment a la part interna del nucli, mentre que els que tenen una baixa densitat gènica es localitzen a la perifèria nuclear (Croft et al. 1999; Bridger et al. 2000; Boyle et al. 2001; Tanabe et al. 2002; Cremer et al. 2003) (**Figura 1.2 A**). Així mateix, en alguns estudis s'ha observat una localització preferent dels cromosomes amb una alta activitat gènica a la zona interna del nucli (Goetze et al. 2007, Cremer i Cremer 2010). Un exemple seria el cromosoma X inactivat en cèl·lules humanes 46,XX, ja que, estudis realitzats en fibroblasts evidencien que aquest mostra una localització més perifèrica respecte el seu homòleg actiu (Dyer et al. 1989). De manera similar, també s'ha observat una correlació de la disposició radial dels cromosomes amb el contingut de guanina-citosina (GC) i l'activitat transcripcional (Cremer i Cremer 2010; Federico et al. 2008). A més, també s'ha descrit un posicionament radial no aleatori condicionat per temps de replicació durant la fase S del cicle cel·lular; la cromatina amb una replicació primerenca es situa més internament que la cromatina amb una replicació tardana (Grasser et al. 2008). Tenint en compte totes aquestes evidències i veient la relació

funcional que tenen tots aquests paràmetres cromosòmics entre ells, diversos autors han suggerit que la distribució radial dels cromosomes podria està implicada en la regulació gènica; ja que el fet de concentrar la cromatina amb més dominis potencialment actius en un mateix espai afavoriria l'accessibilitat dels elements reguladors de la transcripció (Ioannou i Griffin 2011; Meaburn i Misteli 2007).

És important remarcar que aquesta distribució radial no tan sols succeeix en els cromosomes com a entitat individual sinó que també és vàlida per als gens; en general, els gens actius es localitzen més centràlicament que els gens inactius (Dietzel et al. 2004; Pickersgill et al. 2006; Fraser i Bickmore 2007; Finlan et al. 2008; Reddy et al. 2008; Takizawa et al. 2008; Fedorova i Zink 2009; Therizols et al. 2014). De fet, s'han observat moviments de gens específics des de la perifèria cap a l'interior del nucli a fi d'activar la seva expressió (Galiová et al. 2004; Volpi et al. 2000; Williams et al. 2002). Tot i això, cal tenir present que la transcripció es produeix també a la perifèria nuclear. Concretament, s'ha observat que els gens associats als complexos de porus nuclears, localitzats a la perifèria nuclear, tendeixen a presentar un estat transcripcional actiu (Kalverda et al. 2010, Capelson et al. 2010).

Un altre paràmetre que també s'ha relacionat amb la posició radial del cromosoma és la seva mida; els cromosomes petits es localitzen a la part interna del nucli, mentre que els grans es situen més perifèricament (Bolzer et al. 2005; Sun et al. 2000) (**Figura 1.2 B**). Per tal d'explicar la distribució radial dependent de la mida del cromosoma, Sun i col·laboradors (2000) van proposar dos models biofísics que actuen de manera complementària: el model mitòtic predeterminat i el model d'exclusió del volum. El model mitòtic predeterminat estableix que degut a que els cromosomes a l'estadi de metafase formen la placa metafàsica i es distribueixen en forma de roseta - amb els centròmers encarats cap a l'interior de la roseta (Bolzer et al. 2005) -els cromosomes petits es localitzen només a la part interna de la placa, mentre que els cromosomes grans s'estenen fins a l'exterior. Diversos autors donen suport a aquest model a través de l'observació experimental de la distribució dels cromosomes petits a la part central de la placa metafàsica (Wollenberg et al. 1982; Mosgöller et al. 1991; Leitch et al. 1994). A més a més, també s'ha suggerit que aquest posicionament relacionat amb la mida dels cromosomes es manté fins a la fase G1 del cicle cel·lular (Sun et al. 2000). D'altra banda, el model d'exclusió del volum proposa el següent: atès que els cromosomes tenen un volum finit i que, aquests es disposen en un nucli interfàsic amb un espai esfèric limitat per l'embolcall nuclear, tenen una capacitat limitada d'ocupar el domini d'un altre cromosoma. Per tant, aquesta limitació dels

chromosomes preservaria la distribució dependent de la mida observada en les cèl·lules mitòtiques.

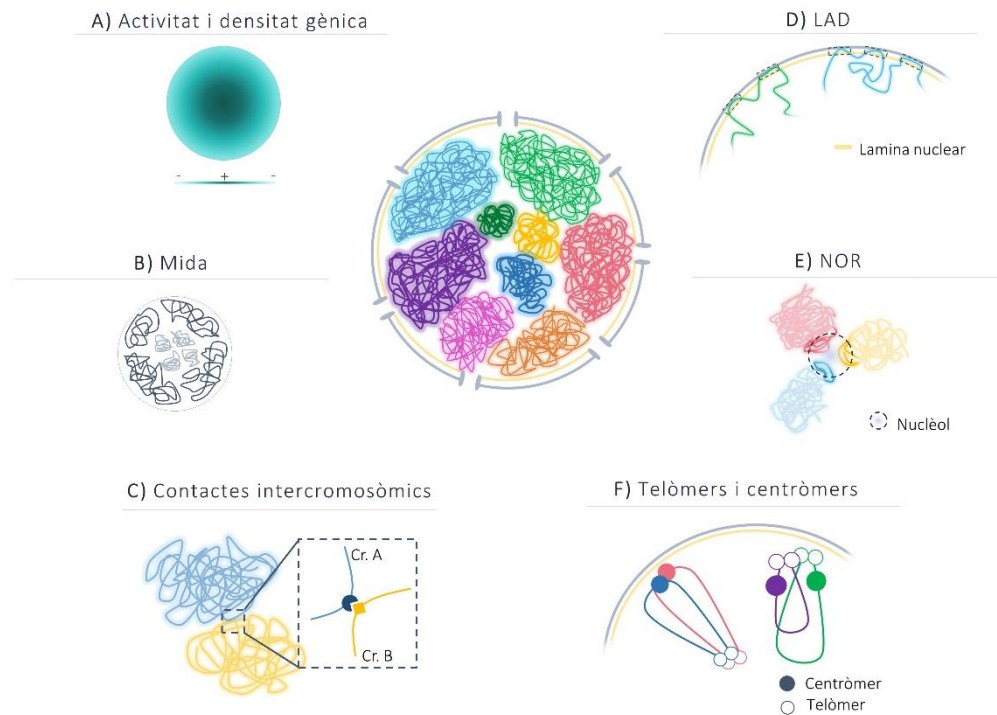


Figura 1.2 Factors que influeixen en la territorialitat cromosòmica. **(A)** Densitat i activitat gènica: els cromosomes amb una elevada densitat i activitat gènica tendeixen a posicionar-se a la zona interna del nucli i els que contenen una baixa densitat i activitat gènica tendeixen a posicionar-se a la perifèria. **(B)** Mida cromosòmica: els cromosomes petits es situen més internament que els cromosomes grans. **(C)** Contactes intercromosòmics: juxtaposició d'elements reguladors de l'expressió gènica que resideixen en diferents cromosomes (Cr. A: "cromosoma A" i Cr. B: "cromosoma B"). **(D)** Dominis associats a la làmina (LAD): regions del genoma que interactuen amb la làmina nuclear. **(E)** Regions organitzadores nucleolars (NOR): l'assemblatge de cromosomes que contenen les regions NOR és necessària per a la formació del nuclèol. **(F)** Telòmers i centròmers: aquests elements mostren una distribució específica dins del nucli.

Pel que fa al posicionament relatiu cromosòmic, alguns estudis han observat una proximitat preferent entre certs grups o parelles de cromosomes (Parada et al. 2002; Roix et al. 2003; Parada et al. 2004; Brianna Caddle et al. 2007; Khalil et al. 2007; Zeitz et al. 2009). També, s'ha observat que el posicionament relatiu dels cromosomes és específic de tipus cel·lular i similar entre cèl·lules que comparteixen el mateix procés de diferenciació (Parada et al. 2004). S'ha descrit que la implicació funcional d'un posicionament relatiu cromosòmic no aleatori podria basar-se en facilitar els contactes intercromosòmics (**Figura 1.2 C**) necessaris per una correcta

regulació de l'expressió gènica (revisat a Nguyen i Bosco 2015). Per exemple, en les cèl·lules T murines, la regió promotora de l'interferó gamma (IFN γ , de l'anglès *interferon gamma*), situada al cromosoma 10, interactua amb la regió control del locus de citocines dels limfòcits T efectors 2 (TH2-LCR, de l'anglès *T-helper cell 2 locus control region*) en el cromosoma 11 a fi de potenciar l'estimulació de l'IFN γ (Spilianakis et al. 2005). També, s'ha observat un posicionament relatiu no aleatori dels diferents cromosomes que contenen gens que codifiquen per a receptors olfactius (OR, de l'anglès *Olfactory receptors*). De fet, una alteració del posicionament relatiu d'aquests cromosomes resulta en una desregulació dels gens OR (Myllys et al. 2013).

Finalment, amb una visió més aplicada de la territorialitat cromosòmica, alguns autors han estudiat les relacions de proximitat entre els cromosomes i certs elements nuclears com per exemple la làmina nuclear. La làmina nuclear o nucleolema és una xarxa de filaments intermedis que revesteix la membrana nuclear interna i que proporciona estabilitat mecànica a l'embolcall nuclear, mantenint la seva integritat. A més a més, també se li atribueix una funció d'organització i regulació del genoma (Filesi et al. 2005; Goldman et al. 2005), concretament, exercint una funció repressora de l'activitat gènica. De fet, les regions del genoma que interactuen amb la làmina nuclear, els anomenats dominis associats a la làmina (LAD, de l'anglès *lamina-associated domains*) (Figura 1.2 D) solen presentar una baixa densitat de gens amb nivells d'expressió molt baixos. També, tenen poca presència de modificacions post-traduccionals d'histones relacionades amb activitat gènica i són rics en modificacions repressives com per exemple H3K9me2, H3K9me3 (Guelen et al. 2008; Wen et al. 2009; Towbin et al. 2010; Peric-Hupkes et al. 2010; Kind et al. 2015;) o H3K27me2 (Guelen et al. 2008). Aquestes dades suggereixen que la perifèria nuclear és una zona de caire transcripcionalment repressiva, coincidint amb les evidències que es tenen de la distribució radial dels cromosomes en relació a la densitat gènica i l'activitat transcripcional. Tan és així que en estudis en que es força una activació transcripcional d'un gen present en un LAD, s'observa la reubicació del gen cap a l'interior del nucli (Therizols et al. 2014). A més a més, per tal de reforçar la territorialitat cromosòmica no aleatòria i la seva implicació funcional, convé ressaltar que hi ha més de 1000 LAD distribuïts per tot el genoma dels mamífers, d'una mida del voltant de 0,5 Mb i sent aproximadament el 35% del genoma (Guelen et al. 2008). Es classifiquen en dos subtipus: els LAD constitutius (cLAD, de l'anglès *constitutive LAD*), comuns en diferents tipus cel·lulars i conservats entre ratolins i humans (Meuleman et al. 2013) i els LAD facultatius (fLAD, de l'anglès *facultative LAD*) que són específics de tipus cel·lulars (Peric-Hupkes et al. 2010, Meuleman et al. 2013, Harr et al. 2015).

Un altre element que condiciona el patró de distribució dels territoris cromosòmics és el nuclèol. El nuclèol és una estructura subnuclear on hi té lloc la transcripció i el processament de l'àcid ribonucleic ribosòmic (rRNA, de l'anglès *ribosomal ribonucleic acid*) (Hernandez-Verdun 2006, Boisvert et al. 2007, Sirri et al. 2008). Aquesta estructura no té membrana que la delimiti sinó que la seva formació rau en un agregat de macromolècules que s'organitzen en torn als gens que codifiquen per als rRNA continguts en les anomenades regions organitzadores nucleolars (NOR, de l'anglès *nucleolus organizers regions*). Aquestes regions consisteixen en petits segments de rDNA repetits en tàndem i estan localitzades en diferents cromosomes. Així doncs, l'assemblatge de les regions nucleolars requereix una distribució específica dels cromosomes, evidenciant així, la seva rellevància en l'organització territorial del nucli (**Figura 1.2 E**). A més a més, cal tenir en compte que la formació i dissociació dels nuclèols és constant al llarg del cicle cel·lular, mostrant variació en el número i la mida dels nuclèols per nucli, la qual cosa podria condicionar el posicionament cromosòmic relatiu.

D'altra banda, els telòmers i els centròmers també són estructures implicades en la territorialitat i organització cromosòmica ja que aquests mostren una disposició específica dins del nucli que varia en funció de l'espècie, l'estadi i el tipus cel·lular estudiat (Bartholdi 1991; Ferguson i Ward 1992; Vourc'h et al. 1993; Chaly i Munro 1996; Guttenbach et al. 1996; Tagawa et al. 1997; Crabbe et al. 2012) (**Figura 1.2 F**). Per exemple, Weierich i col·laboradors (2003), utilitzant la tècnica de FISH en combinació amb la microscòpia confocal, van estudiar el posicionament dels centròmers i dels telòmers en limfòcits humans i de ratolí a l'estadi de G₀. En aquest estudi es va posar de manifest que generalment, els centròmers mostren un posicionament perifèric en totes dues espècies i, els telòmers en canvi, generalment presenten un posicionament intern en humans i un posicionament perifèric en ratolins. De manera similar, altres autors han evidenciat un posicionament específic dels telòmers durant el cicle cel·lular dels limfòcits de ratolí que consisteix en una distribució dispersa durant la fase de G₀/G₁ i, en canvi, una distribució en forma de disc intern durant la fase G₂ (Chuang et al. 2004, Vermolen et al. 2005). També, Crabbe i col·laboradors (2012) van observar la dinàmica de posicionament dels telòmers en línies cel·lulars de fibroblasts humans i van revelar la presència d'una distribució dispersa dels telòmers durant la interfase i un canvi de posicionament cap a la perifèria nuclear just després de completar la divisió mitòtica.

Un altre exemple molt clar de la distribució no aleatòria dels telòmers es produeix en els estadis primerencs del procés de la meiosi de moltes espècies. En aquest estadi els telòmers estan ancorats a l'embolcall nuclear (Scherthan 2001) assolint així, una distribució polaritzada

anomenada configuració en *bouquet* que facilita l'aparellament dels cromosomes homòlegs (Hiraoka i Dernburg 2009; Shibuya i Watanabe 2014; Zickler i Kleckner 2015).

ASPECTES FUNCIONALS DE LA TERRITORIALITAT CROMOSÒMICA

Com ja s'ha mencionat anteriorment, diversos autors suggereixen que un posicionament relatiu cromosòmic no aleatori afavoreix les interaccions específiques entre regions genòmiques distants a fi de regular l'expressió gènica (Cavalli 2007; Hübner et al. 2013). Per tal de comprendre aquest raonament, cal conèixer amb més detall l'organització de la cromatina dins del territori cromosòmic.

L'expressió gènica requereix la interacció física entre promotors gènics i els seus elements reguladors, com per exemple potenciadors genètics o bé repressors. Sovint, aquests elements reguladors estan separats per kilobases (Kb) o megabases (Mb) de DNA, que poden incloure altres gens i seqüències reguladores (Cullen i Seyfred 1993; Kleinjan i Heyningen 2005; Blackwood i Kadonaga 1998; Chepelev et al. 2012). Gràcies a les tècniques de microscòpia i captura de la conformació dels cromosomes (3C) es coneix que la separació lineal de promotors i reguladors al llarg dels cromosomes presenta una restricció espacial que, majoritàriament, es resol mitjançant la formació de bucles de DNA (Griffith et al. 1986; Rao et al. 2014) (**Figura 1.3 requadre vermell**). Els bucles faciliten que el DNA es plegui sobre si mateix per tal de que els diferents elements distals quedin propers i puguin interaccionar, permetent així una correcta regulació gènica. Els bucles de DNA s'organitzen encara més, agrupant-se en unitats funcionals anomenades dominis topològicament associats (TAD, de l'anglès *topologically associated domains*). Els TAD estan separats per proteïnes arquitectòniques (AP) (**Figura 1.3 requadre groc**). La cromatina de dins d'un TAD interactua preferentment amb la cromatina de dins del mateix TAD (**Figura 1.3 requadre groc**) i presenta una activitat transcripcional coordinada (Roy et al. 2018). En alguns casos, l'expressió gènica requereix la juxtaposició d'elements reguladors que resideixen en diferents cromosomes (Branco i Pombo 2006; Nguyen i Bosco 2015) (**Figura 1.3 requadre verd**), formant els anomenats contactes intercromosòmics. És en aquestes situacions, on el posicionament relatiu cromosòmic presenta un paper fonamental en la correcta regulació de l'expressió gènica.

Per tal de reforçar el paper dels TAD com a element funcional, cal remarcar que l'alteració del patró d'organització dels TAD provoca una desregulació de l'activitat gènica convergint a un estat patològic (revisat per Roy et al. 2018). De fet, s'ha descrit que l'organització dels TAD és similar entre diferents tipus cel·lulars i conservat entre espècies (Dixon et al. 2012; Jin et al. 2013; Rao et al. 2014; Rudan et al. 2015), confirmant així, el seu paper també en la modulació de la territorialitat nuclear.

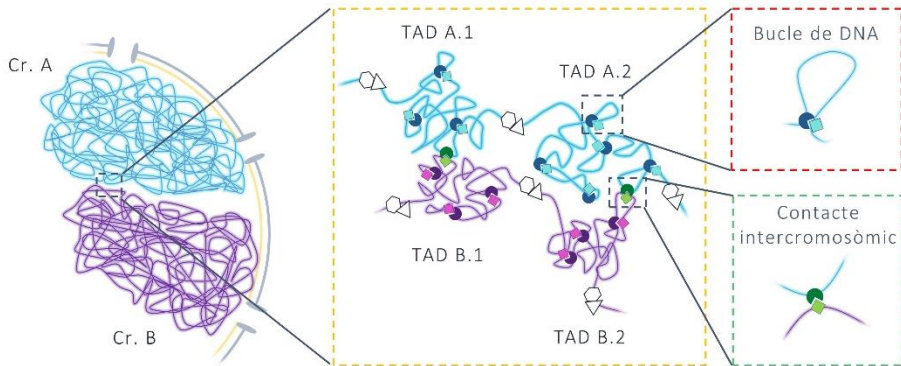


Figura 1.3 Organització de la cromatina de dos cromosomes (Cr. A: “cromosoma A” i Cr. B: “cromosoma B”) en un nucli eucariota en interfase. **(Requadre vermell)** Bucle de DNA: volta de DNA necessària per a la juxtaposició d'elements reguladors ◼ i promotors gènics ◻. **(Requadre groc)** Dominis topològicament associats (TAD): organització d'agrupacions de bucles de DNA separats per proteïnes arquitectòniques (AP) ◻. **(Requadre verd)** Contacte intercromosòmic: juxtaposició d'elements reguladors de l'expressió gènica que resideixen en diferents cromosomes.

L'organització de la cromatina en diferents TAD també permet l'existència d'una distribució radial preferent dels gens a dins del seu territori cromosòmic directament relacionada amb el seu estat d'activació; els gens transcripcionalment actius tendeixen a ubicar-se a la perifèria del seu territori cromosòmic (Figura 1.4) (Volpi et al. 2000; Williams et al. 2002a; Galiová et al. 2004), probablement, amb la finalitat de facilitar l'accessibilitat de la maquinària transcripcional (Verschure et al. 1999, Bornfleth et al. 1999). De fet, s'ha observat que l'activació transcripcional d'alguns gens provoca la seva reposició cap a la perifèria del seu territori cromosòmic (Volpi et al. 2000; Williams et al. 2002; Ragoczy et al. 2003; Galiová et al. 2004), i també, que els moviments de reposició de gens disminueixen quan la transcripció està inhibida (Mahy et al. 2002).

Una altra conseqüència dels paràmetres que regeixen l'organització nuclear en diferents territoris cromosòmics és la compartimentació del nucli en diferents zones funcionals. S'ha postulat, que el nucli és una àrea altament compartimentada en què el posicionament dels territoris cromosòmics i, per extensió el posicionament dels gens, en compartiments específics pot tenir efectes diferents en relació a la seva expressió (Nguyen i Bosco 2015).

En general, les regions amb cromatina transcripcionalment activa s'ubicarien al centre del nucli a fi de situar-se més a prop dels factors de transcripció (TF, de l'anglès *transcription factors*), ARN polimerases i altres elements reguladors transcripcionals (Iborra et al. 1996). Per contra, la cromatina transcripcionalment inactiva es localitzaria a la perifèria del nucli, propera als filaments intermedis, les proteïnes residents, la membrana nuclear i la làmina interna. No obstant, cal tenir en compte que, com ja s'ha mencionat anteriorment, els gens associats als complexos de porus nuclears, localitzats a la perifèria nuclear, tendeixen a estar transcripcionalment actius (Kalverda et al. 2010, Capelson et al. 2010) (**Figura 1.4**).

Un altre compartiment funcional que cal destacar són les anomenades fàbriques de transcripció (TN, de l'anglès *Transcription neighborhoods*) les quals estan formades pels elements reguladors de la transcripció. Les TN majoritàriament es localitzen entremig de diferents territoris cromosòmics, els anomenats dominis intercromosòmics (ICD, de l'anglès *interchromosomal domains*). Es creu que els ICD proporcionen l'entorn òptim per a la transcripció, facilitant l'espai necessari per a la col·locació dels gens entrelaçats amb els seus elements reguladors juntament amb la maquinària transcripcional, al mateix temps que disminueixen les possibilitats d'interaccions ectòpiques amb altres molècules de DNA (Iborra et al. 1996). Aquesta idea és coherent amb la presència d'elements reguladors de la transcripció als ICD (Branco i Pombo 2006; Bridger et al. 2005; Verschure et al. 2002; Zirbel et al. 1993) i amb el fet que els gens actius es reposicionin a la perifèria dels territoris cromosòmics.

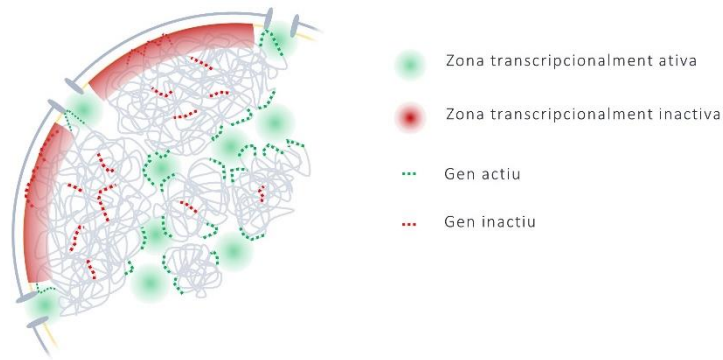


Figura 1.4 Compartimentació del nucli en dues zones: zona transcripcionalment activa i zona transcripcionalment inactiva.

En definitiva, el posicionament cromosòmic no aleatori dins del nucli permet un control espacial-temporal de la transcripció i la regulació gènica que és indispensable per a la funcionalitat de la cèl·lula. De fet, s'han observat alteracions en el patró de posicionament dels cromosomes en nombroses malalties. Cremer i col·laboradors (2003) descriuen diferents patrons de posicionament dels cromosomes 18 i 19 entre línies cel·lulars normals i tumorals. Meaburn i col·laboradors (2007) descriuen canvis en els territoris dels cromosomes 13 i 18 en pacients amb mutacions del gen lamina A/C (LMNA). També, s'ha observat una alteració del patró d'interaccions entre territoris cromosòmics en cèl·lules mamàries tumorals (Fritz et al. 2014) i una alteració del patró de posicionament d'alguns cromosomes en cèl·lules amb una trisomia del cromosoma 21 (Kemeny et al. 2018).

TERRITORIS CROMOSÒMICS EN L'ESPERMATOGÈNESI

Com ja s'ha mencionat anteriorment, el patró de distribució dels cromosomes és específic de tipus cel·lular, sent similar entre teixits cel·lulars que comparteixen vies de desenvolupament comunes i conservat entre espècies (Tanabe et al. 2002). N'és un exemple clar l'estudi de Parada i col·laboradors (2004), en el qual descriuen la distribució específica dels cromosomes en cèl·lules obtingudes de diferents teixits de ratolí. Aquest fet no és sorprenent tenint en compte les implicacions funcionals de la territorialitat cromosòmica.

En el cas concret del teixit testicular, es tenen poques dades de la distribució nuclear dels territoris cromosòmics en les cèl·lules germinals masculines. Aquest fet, probablement, és degut

a que les característiques intrínseques del procés espermatogènic dificulten l'estudi de la territorialitat cromosòmica en aquest teixit. En primer lloc, el procés espermatogènic és un procés cromosòmicament dinàmic que presenta diferents estadis cel·lulars amb varietat de ploïdia (**Figura 1.5**). En segon lloc, el teixit testicular no tan sols consta de les cèl·lules germinals sinó que també presenta cèl·lules somàtiques com per exemple les cèl·lules de Leydig – cèl·lules productores d'esteroides necessaris per al desenvolupament del procés d'espermatogènesi – i les cèl·lules de Sertoli – necessàries pel manteniment i el suport metabòlic i estructural de les cèl·lules espermatogèniques – . Malgrat aquestes limitacions, les escasses dades publicades proporcionen evidències suficients per donar suport a l'existència d'una territorialitat cromosòmica no aleatòria en les cèl·lules germinals masculines.

Fase proliferativa

Durant la fase proliferativa la població cel·lular d'espermatogonis es renova mitjançant divisions mitòtiques al mateix temps que algunes cèl·lules avancen en el procés de diferenciació cap a cèl·lules germinals amb capacitat d'iniciar la meiosi. Els espermatogonis de tipus A foscos realitzen divisions mitòtiques per tal de mantenir una reserva de cèl·lules mare. Algunes d'aquestes divisions cel·lulars originaran els espermatogonis A pàl·lids, els quals també experimentaran divisions mitòtiques d'autorenovació i, alguns d'ells, seran activats per donar lloc als espermatogonis de tipus B. Els espermatogonis de tipus B es divideixen mitòticament per formar espermatòcits primaris, que corresponen a les cèl·lules que inicien la meiosi (Amann 2008, Neto et al. 2016, Griswold 2016).

Les dades experimentals sobre l'organització de la territorialitat cromosòmica en aquesta fase són escasses. Utilitzant sondes centromèriques i telomèriques, s'ha observat que els telòmers i els centròmers es troben dispersos en els nuclis dels espermatogonis de ratolí i humà (**Figura 1.5 A i B**). De fet, el patró de distribució de telòmers que s'observa en aquest estadi és similar al que s'ha descrit durant les fases G0 / G1 i S de les cèl·lules somàtiques (Ludérus et al. 1996; Ramírez i Surrallés 2009). També disposem de poques evidències del posicionament radial i relatiu dels cromosomes en aquest estadi; Garagna i col·laboradors (2001) descriuen un posicionament dels cromosomes 5, 11, 15 i 17 més perifèric que els cromosomes 13 i 16 i un posicionament distal i perifèric dels cromosomes X i Y en el nucli dels espermatogonis de ratolí.

Fase meiòtica

La meiosi consisteix en un procés de divisió cel·lular que genera cèl·lules haploides a partir de cèl·lules diploides. Consta de dues divisions cel·lulars consecutives que s'inicien en cèl·lules que han passat per una fase de replicació del DNA. Durant l'espermatogènesi, les cèl·lules que inicien la meiosi s'anomenen espermatòcits primaris, ($2n$, 4 cromàtides). La primera divisió meiòtica és reduccional i origina dos espermatòcits secundaris (n , 2 cromàtides) a partir d'un espermatòcit primari. La segona divisió meiòtica és equacional i genera dues espermatides (n , 1 cromàtide) a partir d'un espermatòcit secundari.

La fase més llarga de la meiosi és la primera etapa de la meiosi I i s'anomena profase I. Aquesta es subdivideix en les següents etapes: leptotè, zigotè, paquitè, diplotè i diacinesi. La territorialitat cromosòmica en els estadis primerencs de la profase I de *Mus musculus* es regeix, principalment, pels esdeveniments cromosòmics que tenen lloc en aquesta fase (Berrios 2017). Durant la transició de leptotè a zigotè, s'inicia l'aparellament dels cromosomes homòlegs i la formació del complex sinaptnemal (SC, de l'anglès *synaptonemal complex*) (Zickler i Kleckner 1998; Harper et al. 2004; Zickler i Kleckner 2015), mantenint els cromosomes homòlegs en un mateix domini nuclear amb la finalitat de dur a terme la recombinació meiòtica. D'altra banda i de manera simultània, els telòmers s'agrupen i s'ancoren a l'embolcall nuclear formant una organització polaritzada anomenada *bouquet* (Zickler i Kleckner 1998, 2015; Harper et al. 2004) ja que recorda un *ram* de flors (**Figura 1.5 C**). En aquest context, és coherent esperar que els cromosomes petits es localitzin a la perifèria nuclear, ja que aquests cromosomes no arriben a envair la regió central del nucli (Berrios 2017). A més a més, durant aquesta configuració específica dels cromosomes als espermatòcits I de ratolí, la proximitat física dels telòmers i l'heterocromatina pericentromèrica pot donar lloc a la formació transitòria d'un gran cromocentre¹ d'heterocromatina situat a la perifèria nuclear (Berrios 2017b).

Aquesta distribució específica dels cromosomes en forma de *bouquet* també s'ha observat en els estadis primerencs de la profase I d'altres espècies, inclosos els humans (**Figura 1.5 D**) (revisat per Scherthan 2001) evidenciant un paper rellevant en l'espermatogènesi. Tot i que es desconeix la seva funció, s'ha proposat que podria facilitar l'alineament i l'aparellament/sinapsi dels cromosomes homòlegs (Meyer-Ficca et al. 1998; Page i Hawley 2004; Scherthan 2009; Hiraoka i Dernburg 2009; Shibuya i Watanabe 2014; Zickler i Kleckner 2016).

¹ Estructura subnuclear irregular formada per heterocromatina

Pel que fa a l'estadi de paquitè, estudis realitzats en el model murí han posat de manifest el manteniment de l'organització en *bouquet* dels cromosomes tot i que es produeix una desagregació del gran bloc d'heterocromatina permetent així, l'observació de petits cromocentres situats a la perifèria nuclear (Berrios et al. 2010; Berrios 2017) (**Figura 1.5 E**). D'altra banda, estudis realitzats a l'estadi de paquitè en espermatòcits humans han permès observar un posicionament relatiu no aleatori dels cromosomes. S'ha observat una proximitat preferent entre els bivalents 15 i XY (Metzler-Guillemain et al. 1999, Codina-Pascual et al. 2006) (**Figura 1.5 F**). Tenint en compte que en aquests estadis els esdeveniments meiòtics dicten l'aparellament dels cromosomes mitjançant les seves regions homòlogues, és raonable atribuir les associacions de cromosomes no homòlegs – els anomenats aparellaments heteròlegs - a la presència de seqüències de DNA similars. De fet, l'associació preferent entre els bivalents 15 i XY podria ser explicada per la presència d'una seqüència homòloga entre regions heterocromàtiques del cromosoma Y i un domini d'heterocromatina no centromèrica del cromosoma 15 (Burk et al. 1985). A més, una possible conseqüència d'aquest aparellament heteròleg podria ser el fet que el 52% de les translocacions entre un autosoma i el cromosoma Y es produeixen entre la heterocromatina del braç q del cromosoma Y i el braç curt del cromosoma 15 (Smith et al. 1979). De fet, s'ha suggerit que les translocacions recíproques resulten de mecanismes de reparació de trencaments de doble cadena d'ADN entre dos cromosomes diferents que es localitzen propers en el nucli (Roix et al. 2003; Soutoglou i Misteli 2008) .

De manera similar, l'anàlisi de les relacions de posicionament entre tots els bivalents a l'estadi de metafase I d'espermatòcits humans ha evidenciat una distribució relativa no aleatòria dels cromosomes. Concretament, s'han observat agrupacions preferents de cromosomes d'acord amb la mida, la densitat gènica i la morfologia acrocèntrica dels cromosomes (Vergés et al. 2014). També, s'ha descrit una proximitat preferent entre els bivalents 15 i 22 amb el bivalent XY (Sarrate et al. 2012) (**Figura 1.5 G**). Així doncs, aquestes dades evidencien una organització territorial no aleatòria dels cromosomes a la placa metafàsica que està d'acord amb els paràmetres que determinen la seva posició als nuclis somàtics en interfase, detallats anteriorment (Bridger et al. 2000; Sun et al. 2000; Boyle et al. 2001; Lukášová et al. 2002; Tanabe et al. 2002; Cremer et al. 2003; Bolzer et al. 2005) i que també és pot veure condicionat pels aparellaments heteròlegs que es produeixen en fase prèvies de la meiosi.

Fase de diferenciació

La fase de diferenciació o espermiogènesi és un procés complex de morfogènesi cel·lular que consisteix en la diferenciació de les espermatides rodones en espermatides allargades i, finalment, en espermatozoides. Durant aquest procés es produeixen els següents canvis citoplasmàtics i nuclears: un reposicionament de receptors i canals iònics de membrana, l'elongació de la morfologia nuclear, la reducció de citoplasma, la formació del flagel i l'acrosoma i la reorganització de la cromatina. Concretament, la reorganització de la cromatina es produeix substituint aproximadament el 85% de les histones per altres proteïnes nuclears anomenades protamines (Meistrich et al. 1978, 2003, Govin et al. 2004, Balhorn 2007). El DNA conjuntament amb les protamines forma unes estructures toroidals, en les que els ponts disulfur entre protamines estableixen l'estructura (Ward, 2010). Diversos autors han posat de manifest una correlació temporal entre el procés de substitució d'histones per protamines amb la condensació del genoma de les espermatides allargades i la restricció de l'activitat transcripcional (Kierszenbaum et al. 1975). D'aquesta manera, la compactació del DNA espermàtic resultarà en la inactivació de la majoria dels gens preparant-se, així, per a la reprogramació del genoma masculí i la iniciació del desenvolupament embrionari (Balhorn 2007).

Pel que fa a l'organització cromosòmica en el nucli de les espermatides rodones, alguns autors han observat en model murí l'agrupació dels centròmers a la regió central del nucli formant un gran cromocentre (**Figura 1.5 H**) (Namekawa et al. 2006, Maezawa et al. 2017). La formació del cromocentre també és un tret distintiu de les espermatides rodones humanes (**Figura 1.5 I**) (Zalensky et al. 1993, 1995a). No obstant, es desconeix el posicionament radial i relatiu dels cromosomes en aquest estadi.

Finalment, l'organització cromosòmica en el nucli dels espermatozoides humans ha estat àmpliament estudiada durant les darreres dècades. Estudis realitzats a principis dels anys 90 per Zalensky i col·laboradors van observar que els cromosomes mostren una distribució específica en el nucli dels gàmetes masculins humans; els centròmers s'agrupen per formar un únic cromocentre a l'interior nuclear i els telòmers s'estenen cap a la perifèria nuclear. Aquest patró d'organització del cromosoma es va anomenar model *hairpin-loop* (Zalensky et al. 1995). Aquell mateix any, estudis realitzats en el model murí també evidenciaven un patró específic dels cromosomes en el nucli dels espermatozoides de ratolí similar al descrit en humans; els centròmers s'agrupen per formar un únic cromocentre a l'interior nuclear, els telòmers

proximals es localitzen a la perifèria del cromocentre i els telòmers distals a la perifèria nuclear (Haaf i Ward 1995). Observacions més recents, han corroborat aquest model en ratolins, humans i altres mamífers com per exemple en bous, porc, cavall i rata (Meyer-Ficca et al. 1998; Zalenskaya i Zalensky 2004; Zalensky i Zalenskaya 2007).

No obstant, tot i l'acceptació del model de *hairpin-loop*, darrerament se n'han introduït algunes correccions. S'ha descrit la possible presència de més d'un cromocentre en el nucli dels espermatozoides i que aquests mostren un posicionament radial no determinat. A més, també s'ha concretat que els telòmers s'agrupen mitjançant la formació de dímers i tetràmers mostrant, també, un posicionament radial no determinat (Zalensky et al. 1995a, Hazzouri et al. 2000, Moskovtsev et al. 2010, Ioannou et al. 2017) (**Figura 1.5 J i K**).

D'altra banda, estudis de FISH realitzats en diferents espècies han mostrat que existeix un posicionament radial, longitudinal i relatiu no aleatori dels cromosomes en el nucli dels espermatozoides (revisat a la **Taula 1.1**). No obstant, la variabilitat existent entre estudis, ja sigui pel que fa al número d'espermatozoides analitzats, els cromosomes estudiats, així com els criteris utilitzats per determinar el seu posicionament, el tipus de sonda de DNA (centromèrica, telomèrica, de locus o braç específic o de pintat cromosòmic), les dimensions espacials utilitzades per realitzar l'estudi, o bé el tipus d'anàlisi estadística realitzada, no permeten posar en comú els resultats obtinguts ni establir relacions entre ells. Tanmateix, tot i la manca de concordança entre les metodologies aplicades, els resultats evidencien un posicionament radial cromosòmic del nucli de l'espermatozoide humà relacionat amb la densitat gènica (Manvelyan et al. 2008, Mudrak et al. 2012); els cromosomes amb una elevada densitat gènica es situen a la part interna del nucli i, en canvi, els cromosomes amb una baixa densitat gènica es localitzen a la perifèria nuclear.

Així doncs, el posicionament cromosòmic en el nucli dels espermatozoides de mamífers no és aleatori i, a més a més, és conservat entre diferents espècies (Greaves et al. 2003), suggerint així, una rellevància funcional (Foster et al. 2005). De fet, es creu que té un paper clau en la sortida ordenada i seqüencial dels cromosomes al citoplasma de l'oòcit després de la fecundació (Zalensky i Zalenskaya 2007) i en facilitar un mecanisme controlat per el desempaquetament, la remodelació i la transmissió de la informació epigenètica paterna (Wu i Chu 2008). Tot i això, aquestes són hipòtesis molt primerenques que requereixen estudis addicionals per a la seva confirmació.

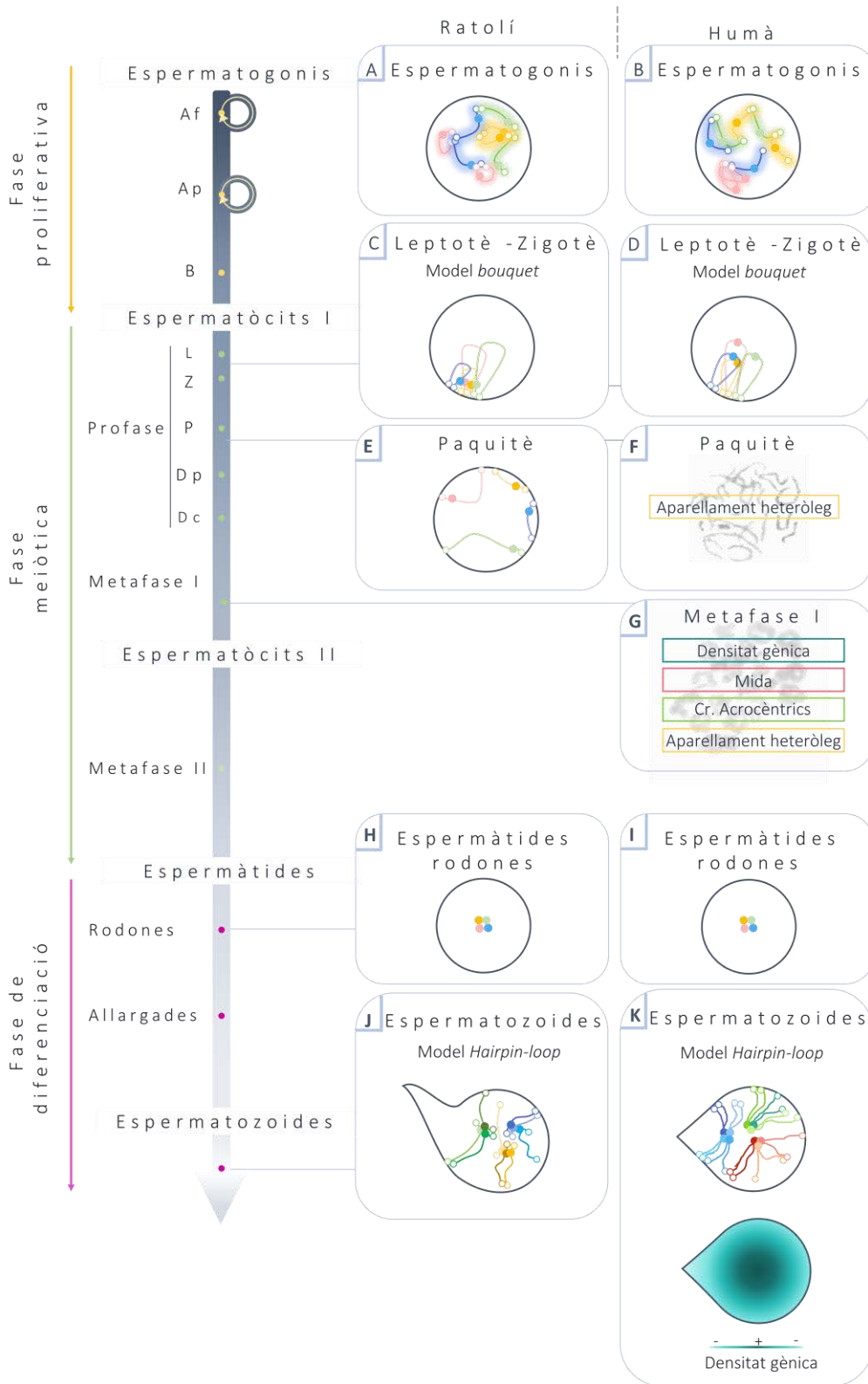


Figura 1.5 Representació esquemàtica del procés de la meiosi i de les dades descrites de l'organització cromosòmica en les cèl·lules germinals masculines de ratolí i humà.

Taula 1.1 Estudis de la distribució cromosòmica en el nucli dels espermatozoides de diferents espècies realitzats mitjançant FISH. **Cr:** cromosomes analitzats; **Sondes:** tipus de marcatge utilitzat; **D:** dimensions de l'anàlisi; **PL:** posicionament longitudinal no aleatori; **PRA:** posicionament radial no aleatori; **PRE:** posicionament relatiu no aleatori; **FCT:** factors que els autors conclouen com a condicionants de la territorialitat cromosòmica. N.a: no avaluat.

Bibliografia	Espècie	Cr.	Sondes	D	PL	Pra	Pre	FCT
Ioannou et al. 2017	Humà	1, 5, 19	Pantelomèriques	3D	Sí	Sí	Sí	NOR
			Pancentromèriques					Telòmers Centròmers
Millan et al. 2012	Humà	18, 19, 21, 22, X, Y	Pintat cromosòmic	2D	Sí	Sí	N.a	N.a
Mudrak et al. 2012	Humà	1, 3, 4, 6, 17, 18, 19, X, Y	Pintat cromosòmic	2D	Sí	Sí	N.a	Densitat gènica
			Pancentromèriques					
			Pericentromèriques					
Ioannou et al. 2011	Humà	1-4, 6-12, 15-18, 20, X, Y	Locus pericentromèric	3D extrapolat de 2D	N.a	Sí	N.a	N.a
Manvelyan et al. 2008	Humà	Tots	Bandes multicolor	3D	Sí	Sí	N.a	Densitat gènica Mida
Finch et al. 2008	Humà	18, X, Y	Centromèriques	3D extrapolat de 2D	N.a	Sí	N.a	N.a
Foster et al. 2005	Porc	Tots excepte el cr. 12	Pintat cromosòmic	2D	Sí	Sí	N.a	-
Mudrak et al. 2005	Humà	1, 2, 5	Braç-específic	2D	Sí	N.a	N.a	N.a
Solov'eva et al. 2004	Humà	1, 2, 3, 4, 7,	Subtelomèriques	2D	N.a	N.a	N.a	Telòmers
		18, 20, 6	Microdissected					
Zalenskaya i Zalensky 2004	Humà	1, 2, 6, 7, 16, 17, X, Y	Centromèriques	2D	Sí	Sí	Sí	Centròmers
		1, 6, X	Pintat cromosòmic					
Greaves et al. 2003	Marsupials	Tots excepte el cr.6	Pintat cromosòmic	2D	sí	N.a	N.a	N.a
	Monotremes	17-21,X		2D	sí			
	Gallina	2, 8, 9, Z		2D	No			
Garagna et al. 2001	Ratolí	5, 11, 13, 15, 16 i 17	Pintat cromosòmic	2D	N.a	Sí	N.a	N.a
Greaves et al. 2001	Marsupials	1, 2, 3, 4, 5, 6, X, Y	Pintat cromosòmic	2D	Sí	N.a	N.a	N.a

Continuació de la Taula 1.1 a la pàgina següent.

Continuació Taula 1.1.

Bibliografia	Espècie	Cr.	Sondes	D	PL	PRa	Pre	FCT
Tilgen et al. 2001	Humà	1-Y, 9-Y, 16-Y,	Pericentromèriques	2D	N.a	N.a	Sí	N.a
		1-X, 9-X, 16-X	Locus específic					
Hazzouri et al. 2000	Humà	13, X	Pintat cromosòmic	3D	Sí	N.a	N.a	Centròmers Telòmers
Luetjens et al. 1999	Humà	18, X	Pintat Cromosòmic	3D	Sí	N.a	N.a	-
Meyer-Ficca et al. 1998	Rata	2, 12	Pintat cromosòmic	2D	Sí	N.a	N.a	Telòmers Centròmers
Zalensky et al. 1995	Humà	Tots	Telomèriques	3D	N.a	N.a	N.a	Centròmers Telòmers
			Subtelomèriques					
			Centromèriques					
			Pintat cromosòmic (cr. 2)					

ALTERACIONS DEL PATRÓ DE DISTRIBUCIÓ DELS TERRITORIS CROMOSÒMICS EN L'ESPERMATOGENESI I LA SEVA RELACIÓ AMB LA INFERTILITAT

Tenint en compte els estudis que evidencien una territorialitat cromosòmica no aleatòria en les cèl·lules espermatogèniques i espermatozoides, no és agosarat proposar que la distribució i posicionament dels cromosomes sigui essencial per a la regulació de l'expressió gènica, necessària per al correcte desenvolupament del procés de l'espermatogènesi i els estadis primerencs de l'embrió (Greaves et al. 2003; Marshall 2003; Foster i Bridger 2005; Zalensky i Zalenskaya 2007; Mudrak et al. 2012). Tant és així que actualment hi ha un creixent i lògic interès en establir relacions entre alteracions del posicionament dels cromosomes a les cèl·lules germinals masculines i la infertilitat masculina.

Concretament, Finch i col·laboradors (2008) van observar que els centròmers dels cromosomes X, Y i 18 es localitzaven a la part central del nucli dels espermatozoides humans de donants control i, en canvi, els cromosomes sexuals es distribuïen aleatòriament en el nucli dels espermatozoides d'homes infèrtils (Finch et al. 2008). També, s'ha observat una distribució alterada dels cromosomes 15, 18, X i Y en els espermatozoides de pacients infèrtils amb una elevada freqüència d'aneuploidies (Olszewska et al. 2008). A més a més, l'organització territorial dels bivalents al nucli d'espermatòcits a metafase I s'ha vist parcialment modificada per la

presència d'univalents dels cromosomes sexuals en individus infèrtils (Mayans et al. 2018), una anormalitat estretament relacionada amb el risc d'aneuploidia dels cromosomes sexuals (revisat per Tempest 2011).

D'altra banda, també s'ha observat una variació en el posicionament del centròmer del cromosoma 17 i en la formació del cromocentre en espermatozoides immòbils, respecte dels mòbils (Alladin et al. 2013). De manera similar, altres autors han observat lleugeres variacions del posicionament dels centròmers dins del nucli dels espermatozoides de pacients amb una baixa qualitat espermàtica i una elevada freqüència d'aneuploidies (Ioannou et al. 2011).

Pel que fa els individus infèrtils que presenten un cariotip alterat, s'ha observat una territorialitat cromosòmica alterada en espermatozoides d'individus portadors de translocacions recíproques (Wiland et al. 2008) i en espermatozoides a l'estadi de metafase I d'individus portadors de translocacions Robertsonianes (Garagna et al. 2001, Solé et al. 2016).

Tan és així, que davant de les evidències de la relació funcional que hi ha entre l'organització espacial dels cromosomes i la fertilitat masculina, recentment ha nascut la idea de que la territorialitat cromosòmica té el potencial d'esdevenir una eina de diagnòstic en la infertilitat masculina (Meaburn 2016). No obstant, aquesta idea encara és molt incipient i requereix de la realització de més estudis per tal de comprendre les normes que regulen el seu funcionament.



2.OBJECTIUS

Objectiu principal

Establir un model tridimensional de territorialitat cromosòmica durant les diferents fases que configuren el procés de l'espermatogènesi de *Mus musculus*.

Objectius específics

- Desenvolupar una metodologia per a l'estudi tridimensional del posicionament dels cromosomes en cèl·lules germinals i espermatozoides.
- Descriure el posicionament cromosòmic en cèl·lules germinals i espermatozoides.
- Identificar els factors que condicionen el posicionament cromosòmic en les cèl·lules germinals i espermatozoides.



3.MATERIALS I MÈTODES

MOSTRES BIOLÒGIQUES

Es van utilitzar mostres biològiques de teixit testicular procedents de quatre individus de l'espècie *Mus musculus*. La soca utilitzada va ser C57BL/6J, la qual mostra un cariotip normal i una taxa de fertilitat dins dels paràmetres de la normalitat. Els animals es van adquirir a les onze setmanes d'edat i es van estabular al Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona. Amb la finalitat d'obtenir una bona aclimatació dels animals i reduir el possible estrès causat pel trasllat, es van mantenir estabulats durant set dies. Un cop assolida l'edat de dotze setmanes, el personal del servei va realitzar el sacrifici dels animals mitjançant una dislocació cervical. Tot seguit, es van obtenir les mostres realitzant un procés d'orquiectomia. El processat de les mostres sempre es va realitzar immediatament després de la seva obtenció.

PROTOCOLS DE PROCESSAMENT

La metodologia utilitzada per a l'estudi del posicionament cromosòmic en les cèl·lules germinals masculines consta dels següents protocols: (1) disgregació del teixit testicular, (2) adhesió cel·lular a portaobjectes polilisinitzats, (3) fixació cel·lular, (4) tractaments previs al procés d'hibridació, (5) hibridació in situ fluorescent, (6) identificació i captura d'imatges de cromosomes (7) immunofluorescència, (8) processament i anàlisi d'imatges i (9) tractament de dades i anàlisi estadística.

Protocol 1: Disgregació del teixit testicular

Tot seguit del procés d'orquiectomia, es va disgregar el teixit testicular seguint el següent procediment²:

- Transferir la mostra de teixit testicular a un vidre de rellotger i tallar-la amb unes tisores en fragments d'aproximadament 3 mm³ per facilitar-ne la posterior disgregació enzimàtica.
- Posar els fragments dins d'un tub amb 4 ml de medi Roswell Park Memorial Institute (RPMI) complementat amb col·lagenasa I, la qual actuarà trencant els enllaços peptídics dels col·làgens (**Medi 1, Annex 1**).
- Incubar en un bany en agitació (60 rpm) durant 10 minuts a 37° C.

² Protocol adaptat de Garcia-Quevedo et al. 2012

- Aspirar i deixar anar el material diverses vegades amb una pipeta Pasteur per tal de separar els túbuls seminífers del teixit intersticial. Deixar sedimentar durant 5 minuts.
- Guardar el sobrenedant dins d'un tub a 4° C i continuar treballant amb el sediment.
- Resuspendre el pèl·let amb 3 ml de medi amb tripsina, piruvat sòdic, àcid etilendiamintetraacètic (EDTA) , hialuronidasa i desoxirribonucleasa (DNAsa) amb la finalitat de degradar les unions intercel·lulars (**Medi 2, Annex 1**) i incubar durant 10 minuts a 37° C.
- Aspirar i deixar anar la mostra amb una pipeta Pasteur per tal d'evitar la formació d'agregats i alliberar les cèl·lules.
- Neutralitzar l'activitat de la tripsina afegint 3 ml de medi RPMI amb sèrum boví fetal (FBS) al 10 % (**Medi 3, Annex 1**) i centrifugar a 500 g durant 5 minuts a 4° C.
- Descartar el sobrenedant, resuspendre el pèl·let en 3 ml del Medi 3 i afegir el sobrenedant de la primera disgregació, mantingut a 4° C.
- Centrifugar la suspensió cel·lular obtinguda a 500 g durant 5 minuts a 4° C.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el pèl·let amb 3 ml de medi RPMI/50 % FBS.
- Deixar sedimentar durant 5 minuts i obtenir el sobrenedant on es troba la suspensió cel·lular d'estudi. Descartar el sediment amb les restes de teixit.
- Amb la finalitat d'obtenir una suspensió cel·lular enriquida d'espermatozoides cal filtrar la mostra utilitzant unes malles de niló. Aquestes malles contenen uns porus de forma quadrícula diagonal dels quals mesuren 30 µm. Degut a que els espermatozoides de ratolí mesuren al voltant de 100 µm de llarg (Albrechtová et al. 2014), sovint aquests es queden atrapats a la malla.
- Realitzar un rentat de la malla amb 2 ml de Medi 4 per recuperar el filtrat.
- Realitzar el recompte cel·lular dels espermatozoides amb la cambra de Neubauer utilitzant el microscopi invertit de contrast de fases (*Nikon Diaphot TMD*).

Protocol 2: Adhesió cel·lular a portaobjectes polilisinitzats

Un cop obtinguda la suspensió de cèl·lules testiculars, es va realitzar un procés d'adhesió cel·lular en portaobjectes polilisinitzats. La polilisina és un compost sintètic que afavoreix

l'adhesió cel·lular mitjançant la interacció de les seves càrregues positives amb les càrregues negatives de la superfície cel·lular i, per tant, preservant la morfologia tridimensional de la cèl·lula. La polilisinització dels portaobjectes i l'adhesió cel·lular es va realitzar, seguint el següent protocol:

- Afegir 150 µl de polilisina hidrobromida (1 mg/ml) en un portaobjectes del sistema d'identificació cromosòmica Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome Murine System™ (Cytocell Ltd, Cambridge, Regne Unit). La particularitat d'aquests portaobjectes és que contenen 7 regions delimitades (**Figura 3.1**) que després serviran per realitzar el marcatge de diferents combinacions de cromosomes mitjançant hibridació in situ fluorescent (veure **Protocol 5: Hibridació in situ fluorescent**)



Figura 3.1 Portaobjectes del sistema d'identificació cromosòmica Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome Murine™ (Cytocell Ltd, Cambridge, Regne Unit).

- Cobrir el portaobjectes amb Parafilm per tal que la polilisina s'escampi per tota la superfície sense fer bombolles.
- Incubar dins d'una cambra humida a 37° C durant 90 minuts col·locant la cara que conté polilisina i el Parafilm cap per avall.
- Treure lateralment el Parafilm i submergir el portaobjectes en aigua destil·lada durant 2 segons.
- Eixugar el portabjectes a l'aire durant 30-45 minuts.
- Homogeneïtzar la suspensió cel·lular amb l'ajuda d'un agitador de vòrtex. Recuperar un volum que contingui entre 10^5 i 10^6 cèl·lules i dipositar-lo amb l'ajuda d'una pipeta sobre el portaobjectes polilisinitzat, comprovant que la mostra quedi repartida per tota la superfície del portaobjectes.
- Introduir el portaobjectes a dins d'una placa de petri i incubar a 37° C i 5 % de CO_2 durant 75 minuts.
- Comprovar l'adhesió cel·lular mitjançant el microscopi invertit de contrast de fases.

Protocol 3: Fixació cel·lular

El procés de fixació cel·lular es va dissenyar per tal de no malmetre la morfologia cel·lular, preservar la tridimensionalitat de la cèl·lula (Solovei et al. 2002) i facilitar l'accessibilitat de la cromatina a les sondes de pintat cromosòmic³:

- Rentar el portaobjectes amb 0,3 x tampó fosfat salí (PBS) durant 40 segons.
- Fixar les cèl·lules amb 4 % paraformaldehid (PFA)/0,3 x PBS fresc durant 10 minuts a temperatura ambient.
- Rentar amb 1 x PBS a temperatura ambient durant 5 minuts. Realitzar aquest pas 3 vegades.
- Incubar en 0,5 % tritó X-100/1 x PBS a temperatura ambient durant 20 minuts.
- Transferir a 20 % glicerol/1 x PBS i incubar a temperatura ambient durant 30 minuts.
- Submergir els portaobjectes en nitrogen líquid aproximadament durant 30 segons.
- Deixar el portaobjectes sobre paper de filtre fins que desaparegui la capa de gel.
- Submergir el portaobjectes en 20 % glicerol/1 x PBS durant 2 segons.
- Repetir el procés de congelació, descongelació i 20 % glicerol/1 x PBS 4 vegades.
- Rentar en 0,05 % tritó X-100/1 x PBS durant 5 minuts. Realitzar aquest pas 2 vegades.
- Incubar en 0,1 N HCl durant 5 minuts per tal de realitzar una desproteïnitació de la mostra.
- Rentar en 2 x citrat sòdic salí (SSC) durant 2 minuts.
- Incubar els portaobjectes en 50 % formamida (pH 7,0)/2 x SSC a temperatura ambient durant 24 hores.
- Emmagatzemar els portaobjectes durant dos mesos a 4° C per tal de facilitar la posterior desnaturalització del DNA.

³ Protocol adaptat de Cremer et al. 2012

Protocol 4: Tractaments previs al procés d'hibridació

Amb la finalitat de facilitar l'accessibilitat de les sondes d'hibridació a les seves seqüències complementàries, per tant, assolir un procés d'hibridació eficient, es va realitzar un tractament de desproteïnitació cel·lular mitjançant una incubació de la mostra amb pepsina. A més a més, en el cas dels portaobjectes destinats a la valoració de la territorialitat cromosòmica en el nucli dels espermatozoides, es va realitzar un tractament de descondensació de la cromatina mitjançant 1,4-ditiotreitòl (DTT), el qual facilita la descondensació espermàtica mitjançant el trencament dels ponts disulfur que s'estableixen entre les protamines. Els protocols utilitzats per a cada procés es detallen a continuació:

Tractament de desproteïnitació

- Incubar els portaobjectes amb 2 x SSC durant 2 minuts a temperatura ambient.
- Incubar amb 1 x PBS durant 3 minuts a temperatura ambient.
- Incubar amb 0,005 % de pepsina en 0,01 N HCl durant 2 minuts de la següent manera: escalfar 0,01 N HCl a 37° C en un recipient, afegir-hi la pepsina just abans de la utilització, remenar-ho bé i dipositar-ho en una cubeta. Esperar 10 minuts perquè la pepsina s'activi. Incubar-hi el portaobjectes durant 2 minuts.
- Incubar en 1 x PBS/50 mM MgCl₂ durant 5 minuts a temperatura ambient a fi d'inactivar la pepsina. Realitzar el procés dues vegades.
- Fixar en 1 % PFA/1 x PBS durant 10 minuts a temperatura ambient.
- Rentar en 1 x PBS durant 5 minuts a temperatura ambient.
- Rentar en 2 x SSC durant 5 minuts. Realitzar el rentat dues vegades.
- Incubar els portaobjectes en 50 % formamida/2 x SSC durant com a mínim 1 hora abans de la hibridació.

Tractament de descondensació de la cromatina espermàtica

- Incubar els portaobjectes en 5 mM DTT, 1 % Triton X-100 i 50 mM 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (Tris) a pH 7,4 ± 0,2 durant 3 minuts.

- Rentar en 1 x PBS durant 5 minuts a temperatura ambient.
- Rentar en 2 x SSC durant 5 minuts. Realitzar el rentat dues vegades.

Protocol 5: Hibridació in situ fluorescent

Amb la finalitat d'identificar tots els cromosomes de ratolí en les diferents cèl·lules espermatogèniques es va dissenyar un mètode experimental basat en la realització de tres rondes d'hibridació seqüencial amb sondes de DNA de pintat cromosòmic.

En primer lloc, es van dissenyar tres tipus de plantilles d'hibridació amb set combinacions diferents de tres sondes de pintat cromosòmic marcades amb diferents fluorocroms: Aqua 7-Dietilaminocumarina 3-àcid carboxílic (DEAC), Isotiocianat de fluoresceïna (FITC) i Texas Red. Aquestes combinacions es van assignar a set regions diferents de cada plantilla d'hibridació (**Figura 3.2**). Un cop dissenyades, les plantilles es van produir per la casa comercial Cytocell Ltd (Cambridge, Regne Unit), concretament per la Doctora Gothami Fonseka i el Doctor Martin Lawrie, utilitzant el sistema d'anàlisi cromosòmica Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome Murine System™.

En segon lloc, es van realitzar tres rondes seqüencials d'hibridació emprant una plantilla diferent en cadascuna de les rondes; la distribució de les regions delimitades en les plantilles coincideix amb la distribució de les regions delimitades en els portaobjectes proporcionats pel mateix lot

TIPUS 1	R5 10 9 18	R6 12 11 19	R7 X 13 Y	
	R1 1 4 14	R2 2 5 15	R3 3 7 16	R4 6 8 17
TIPUS 2	R5 6 8 17	R6 10 9 18	R7 12 11 19	
	R1 3 7 16	R2 1 4 14	R3 2 5 15	R4 3 7 16
TIPUS 3	R5 X 13 Y	R6 1 4 14	R7 2 5 15	
	R1 X 13 Y	R2 6 8 17	R3 10 9 18	R4 12 11 19

(**Figura 3.1**). Així doncs, sobreposant la plantilla en un portaobjectes on prèviament s'hi havien adherit les cèl·lules i realitzant un procés d'hibridació, es van marcar diferents

Figura 3.2 Plantilles d'hibridació desenvolupades a través del sistema Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome Murine System™ (Cytocell Ltd, Cambridge, UK). S'observen 3 tipus de plantilles. Cadascuna conté 7 regions numerades (R1, R2, R3, R4, R5, R6 i R7) i delimitades. Cada regió conté una combinació diferent de tres sondes de pintat cromosòmic marcades amb diferents fluorocroms (Aqua DEAC, FITC i Texas Red) que hibridaran els cromosomes que es determinen en la figura.

combinacions de tres cromosomes per nucli. D'aquesta manera, després de les tres rondes seqüencials d'hibridació, es van obtenir nuclis amb un total de nou cromosomes marcats (**Figura 3.3**). A més, un cop realitzades les tres rondes, el procediment experimental dissenyat va permetre identificar tots els cromosomes del cariotip de ratolí i establir combinacions de totes les parelles de cromosomes.



Figura 3.3 Representació gràfica de la combinació de cromosomes marcats dels nuclis de cada regió del portaobjectes després de les tres rondes seqüencials d'hibridació.

El protocol utilitzat per dur a terme el procés d'hibridació seqüencial es detalla a continuació:

Preparació

- Temperar la cambra d'hibridació subministrada pel lot al bany a 37° C.
- Afegir 25 µl de solució d'hibridació subministrada pel lot a un tub d'Eppendorf i escalfar-lo al bany a 37° C durant 1 hora.
- Dipositar la plantilla d'hibridació a dins de la cambra d'hibridació prèviament temperada, amb la cara que conté les sondes a la part superior. Deixar la cambra al bany a 37° C durant 1 hora.
- Dipositar la plantilla d'hibridació en la placa del sistema automatitzat d'hibridació Vysis HYBrite Hybridization prèviament escalfada a 37° C i afegir 2 µl de la solució d'hibridació a cada àrea de la plantilla.
- Treure el portaobjectes de la formamida i eliminar l'excés de líquid recolzant el portaobjectes perpendicularment a sobre d'un paper de filtre.

- Sobreposar el portaobjectes a la plantilla, de manera que cada regió del portaobjectes encaixi amb la regió corresponent de la plantilla segons la numeració, tal i com es mostra a la **Figura 3.4**



Figura 3.4 Superposició de la plantilla al portaobjectes per tal de dur a terme el procés d'hibridació.

- Capgirar conjuntament el portaobjectes i la plantilla de manera que el portaobjectes quedi a sota de la plantilla.
- Incubar el portaobjectes al Vysis HYBrite Hybridization System a 37° C durant 10 minuts.

Desnaturalització

- Desnaturalitzar el DNA mitjançant la incubació de les sondes i les seves seqüències diana al Vysis HYBrite Hybridization System a 75° C durant 5 minuts.

Hibridació

- Posar el portaobjectes a la cambra d'hibridació prèviament temperada, tancar la cambra i deixar-la al bany a 37° C durant 60 hores .

Rentats de Post-hibridació i muntatge

- Separar amb cura la plantilla del portaobjectes.
- Rentar el portaobjectes amb 1 x SSC a 72° C durant 2 minuts.
- Rentar amb 2 x SSC, 0,05 % Tween-20 a temperatura ambient durant 30 segons.
- Afegir 30 µl de la solució d'antifade proporcionada pel lot.
- Posar un cobreobjectes de 24 x 50 mm i segellar-lo amb esmalt d'ungles.
- Realització del **Protocol 6: Identificació i captura d'imatges dels territoris cromosòmics**.

- Només en el cas de la primera i la segona ronda d'hibridació, seguir el protocol realitzant el següent apartat "Extracció del cobreobjectes i rentats de les sondes de marcatge".

Extracció del cobreobjectes i eliminació dels senyals d'hibridació

- Submergir en 2 x SSC durant 10 min a fi de facilitar l'extracció de l'esmalt d'ungles.
- Treure l'esmalt d'ungles del cobreobjectes amb un bisturí.
- Submergir en 2 x SSC fins que el cobreobjectes es separi fàcilment del portaobjectes.
- Rentar el portaobjectes amb 2 x SSC durant 5 minuts a temperatura ambient.
- Rentar amb 0,0625 x SSC durant 5 minuts a 73° C.
- Reprendre la metodologia al protocol 4: "Tractaments previs al procés d'hibridació" a fi de realitzar el mateix procés per a la segona i la tercera ronda d'hibridació, utilitzant en cadascuna una plantilla d'hibridació diferent.

Protocol 6: Identificació i captura de cromosomes

Després de cada ronda d'hibridació, es van capturar imatges de nuclis amb els senyals d'hibridació corresponents als cromosomes marcats mitjançant les sondes de pintat cromosòmic. La captura es va realitzar mitjançant un microscopi confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Alemanya) (Figura 3.5).

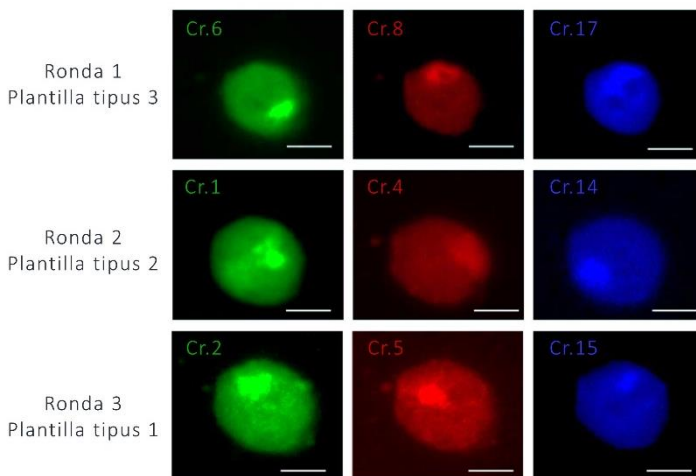


Figura 3.5 Projecció màxima de seccions òptiques seriades capturades mitjançant el microscopi confocal Leica TCS SP5 d'un mateix nucli de la regió 2 després de la primera, la segona i la tercera ronda d'hibridació. S'observen nou cromosomes diferents marcats amb els següents fluorocroms: FITC, Texas Red, Aqua DEAC. La barra d'escala equival a 5 µm.

Es va emprar un detector híbrid (HyD), un objectiu HCX PL APO *lambda blue* 63.0x1.40 OIL UV i un sistema de captures acoblat al software LAS AF v. 1.8.1 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Germany). Les condicions de captura es van establir d'acord amb els paràmetres recomanats pel personal responsable del Servei de Microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona i es van mantenir constants en totes les sessions realitzades. Concretament, les línies de làser i les freqüències d'excitació utilitzades van ser: làser díode UV 405 nm, làser d'argó multilínia 488 nm i làser DPSS 561 nm per als fluorocroms Aqua DEAC, FITC i Texas Red respectivament. El detector HyD es va configurar a 415-470 nm per a Aqua DEAC, a 500-550 nm per a FITC i a 571-750 nm per a Texas Red.

Les captures es van realitzar utilitzant un mòdul d'escaneig d'alta velocitat anomenat escàner ressonant. Es van obtenir seccions òptiques seriadades en els eixos X, Y i Z amb una distància entre secció i secció de 0,17 μm (Figura 3.6), un format de 512x256 píxels i un zoom virtual de 5. El

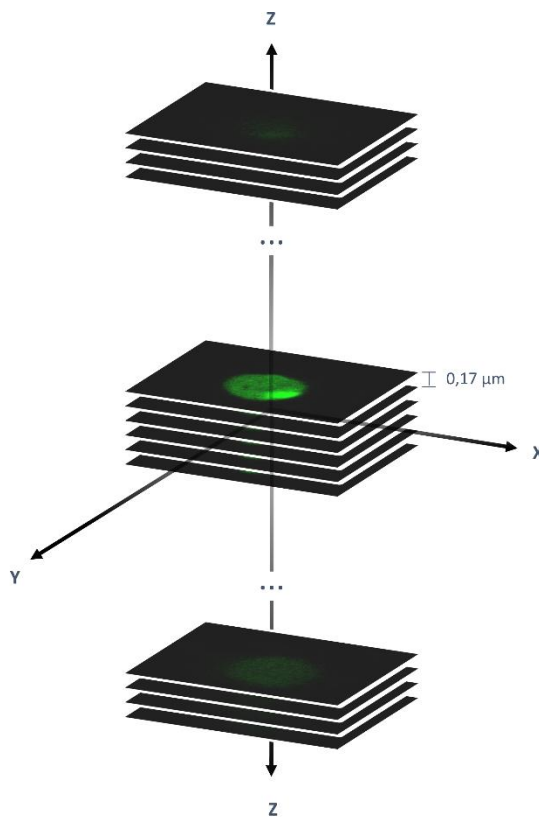


Figura 3.6 Representació gràfica de les seccions òptiques seriadades capturades.

nombre de seccions va ser variable per a cada nucli en funció del volum nuclear. Totes les captures es van associar a les seves coordenades per tal de poder relocalitzar els mateixos nuclis i poder realitzar-ne captures després de cada ronda d'hibridació.

Protocol 7: Immunofluorescència

El procés espermatogènic presenta diferents tipus cel·lulars –cèl·lules germinals i cèl·lules somàtiques– i diferents estadis de desenvolupament amb varietat de ploïdia. Així doncs, per tal de poder analitzar el posicionament cromosòmic en els diferents tipus cel·lulars és imprescindible implementar tècniques d'identificació cel·lular. Amb aquesta finalitat es va dissenyar un mètode basat en tècniques d'immunofluorescència per identificar tres proteïnes –la proteïna del complex sinapteinemal 3 (SYCP3), la histona 1 específica de testicle (H1T) i la proteïna nuclear específica de testicle (TRA98). La presència o l'absència d'aquestes proteïnes juntament amb la valoració de la morfologia nuclear mitjançant contratinció amb 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) va permetre identificar inequívocament els diferents tipus cel·lulars (Figura 3.7).

Concretament, la proteïna SYCP3 és un component estructural del complex sinapteinemal que actua com a element lateral del complex (Handel i Schimenti 2010). La seva formació s'inicia a l'estadi de preleptotè mitjà, deixant veure un marcatge nuclear en forma de punts, i és completa a l'estadi de paquitè, on es pot observar un marcatge nuclear en forma de llargs filaments. A l'estadi de diplotè, comença la seva desestructuració veient-ne encara uns últims romanents a metafase I. La histona H1T és una variant de la histona H1 present d'una manera homogènia des de l'estadi de paquitè tardà i fins a espermàtida rodona. D'altra banda, TRA98 és una proteïna nuclear, de funció biològica desconeguda i específica de cèl·lules germinals. Aquesta proteïna és present d'una manera uniforme en el nucli dels espermatogonis, els espermatòcits i les espermàtides rodones. Finalment, la contratinció amb DAPI mostra un patró de tinció basat en diferents intensitats de marcatge que varia al llarg del procés de l'espermatogènesi en funció de l'agrupació de blocs d'heterocromatina.

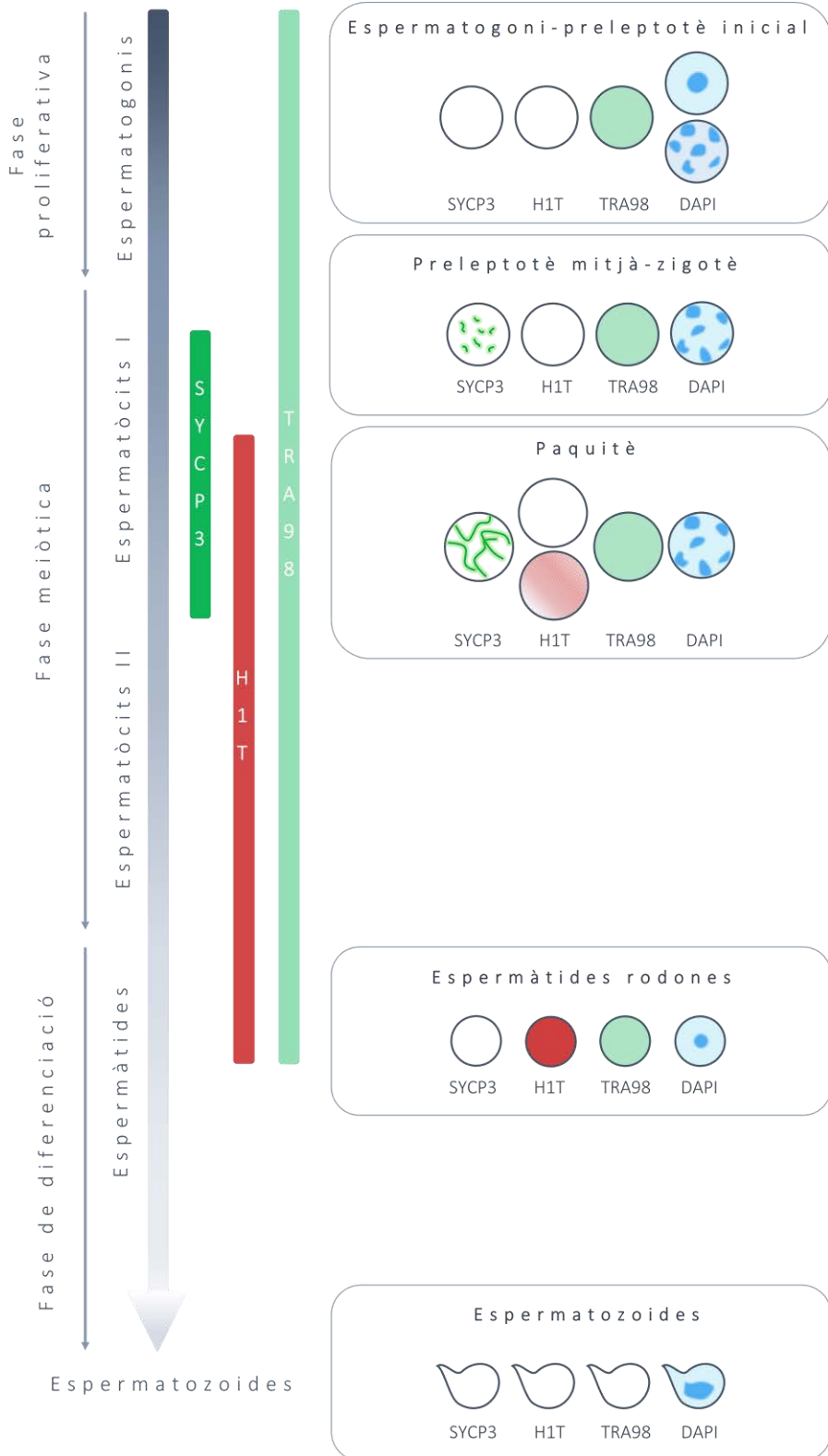


Figura 3.7

Representació gràfica de la dinàmica d'expressió i el patró de marcatge de les proteïnes SYCP3, H1T i TRA98 i la contratió amb DAPI durant el transcurs del procés de l'espermatogènesi.

El procés de marcatge de les proteïnes es va dur a terme realitzant dues rondes seqüencials d'immunofluorescència sobre les cèl·lules on prèviament s'havia realitzat l'anàlisi cromosòmica mitjançant FISH. A la primera ronda es va detectar la proteïna SYCP3 i la histona H1T i a la segona ronda la proteïna nuclear específica de testicle TRA98. En tots dos casos, es va realitzar una contratinció amb DAPI. El protocol d'immunofluorescència utilitzat es detalla a continuació:

Detecció per immunofluorescència

- Submergir en 2 x SSC durant 10 min a fi de facilitar l'extracció de l'esmalt d'ungles.
- Treure l'esmalt d'ungles del cobreobjectes amb un bisturí.
- Submergir en 2 x SSC fins que el cobreobjectes es separi fàcilment del portaobjectes.
- Rentar els portaobjectes en PBS preparat el mateix dia durant 30 segons.
- Fixar les estructures cel·lulars en 3 % PFA fresc, filtrat i esterilitzat durant 10 minuts a temperatura ambient.
- Rentar en PBS durant 5 minuts. Repetir el rentat 3 vegades.
- Introduir una cubeta amb PBS 0,5 % v/v Triton X-100 a dins d'un recipient amb gel picat i esperar 30 minuts. Un cop el PBS 0,5 % v/v Triton X-100 s'hagi refredat, incubar-hi la mostra durant 5 minuts per tal de Permeabilitzar les membranes cel·lulars.
- Rentar en PBS durant 5 minuts. Realitzar aquest pas 3 vegades.
- Bloquejar en 1 % w/v d'albumina de sèrum boví (BSA) durant 15 minuts a temperatura ambient.
- Incubar amb els anticossos primaris (**Taula 3.1, Ronda 1**) diluïts en 100 µl de BSA a l'1 % durant 45 minuts a temperatura ambient, a una cambra humida i a les fosques o bé durant tota la nit a la nevera.
- Rentar en PBS durant 5 minuts. Realitzar aquest pas 3 vegades.
- Incubar amb els anticossos secundaris (**Taula 3.1, Ronda 1**) diluïts en 100 µl de BSA a l'1 % durant 40 minuts a temperatura ambient en una cambra humida, a les fosques i a 37°C.
- Rentar en PBS durant 5 minuts. Realitzar aquest pas 3 vegades.
- Contratenyir el DNA amb 25 µl de DAPI-Antifade durant 10 minuts.

- Posar un cobreobjectes de 24 x 50 mm i segellar-lo amb esmalt d'ungles.
- Realitzar-ne la valoració al microscopi confocal Leica SP5⁴.

Extracció del cobreobjectes

- Submergir en 2 x SSC durant 10 min a fi de facilitar l'extracció de l'esmalt d'ungles.
- Treure l'esmalt d'ungles del cobreobjectes amb un bisturí.
- Submergir en 2 x SSC fins que el cobreobjectes es separi del portaobjectes.
- Repetir el procés de "Detecció per immunofluorescència" utilitzant els anticossos de la segona ronda (Taula 3.1, Ronda 2).

Ronda 1

Anticòs 1ari	Concentració	µl	Anticòs 2ari	Concentració	µl
<i>Rabbit anti-SCP3</i>	1 mg/ml	0,5	<i>Anti-rabbit FITC</i>	1,5 mg/ml	0,5
<i>Guinea pig anti-H1T</i>	1 mg/ml	0,2	<i>Anti-guinea pig CY3</i>	1,5 mg/ml	0,2

Ronda 2

Anticòs 1ari	Concentració	µl	Anticòs 2ari	Concentració	µl
<i>Rat anti-TRA98</i>	1 mg/ml	3,2	<i>Anti-rat FITC</i>	2 mg/ml	0,5

Taula 3.1 Anticossos utilitzats per a la detecció de les proteïnes SYCP3, H1T i TRA98.

Després de realitzar cada ronda d'immunofluorescència, es va dur a terme una valoració al microscopi confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Germany) de tots els nuclis analitzats prèviament mitjançant FISH. La presència, l'absència i/o el diferent patró de marcatge d'aquestes proteïnes i els diferents patrons de tinció amb DAPI, van permetre classificar els nuclis en 5 estadis cel·lulars: espermatogoni-preleptotè inicial, espermatòcits I a

⁴ Les condicions de captura utilitzades van ser les mateixes que s'han detallat al Protocol 6: Identificació i captura de cromosomes

l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè, espermatoïcits I a l'estadi de paquitè, espermàtides rodones i espermatozoides.

Protocol 8: Processament i anàlisi d'imatges

Es va dissenyar un mètode d'anàlisi d'imatges per tal d'obtenir dades numèriques que permetessin descriure la territorialitat cromosòmica en relació al següents paràmetres cromosòmics: (1) volum, (2) posicionament radial, (3) posicionament relatiu i (4) posicionament longitudinal (en el cas concret dels espermatozoides). Aquest mètode es basa en el processament de les imatges obtingudes mitjançant el microscopi confocal utilitzant els programaris Fiji⁵ i Matlab R2013b.

El programari Fiji es va utilitzar per binaritzar les seccions òptiques seriadades de cada cromosoma i nucli capturat amb el microscopi confocal. El procés de binarització consisteix en transformar les imatges en dos colors, negre per la regió d'interès i blanc per a la resta (

Figura 3.8). Degut a que cada nucli constava d'un elevat nombre d'imatges, el procés d'anàlisi es va semi-automatitzar creant un script dins l'entorn Fiji (**Annex 2**).

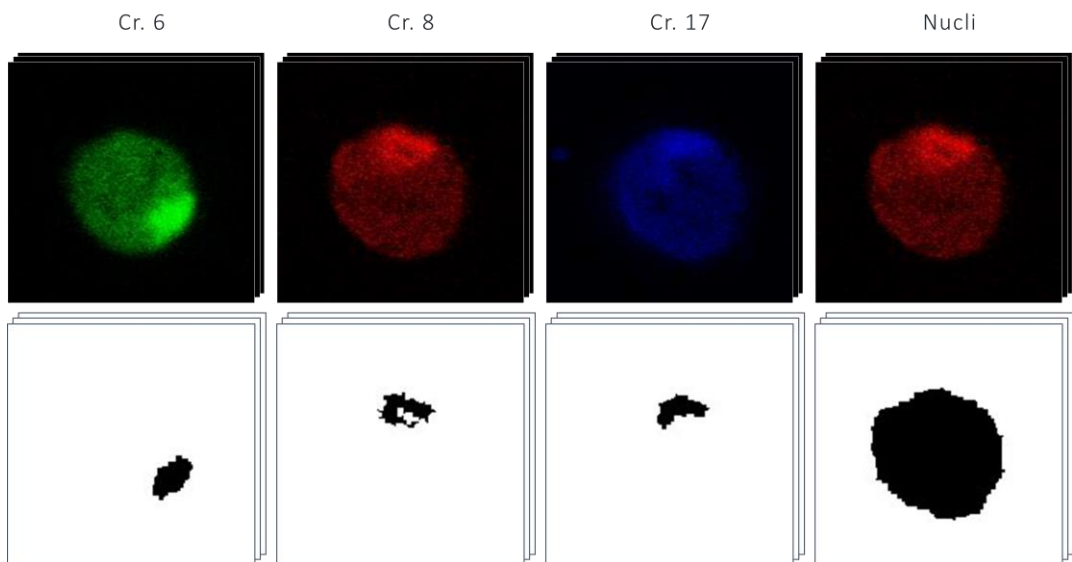


Figura 3.8 Binarització de les imatges mitjançant el programari Fiji.

⁵ Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. (2012), "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", Nature methods 9(7): 676-682, PMID 22743772.

Un cop obtingudes les imatges binaritzades, aquestes es van analitzar mitjançant scripts creats dins l'entorn del programari Matlab dissenyats amb la col·laboració de la Dra. Debora Gil Resina del Centre de Visió per Computació de la Universitat Autònoma de Barcelona, . La utilització del programari Matlab va permetre la integració i anàlisi de la informació de les seccions binaritzades tenint en compte la distància entre seccions, mitjançant la transformació dels píxels informatius en elements volumètrics anomenats vòxels. D'aquesta manera, es va dur a terme una anàlisi tridimensional de les seccions capturades mitjançant el microscopi confocal.

La metodologia utilitzada per determinar cadascun dels paràmetres cromosòmics es detalla a continuació:

Volum

Per calcular el volum absolut de cada cromosoma així com el volum absolut nuclear, es va realitzar el sumatori dels vòxels de les seccions binaritzades. Dividint el volum cromosòmic pel volum nuclear es va determinar la proporció de volum nuclear que ocupa cada cromosoma.

Posicionament radial

El posicionament radial dels cromosomes es va determinar dividint el volum nuclear en tres zones concèntriques de mateix gruix i calculant el percentatge de volum cromosòmic present en cada zona (**Figura 3.9**).

Per dividir el nucli en tres zones concèntriques, es van determinar els punts més perifèrics del nucli i també el punt més intern. A partir de totes les distàncies entre cadascun dels punts perifèrics i el punt central es va calcular la distància mitjana. Posteriorment, la distància mitjana es va dividir en tres parts iguals. De manera que, tots els punts del nucli que tinguessin una

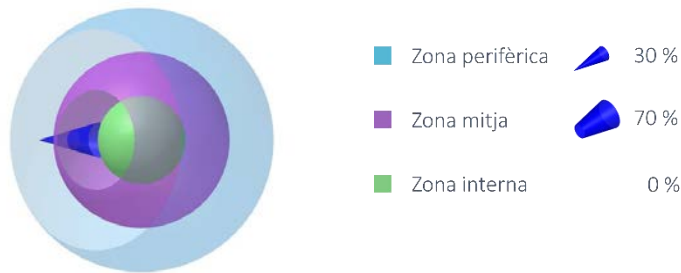


Figura 3.9 Representació gràfica del mètode utilitzat per establir el posicionament radial dels cromosomes. Les zones blava, lila i verda, conjuntament, representen la totalitat del volum nuclear. Concretament, la zona blava indica la zona perifèrica, la zona lila indica la zona mitja i la zona verda indica la zona interna. El con exemplifica un cromosoma. Els percentatges indiquen el volum cromosòmic present en cada zona del nucli.

distància inferior a $1/3$ de la distància mitjana formaven la zona interna, els que tinguessin una distància entre $1/3$ i $2/3$ de la distància mitjana formaven la zona mitja i els que mostraven una distància superior a $2/3$ de la distància mitjana formaven la zona externa.

Posicionament relatiu

Per calcular el posicionament relatiu dels cromosomes es va determinar la presència o absència d'encavalcament entre els territoris cromosòmics. Aquesta valoració es va realitzar entre totes les parelles possibles de cromosomes (**Figura 3.10**).

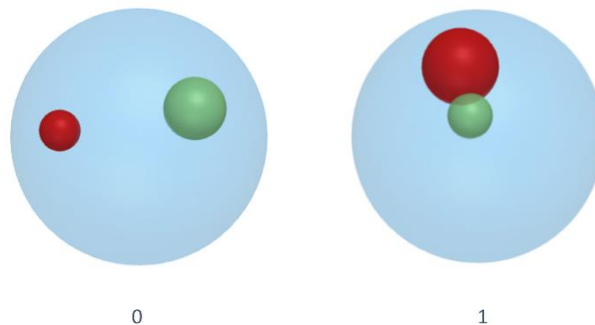


Figura 3.10 Representació gràfica del mètode utilitzat per establir el posicionament relatiu entre totes les parelles de cromosomes. El valor 0 indica que no hi ha encavalcament entre la parella de cromosomes estudiada. El valor 1 indica que hi ha encavalcament entre la parella de cromosomes estudiada.

Per fer-ho, en primer lloc, es van alinear les captures realitzades en les tres rondes per a cada nucli estudiat utilitzant el seu centre de masses. En segon lloc, es va estandarditzar el volum

nuclear de tots els nuclis, ajustant el volum cromosòmic als canvis realitzats. Finalment, es va determinar l'encavalcament entre cromosomes utilitzant un codi binari; les parelles de cromosomes que no compartien cap punt del volum nuclear, se'ls hi va atorgar el valor de 0. En canvi, les parelles de cromosomes que compartien un o més d'un punt del volum nuclear se'ls hi va atorgar el valor de 1.

Posicionament longitudinal

Degut a la morfologia polaritzada del nucli de l'espermatzoide de ratolí (**Figura 3.11**) es va poder determinar el posicionament dels cromosomes en un eix longitudinal. Per fer-ho, es va dividir el volum nuclear en cinc zones longitudinals i es va calcular el percentatge de volum cromosòmic present en cada zona, per cada cromosoma (**Figura 3.11**).

La partició del nucli d'espermatzoide es va realitzar de la següent manera: en primer lloc, es va dividir el volum nuclear en dues zones de mateixa longitud, la zona apical i la zona basal. En segon lloc, la zona apical es va dividir en tres zones per tal de poder distingir la zona més anterior dins de la zona apical (apical 1).

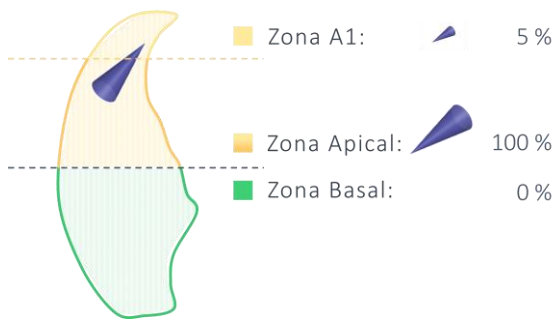


Figura 3.11 Representació gràfica del mètode utilitzat per establir el posicionament radial dels cromosomes. Les zones groga i verda, conjuntament, representen la totalitat del volum nuclear. Concretament, la zona groga indica la zona apical, la zona verda indica la zona basal. A més, la zona groga amb un contorn groc més clar indica la zona més anterior de la zona apical (A1). El con exemplifica un cromosoma. Els percentatges indiquen el volum cromosòmic present en cada zona del nucli.

Protocol 9: Tractament de dades i anàlisi estadística

Es va dissenyar un mètode de tractament i anàlisi de les dades obtingudes (figura 3.12) amb la finalitat d'obtenir resultats que permetessin descriure el posicionament cromosòmic en els diferents tipus cel·lulars identificats i conèixer els factors que la condicionen.

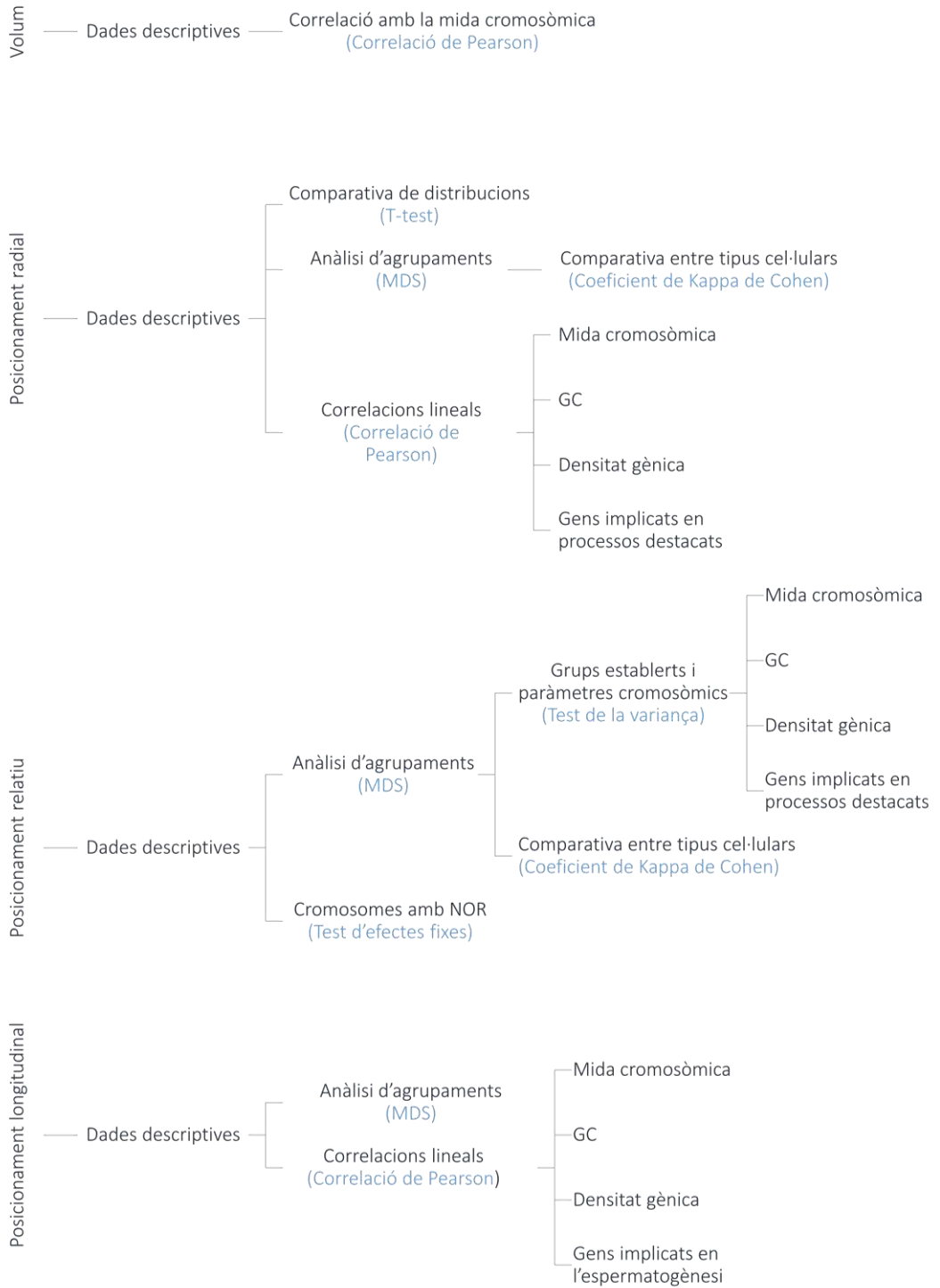


Figura 3.12 Figura esquemàtica del procés de tractament i anàlisi estadística de les dades obtingudes.

Cal remarcar que per tal de descriure el posicionament cromosòmic en els diferents tipus cel·lulars, un fet determinant en el disseny del tractament i anàlisi de les dades va ser el número de senyals observats per cromosoma en cadascun dels tipus cel·lulars; en el cas dels espermatòcits I a l'estadi de paquitè, els cromosomes homòlegs es troben aparellats i, per tant, s'observen sempre com a una entitat conjunta. Pel que fa a les espermàtides rodones i espermatozoides, degut a que ambdues són fraccions haploides, també s'observa una sola entitat. Ara bé, en el cas concret de les cèl·lules a l'estadi espermatogoni-preleptotè inicial i els espermatòcits I a l'estadi de preleptotè inicial-zigotè, els cromosomes homòlegs s'aproximen per tal d'ocupar un mateix domini nuclear amb la finalitat de dur a terme la recombinació meiótica. Així doncs, en aquests dos tipus cel·lulars, en alguns casos –els que anomenarem cromosomes homòlegs separats– la distància entre dos cromosomes homòlegs autosòmics és suficient per poder distingir-los com a dues entitats separades. En altres casos – els que anomenarem cromosomes homòlegs junts – els cromosomes homòlegs estan tan propers que s'observen com una sola entitat conjunta. La distinció entre els cromosomes homòlegs junts i els cromosomes homòlegs separats va requerir l'anàlisi del volum en ambdues situacions.

D'altra banda, per tal d'identificar els factors que condicionen el posicionament cromosòmic en els diferents tipus cel·lulars del procés de l'espermatogènesi, es van establir relacions entre el posicionament cromosòmic descrit i els següents paràmetres cromosòmics: la mida cromosòmica, el contingut de GC, la densitat gènica, percentatge de gens implicats en el procés d'espermatogènesi i també d'espermioogènesi (en el cas de les espermàtides rodones) i el contingut de regions NOR (**Taula 3.2**).

Cr.	Mida (Mb) ^a	% GC ^a	Densitat gènica ^a	% Gens		NOR ^d
				Espermatogènesi ^b	Espermiogènesi ^c	
1	195,47	41,3	2.687	4,45	2,78	
2	182,11	42,2	3.491	7,15	5,56	
3	160,04	40,7	2.225	4,10	2,78	
4	156,51	42,5	2.622	6,45	7,41	
5	151,84	42,7	2.507	7,85	2,78	
6	149,74	41,6	2.597	4,45	4,63	
7	145,44	43,2	3.798	5,39	6,48	
8	129,4	42,6	2.177	4,92	4,63	
9	124,6	42,9	2.276	5,39	6,48	
10	130,7	41,6	2.086	5,16	4,63	
11	122,08	44,0	2.852	6,10	5,56	x
12	120,13	42,0	2.002	2,46	1,85	x
13	120,42	41,9	2.127	4,92	2,78	
14	124,9	41,4	2.111	2,93	5,56	
15	104,04	42,2	1.620	4,10	3,70	x
16	98,21	41,2	1.367	2,70	4,63	x
17	94,99	42,9	2.005	5,63	4,63	
18	90,7	41,7	1.218	1,29	3,70	x
19	61,43	43,1	1.283	2,81	3,70	x
X	171,03	39,7	2.291	8,32	2,78	
Y	91,74	39,3	423	3,40	12,96	

Taula 3.2 Paràmetres cromosòmics utilitzats per testar les possibles relacions condicionants del posicionament cromosòmic. **(a)** Dades extretes de *Genome Reference Consortium, Mus musculus* GRCm38.p6. **(b)** Dades calculades a partir de la recerca a la base de dades del Centre Nacional per la Informació Biotecnològica (NCBI) de gens implicats en el procés d'espermatogènesi segons el següent codi de cerca: (*Mus musculus*[Organism]) AND (spermatogenesis). Els valors indiquen el percentatge de gens implicats en els processos d'espermatogènesi respecte el número de gens totals del genoma de *Mus musculus* implicats en aquest procés. **(c)** Dades calculades a partir de la recerca a la base de dades del Centre Nacional per la Informació Biotecnològica (NCBI) de gens implicats en el procés d'espermiogènesi segons el següent codi de cerca: (*Mus musculus*[Organism]) AND (spermiogenesis). Els valors indiquen el percentatge de gens implicats en els processos d'espermiogènesi respecte el número de gens totals del genoma de *Mus musculus* implicats en aquest procés. **(d)** Dades extretes de Evans et al. 1974; Henderson et al. 1974; Atwood et al. 1976; Dev et al. 1977; Davisson et al. 1989; Kurihara et al. 1994; Britton-Davidian et al. 2011. Les creus indiquen la presència de regions NOR.

El procés d'anàlisi estadística es va dur a terme amb la col·laboració de l'estadístic Oliver Valero Coppin del Servei d'Estadística de la Universitat Autònoma de Barcelona. Les dades es van analitzar utilitzant el programari SAS v9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU. El mètode de tractament de dades i anàlisi estadística utilitzat es detalla a continuació per cada paràmetre estudiat:

Volum

- Anàlisi descriptiva

Per tal d'obtenir dades descriptives de la proporció que ocupen els cromosomes respecte el nucli en cada tipus cel·lular estudiat, es va calcular la mitjana de proporcions per cada cromosoma així com, la desviació estàndard, el coeficient de variació, el valor mínim i el valor màxim.

Posicionament radial

- Anàlisi descriptiva

Per tal d'obtenir dades descriptives del posicionament radial dels cromosomes en cada tipus cel·lular estudiat, es va calcular la mitjana de volum cromosòmic present en cada zona del nucli i per cada cromosoma i la desviació estàndard.

- Representació de les dades

Les dades de la mitjana de volum cromosòmic present en cada zona es van representar en una gràfica ternària. Aquesta gràfica s'utilitza per representar variables que sempre sumen un valor constant, en aquest cas 100%. Consisteix en un triangle equilàter en que cada costat representa la mètrica del percentatge de volum cromosòmic present en la zona interna, en la zona mitja o en la zona perifèrica. Així doncs, cada punt de l'interior d'aquest triangle representa la composició donada per aquests tres components (**Figura 3.13**).

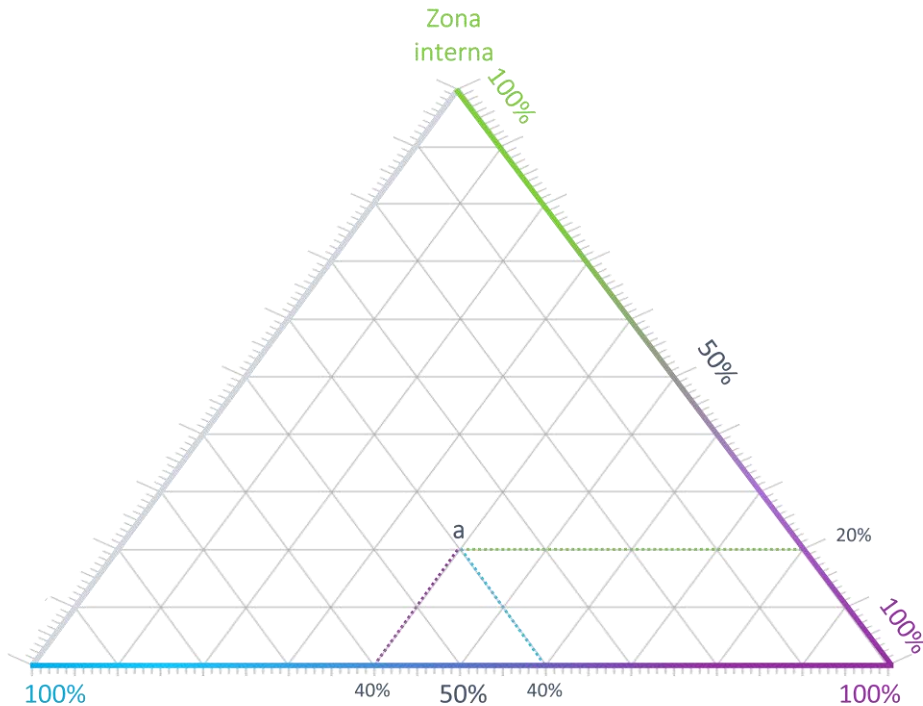


Figura 3.13 Gràfica ternària utilitzada per a la representació de la distribució del volum cromosòmic en les tres zones radials del nucli. El cromosoma exemple “a” mostra de mitjana un 40% del seu volum a la zona externa del nucli, un 40% a la zona mitja i un 20% a la zona interna.

- Comparativa de la distribució del volum cromosòmic

Es van comparar les mitjanes de volum cromosòmic presents a cada zona per a cada cromosoma, a fi de poder classificar els cromosomes segons la tendència de posicionament a la zona externa, mitja o interna. Aquesta valoració es va fer mitjançant el t-test i en van considerar estadísticament significatius els valors p inferiors a 0,05.

- Anàlisi d'agrupaments

Amb la finalitat d'obtenir grups de cromosomes que presenten un patró de distribució de volum cromosòmic similar en les tres zones del nucli, es va realitzar una anàlisi d'agrupaments a partir de l'escalament multidimensional (MDS, de l'anglès *multidimensional scaling*) de les dades. Els grups es van definir segons el valor de r^2 .

- Correlacions lineals

Per tal d'observar si hi havia una relació lineal entre les mitjanes de volum cromosòmic present en cada zona del nucli i les variables quantitatives de mida cromosòmica, contingut de GC, densitat gènica i els gens implicats en el procés d'espermatogènesi i espermiogènesi es va realitzar el test de correlació de Pearson per a cadascun dels paràmetres estudiats respecte les tres zones radials del nucli. Es van considerar correlacions estadísticament significatives els valors p inferiors a 0,05.

- Comparativa entre tipus cel·lulars

Amb la finalitat d'observar l'evolució de l'encavalcament dels cromosomes al llarg del procés de l'espermatogènesi, es van comparar els grups de cromosomes resultants de l'anàlisi d'agrupaments per a cada fracció mitjançant el mètode estadístic del coeficient de kappa de Cohen (k). Aquest mètode permet calcular la proporció de concordança entre dos elements qualitius tenint en compte la concordança que podria existir a l'atzar. Així doncs, si hi ha una concordança absoluta entre els elements, el coeficient K equivaldrà a 1. En canvi, si no existeix concordança entre els elements, el valor k equivaldrà a 0. Les qualificacions utilitzades per considerar el valor de K són els que es determinen a la **Taula 1.2**

K	Interpretació
< 0	Sense concordança
0,1 - 0,2	Insignificant
0,21 - 0,4	Baixa
0,41 - 0,6	Moderada
0,61 - 0,8	Bona
0,81 - 1	Molt bona

Taula 1.2 Interpretació del coeficient Kappa de Cohen (k)

Posicionament relatiu

- Anàlisi descriptiva

Utilitzant les dades binàries d'encavalcament i per tal d'obtenir dades descriptives del posicionament relatiu dels cromosomes en cada tipus cel·lular estudiat, es va calcular la mitjana de freqüència d'encavalcament entre totes les parelles de cromosomes.

- Anàlisi d'agrupaments

Amb la finalitat d'obtenir grups de cromosomes que presenten un patró semblant d'encavalcament amb els altres cromosomes, es va realitzar una anàlisi d'agrupaments a partir de MDS de les dades. Els grups es van definir segons el valor de r^2 .

- Grups establerts i paràmetres cromosòmics

Seguidament, per tal d'observar si els grups establerts per l'anàlisi d'agrupaments mostraven diferències en relació a la mida cromosòmica, el contingut de GC, la densitat gènica i els gens implicats en el procés d'espermatogènesi i espermiogènesi es va realitzar una anàlisi de la variància en relació a aquests paràmetres cromosòmics. Es va considerar que hi havia diferències estadísticament significatives amb valors p inferiors a 0,05.

- Regions NOR

Amb l'objectiu d'observar si els cromosomes que contenen regions NOR tendeixen a encavalcar-se més freqüentment entre sí que amb la resta de cromosomes es va realitzar un test d'efectes fixes.

- Comparativa entre tipus cel·lulars

Amb la finalitat d'observar l'evolució de l'encavalcament dels cromosomes al llarg del procés de l'espermatogènesi, es van comparar els grups de cromosomes resultants de l'anàlisi d'agrupaments del posicionament relatiu per a cada fracció, mitjançant el mètode estadístic del coeficient de kappa de Cohen. Les qualificacions utilitzades per considerar el valor de K són els que es determinen a la **Taula 1.2**.

Posicionament longitudinal

- Anàlisi descriptiva

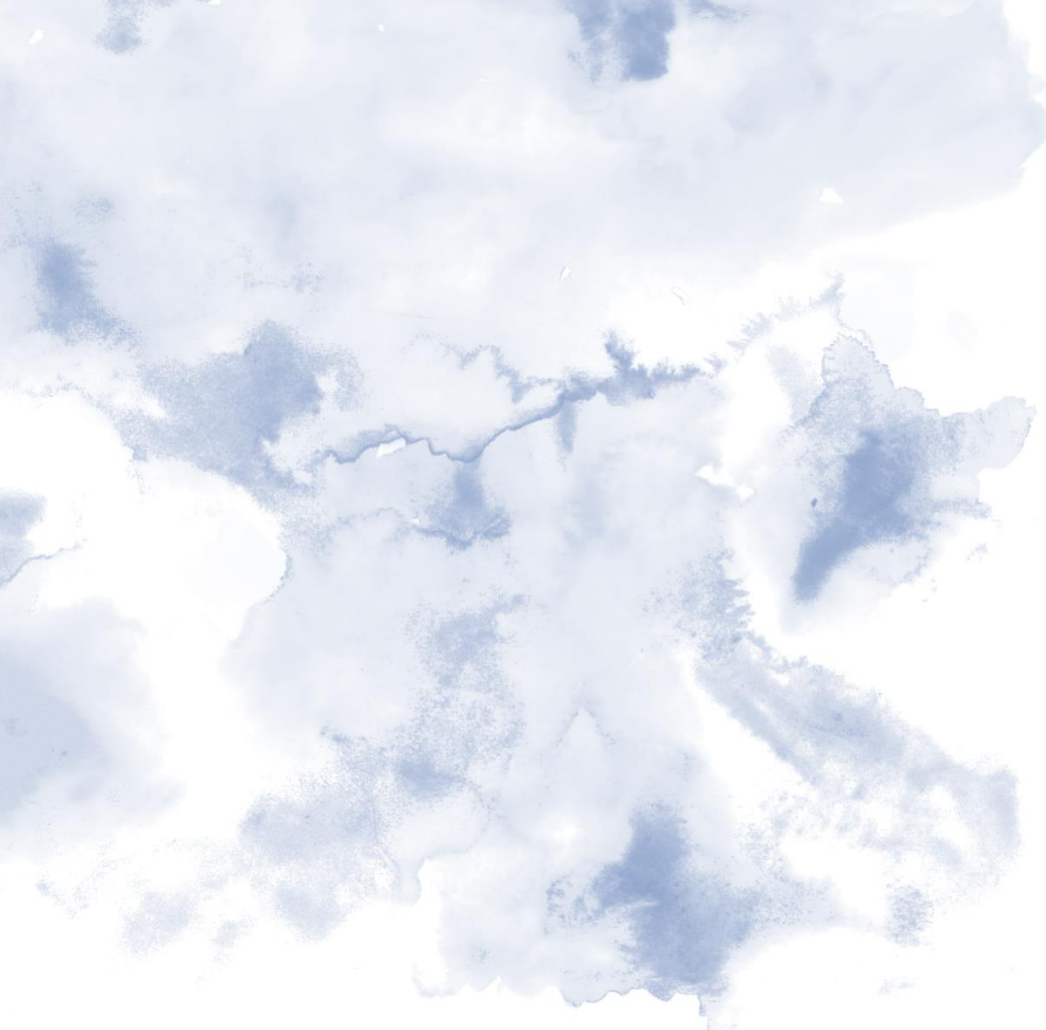
Per tal d'obtenir dades descriptives del posicionament longitudinal dels cromosomes en els espermatozoides, es va calcular la mitjana de volum cromosòmic present en cada zona del nucli i per cada cromosoma així com, la desviació estàndard, el coeficient de variació, valor mínim i el valor màxim.

Anàlisi d'agrupaments

Amb la finalitat d'obtenir grups de cromosomes que presenten un patró semblant de distribució de volum cromosòmic en les dues zones del nucli, es va realitzar una anàlisi d'agrupaments a partir de MDS de les dades. Els grups es van definir segons el valor de r^2 .

- Correlacions lineals

Per tal d'observar si havia una correlació lineal entre les mitjanes de volum cromosòmic present en cada zona del nucli i les variables quantitatives de mida cromosòmica, contingut de GC, densitat gènica i els gens implicats en el procés d'espermatogènesi es va realitzar el test de correlació de Pearson per a cadascun dels paràmetres estudiats respecte les zones apical i basal del nucli. Es van considerar correlacions estadísticament significatives els valors p inferiors a 0,05.



4.RESULTATS

ESPERMATOGONI-ESPERMATÒCIT I A L'ESTADI DE PRELEPTOTÈ INICIAL

Es van capturar i analitzar un total de 997 territoris cromosòmics d'un total de 147 nuclis de cèl·lules identificades dins de l'interval espermatogoni-preleptotè inicial. Aquestes cèl·lules van presentar un marcatge negatiu per la proteïna SYCP3, un marcatge negatiu per la histona H1T i la tinció amb DAPI va mostrar una morfologia arrodonida amb la presència d'un o varis cromocentres.

La segona ronda d'immunofluorescència per detectar la proteïna TRA98 va presentar un marcatge molt lleu que va impossibilitar la distinció entre marcatge positiu i marcatge negatiu. Possiblement, tenint en compte que la segona ronda d'immunofluorescència es va realitzar un any després de la primera ronda, el marcatge lleu es deuria a l'envelliment de la mostra. De fet, durant la posada apunt de la tècnica d'immunofluorescència de la proteïna TRA98 com a marcador de cèl·lules germinals, realitzada en el treball de màster de Bryan Cárdenas Loachamín i desenvolupat en paral·lel a aquest projecte de tesi doctoral, el marcatge de TRA98 va ser òptim. Mitjançant aquest treball de màster es va observar que els espermatogonis-preleptotè inicial i les cèl·lules somàtiques presentaven uns patrons de DAPI i una morfologia distintius. Així doncs, aquests patrons de DAPI distintius es van utilitzar per tal d'identificar els espermatogonis-preleptotè inicial de manera inequívoca i poder descartar les cèl·lules somàtiques presents en la mostra -ja que també presenten absència de marcatge per les proteïnes SYCP3 i H1T (**Figura 4.1**).

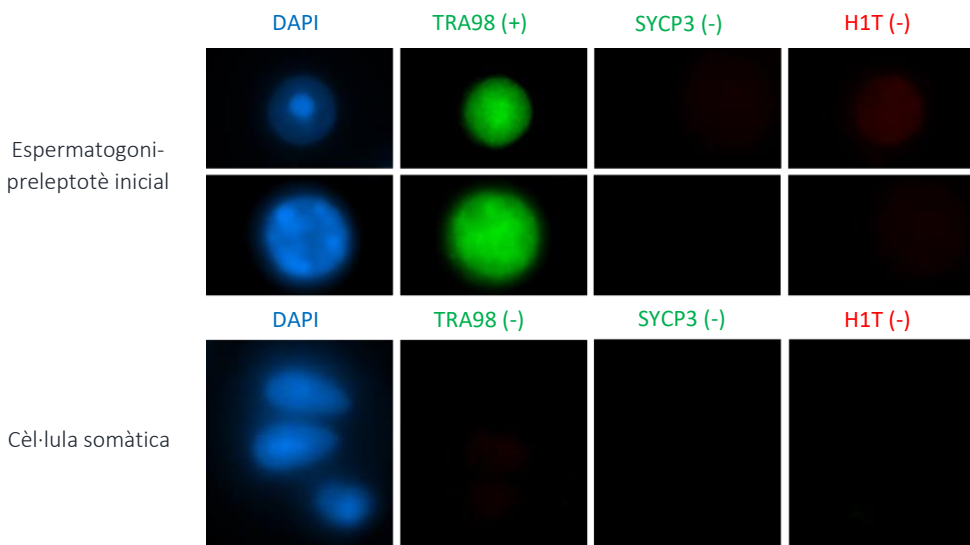


Figura 4.1 Estadis cel·lulars distingits mitjançant el marcatge resultant d'aplicar tècniques d'immunofluorescència per detectar les proteïnes TRA98, SYCP3 i H1T i la valoració morfològica del nucli mitjançant els diferents patrons de tinció amb DAPI.

Concretament, les cèl·lules a l'estadi d'espermatogoni-preleptotè inicial van mostrar dos tipus de patrons de morfologia i DAPI. Per una banda, cèl·lules amb una morfologia arrodonida molt definida amb la presència d'un únic cromocentre i, d'altra banda, cèl·lules amb una morfologia arrodonida i una tinció amb DAPI caracteritzada per ser molt brillant i per la presència de varis cromocentres. Les cèl·lules somàtiques, en canvi, es van caracteritzar per tenir una morfologia generalment allargada o poc definida, una mida petita i una tinció amb DAPI poc brillant amb la possible presència d'un cromocentre difús.

Anàlisi del volum cromosòmic

Cromosomes homòlegs junts

La mitjana de volum nuclear ocupat per cada parella de cromosomes homòlegs es detalla a la **Taula 4.5**. Els cromosomes que van mostrar una mitjana d'ocupació més elevada van ser l'Y, el 12, el 2 i 13 amb els percentatges 2,60 %, 2,63 % i 2,14 % i 2,14 %, respectivament. Els cromosomes que van mostrar una mitjana d'ocupació més baixa van ser el 19, el 15, el 9 i el 18 amb els percentatges 0,84 %, 1,18 %, 1,21 % i 1,21, respectivament.

Es va observar una correlació significativa entre la proporció de volum nuclear ocupada pels cromosomes homòlegs junts i la mida cromosòmica (correlació de Pearson; $r=0,4481$, $p=0,0416$) (**Figura 4.2**).

Cr.	N	\bar{x}	std	cv	mín	màx
1	44	1,85	1,29	69,69	0,34	6,03
2	42	2,14	1,37	63,82	0,13	5,85
3	48	2,07	1,13	54,75	0,07	4,58
4	45	1,96	1,22	62,17	0,31	5,79
5	36	2,23	1,66	74,38	0,27	8,24
6	35	1,84	1,21	65,46	0,25	4,96
7	45	2,04	1,37	67,30	0,47	6,09
8	35	1,87	1,62	86,67	0,14	7,80
9	31	1,21	0,83	68,92	0,26	3,34
10	36	1,82	1,26	69,25	0,18	6,74
11	30	1,62	1,32	81,53	0,24	5,42
12	30	2,63	2,25	85,73	0,10	11,41

13	32	2,14	1,72	80,48	0,65	8,02
14	47	1,83	1,43	78,09	0,09	6,30
15	30	1,18	0,91	77,09	0,28	4,05
16	42	1,48	1,40	94,95	0,25	6,79
17	26	1,31	1,06	80,73	0,01	3,88
18	18	1,21	0,82	67,88	0,34	3,10
19	24	0,84	0,55	66,33	0,04	2,52
X	25	1,72	0,89	51,80	0,24	3,77
Y	26	2,60	1,61	62,14	0,35	8,79

Taula 4.1 Proporció de volum nuclear ocupat pels cromosomes de *Mus musculus* en nuclis d'espermatogonispoteleptotè inicial. (**Cr**) cromosomes, (**N**) número d'observacions, (\bar{X}) mitjana de la proporció de volum nuclear ocupada per cromosoma, (**std**) desviació estàndard, (**cv**) coeficient de variació, (**min**) valor mínim i (**max**) valor màxim.

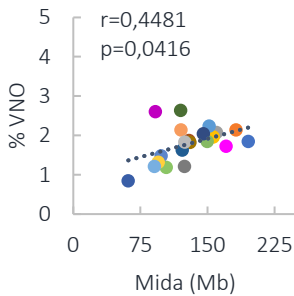


Figura 4.2 Gràfica de dispersió de la proporció de volum nuclear ocupada pels cromosomes en relació a la mida cromosòmica. L'eix Y indica el percentatge de volum nuclear ocupat (% VNO) i l'eix X la mida cromosòmica mesurada en mega bases (Mb). Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

Cromosomes homòlegs separats

La mitjana de volum nuclear ocupat per cada cromosoma en aquells casos en que s'observaven dos territoris cromosòmics separats per a cada un dels diferents cromosomes homòlegs es detalla a la

Taula 4.2. Els tres cromosomes que van mostrar una mitjana d'ocupació més elevada van ser l'1, el 13, i el 4 amb els percentatges 1,98 %, 1,68 % i 1,67 %, respectivament. Els cromosomes que van mostrar una mitjana d'ocupació més baixa van ser el 19, el 9 i el 17 amb els percentatges 0,38 %, 0,53 % i 0,56 %, respectivament.

Es va observar una correlació significativa entre la proporció de volum nuclear ocupada pels cromosomes homòlegs separats i la mida cromosòmica (correlació de Pearson; $r=0,5822$, $p=0,0056$) (**Figura 4.3**).

Cr.	N	\bar{x}	std	cv	min	max
1	19	1,98	1,58	79,90	0,32	6,04
2	13	1,09	0,48	44,06	0,34	1,92
3	14	1,21	0,60	49,69	0,12	2,34
4	19	1,67	0,96	57,62	0,13	4,32
5	20	0,78	0,52	66,42	0,22	2,62
6	14	1,11	0,53	47,47	0,59	2,03
7	20	0,91	0,63	68,46	0,29	2,89
8	12	0,97	0,85	87,51	0,08	3,21
9	14	0,53	0,33	62,74	0,06	1,18
10	14	1,21	0,80	66,33	0,20	2,80
11	5	1,08	0,54	49,83	0,25	1,51
12	11	1,23	0,68	55,11	0,41	2,67
13	9	1,68	1,50	89,28	0,11	4,03
14	16	1,28	0,59	46,64	0,15	2,27
15	12	0,64	0,38	59,11	0,11	1,25
16	11	1,16	1,06	91,65	0,33	3,99
17	9	0,56	0,47	83,52	0,09	1,46
18	11	0,78	0,47	59,50	0,17	1,71
19	2	0,38	0,01	3,53	0,37	0,39
X	10	1,62	0,99	61,56	0,17	3,40
Y	10	1,40	0,72	51,25	0,58	2,91

Taula 4.2 Proporció de volum nuclear ocupat pels cromosomes de *Mus musculus* en nuclis d'espermatogonís preletpotè inicial. (**Cr**) cromosomes, (**N**) número d'observacions, (\bar{x}) mitjana de la proporció de volum nuclear ocupada per cromosoma, (**std**) desviació estàndard, (**cv**) coeficient de variació, (**min**) valor mínim i (**max**) valor màxim.

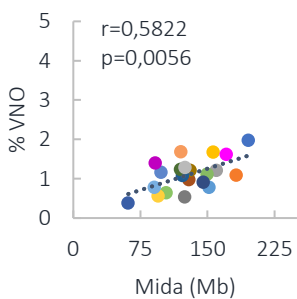


Figura 4.3 Representació gràfica de dispersió de la proporció de volum nuclear ocupada pels cromosomes en relació a la mida cromosòmica. L'eix Y indica el percentatge de volum nuclear ocupat (% VNO) i l'eix X la mida cromosòmica mesurada en mega bases (Mb). Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

Anàlisi de la distribució radial

Dades descriptives

Els resultats de la distribució radial dels cromosomes es detallen a la **Taula 4.3** i es representen gràficament a la **Figura 4.4**.

	N	%VC			Desv			T-test		
		Externa	Mitja	Interna	Externa	Mitja	Interna	E vs M	E vs I	M vs I
1	63	35,54	55,94	8,52	27,77	23,61	13,45	0,0247*	<,0001*	<,0001*
2	55	41,81	48,68	9,51	26,62	21,76	12,92	0,4681	<,0001*	<,0001*
3	62	46,26	47,40	6,34	26,31	22,07	11,24	0,8994	<,0001*	<,0001*
4	64	24,44	57,23	18,33	21,62	17,34	22,65	0,0002*	0,4088	0,0001*
5	56	22,30	66,40	11,30	17,18	15,55	14,53	<,0001*	0,0997	<,0001*
6	49	46,98	45,19	7,83	27,43	21,49	17,64	0,8557	<,0001*	0,0001*
7	65	16,68	59,92	23,40	17,52	20,44	22,49	<,0001*	0,388	0,0006*
8	47	28,42	58,45	13,12	25,72	21,23	17,1	0,0041*	0,0515	<,0001*
9	45	23,09	64,90	12,01	19,76	18,28	19,11	0,0001*	0,1463	<,0001*
10	50	44,70	46,01	9,29	26,72	21,57	13,67	0,8934	<,0001*	0,0002*
11	35	18,34	57,57	24,08	24,03	24,81	26,69	0,0009*	0,5944	0,0215*
12	41	39,13	49,45	11,42	29,47	23,02	16,46	0,3497	0,0009*	0,001*
13	41	23,21	57,11	19,68	22,71	14,7	19,95	0,0021*	0,708	0,0038*
14	63	34,63	53,18	12,19	25,1	20,96	19,21	0,0391*	0,001*	<,0001*
15	42	35,68	49,19	15,13	29,71	25,72	23,84	0,2098	0,0206*	0,004*
16	53	39,17	51,60	9,23	28,18	24,79	15,72	0,2072	<,0001*	<,0001*
17	35	35,40	49,04	15,56	27,1	21,36	20,39	0,2472	0,0432*	0,0102*
18	29	42,78	53,51	3,71	23,73	20,91	6,75	0,4213	<,0001*	<,0001*
19	26	27,16	56,77	16,07	28,43	24,35	20,83	0,0339*	0,3233	0,0093*
X	37	29,38	50,78	19,84	31,63	24,27	23,79	0,062*	0,3495	0,0207*
Y	39	37,69	45,34	16,96	32,43	28,21	22,34	0,5008	0,0362*	0,0255*
		32,99	53,51	13,50						

Taula 4.3 Distribució radial dels cromosomes al nucli dels espermatogonis-preletpotè inicial. S'indica (**N**) número de cromosomes analitzats, (**% VC**) mitjanes de percentatges de volum cromosòmic present en les zones **externa**, **mitja** i **interna** del nucli per a cada cromosoma, (**Desv**) desviació estàndard i (**E vs M**) el valor de p de la comparativa del % VC de la zona externa amb el % VC de la zona mitja, (**E vs I**) el valor de p de la comparativa del % VC de la zona externa amb el % VC de la zona interna. (**M vs I**) el valor de p de la comparativa del % VC de la zona mitja amb el % VC de la zona interna.

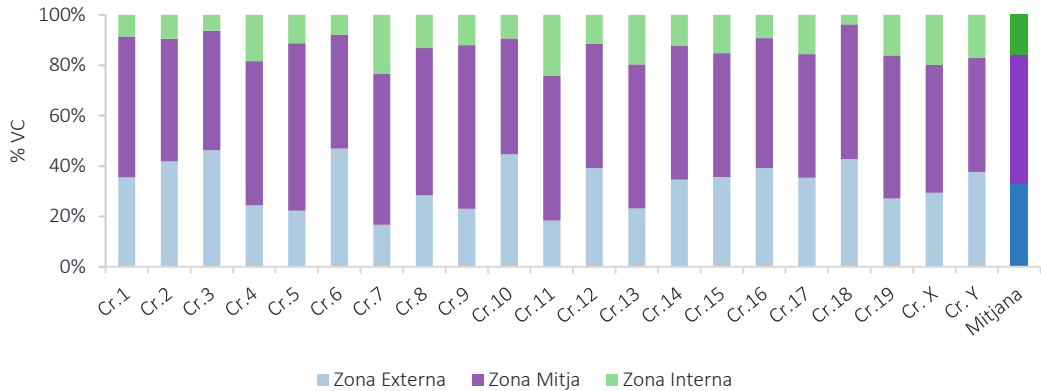


Figura 4.4 Representació gràfica de les mitjanes de percentatges de volum cromosòmic present en les zones externa, mitja i interna del nucli per a cada cromosoma en nuclis d'espermatogonis-preleptotè inicial.

La comparativa entre el volum cromosòmic present a la zona externa del nucli respecte el volum cromosòmic present a la zona interna (**Taula 4.10**) va revelar, de manera estadísticament significativa (T-test: $p < 0,05$), la presència de més volum cromosòmic a la zona externa del nucli en el cas dels cromosomes 1, 2, 3, 6, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18 i Y. No es va observar cap cas en que un cromosoma presentés més volum a la zona interna del nucli de manera estadísticament significativa (T-test: $p > 0,05$). En el cas dels cromosomes 4, 5, 7, 8, 9, 11, 13, 19 i X no es van observar diferències estadísticament significatives entre el volum present a la zona externa i el volum present a la zona interna (T-test: $p > 0,05$).

L'anàlisi d'agrupaments segons el patró de distribució del volum cromosòmic en les tres zones del nucli va determinar tres agrupacions de cromosomes (**Figura 4.5**): el grup A, format pels cromosomes 4, 5, 7, 8, 9, 11, 13 i 19 mostra un patró de distribució de volum cromosòmic marcat per una tendència a presentar més volum cromosòmic a la zona interna que la resta de cromosomes; el grup B, format pels cromosomes 3, 6 i 10 mostra un patró de distribució de volum cromosòmic marcat per una tendència a presentar més volum cromosòmic a la zona externa que la resta dels cromosomes; i finalment, el grup C, format pels cromosomes 1, 2, 12, 14, 15, 16, 17, 18, Y i X mostra un patró de distribució de volum cromosòmic marcat per una

tendència a presentar un volum a les tres zones similar a la mitjana global. Els resultats es representen gràficament a la **Figura 4.6**.

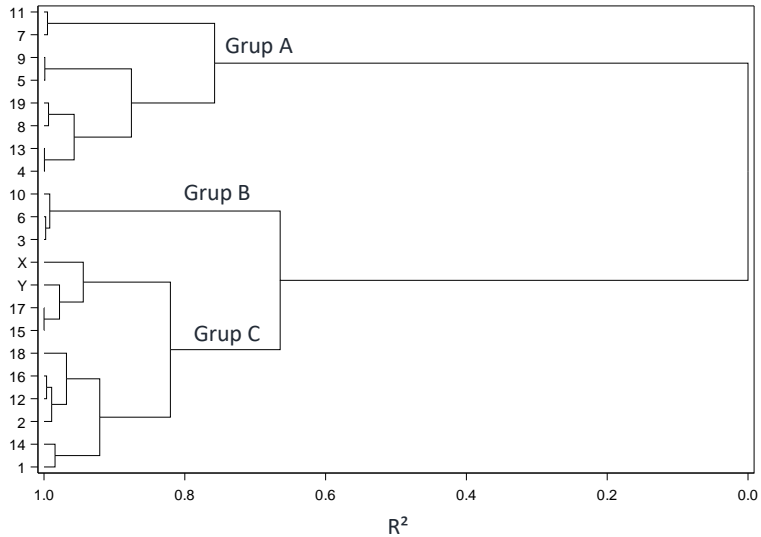


Figura 4.5 Anàlisi d'agrupaments dels cromosomes en funció de la similitud dels percentatges de volum cromosòmic present en les zones externa, mitja i interna del nucli per a cada cromosoma. A l'eix Y s'indica cadascun dels cromosomes analitzats i a l'eix X es representa el coeficient de determinació R^2 .

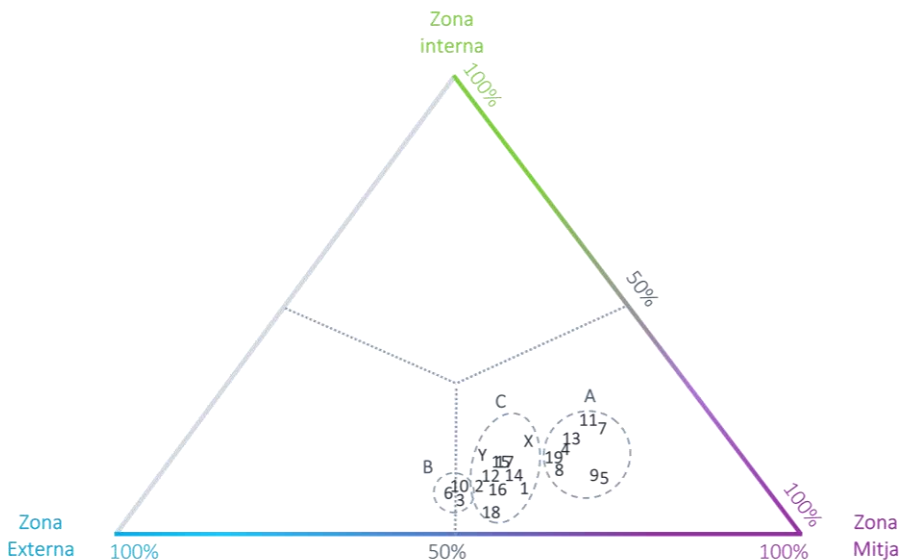


Figura 4.6 Representació gràfica de l'anàlisi d'agrupaments dels cromosomes en funció de la similitud dels percentatges de volum cromosòmic present en les zones **externa**, **mitja** i **interna** del nucli per a cada cromosoma.

Correlacions lineals

· Mida cromosòmica

No es va observar una correlació significativa entre la mida cromosòmica i el percentatge de volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = 0,0321$, $p = 0,8900$) a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,0784$, $p = 0,7356$) i a la zona interna (correlació de Pearson; $r = -0,0954$, $p = 0,6809$) (Figura 4.7).

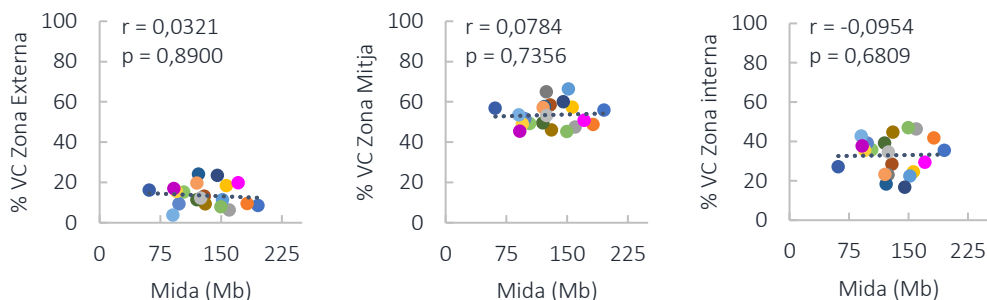


Figura 4.7 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació a la mida cromosòmica. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (% VC) i l'eix X la mida cromosòmica mesurada en mega bases (Mb). Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

· Contingut de GC

Es va observar una correlació significativa entre el contingut de GC dels cromosomes i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,5255$, $p = 0,0144$) i a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,6162$, $p = 0,0029$). No es va observar una correlació significativa entre el contingut de GC dels cromosomes i el volum cromosòmic present a la zona interna (correlació de Pearson; $r = 0,3124$, $p = 0,1680$). Concretament, els resultats van indicar

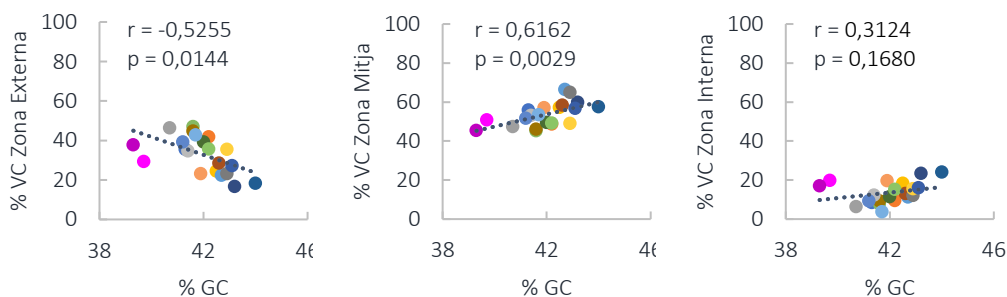
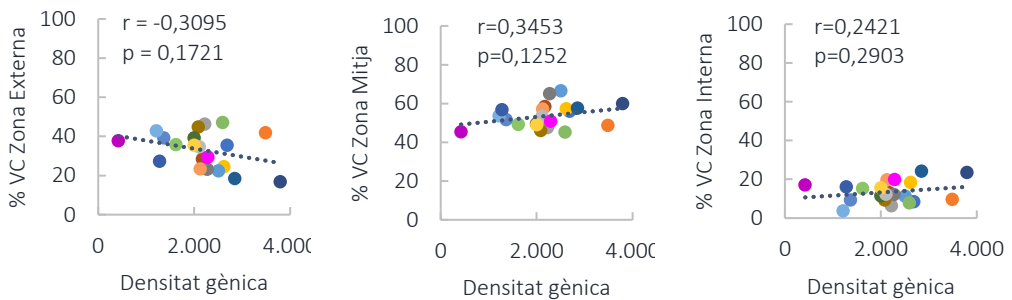


Figura 4.8 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació al contingut de GC dels cromosomes. (El peu de figura continua a la pàgina següent) →

← L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (% VC) i l'eix X el percentatge de GC. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

· Densitat gènica

No es va observar una correlació significativa entre la densitat gènica dels cromosomes i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,3095$, $p = 0,1721$), a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,3453$, $p = 0,1252$) i a la zona interna (correlació de Pearson; $r = 0,2421$, $p = 0,2903$) (Figura 4.9).



· Quantitat de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi

Es va observar una correlació significativa entre el contingut de gens implicats en el procés d'espermatogènesi i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,5275$, $p = 0,014$), a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,4576$, $p = 0,0037$) i també a la zona interna (correlació de Pearson; $r = 0,4574$, $p = 0,0371$) (Figura 4.10). Concretament, els cromosomes amb més contingut de gens implicats en el procés d'espermatogènesi presenten més volum a la zona interna del nucli i, en canvi, els cromosomes amb menys contingut de gens implicats en el procés d'espermatogènesi presenten més volum a la zona externa del nucli.

resultats van indicar que els cromosomes amb més contingut de gens implicats en el procés d'espermatogènesi presenten més volum a la zona interna del nucli i, en canvi, els cromosomes amb menys contingut de gens implicats en el procés d'espermatogènesi presenten més volum a la zona externa del nucli.

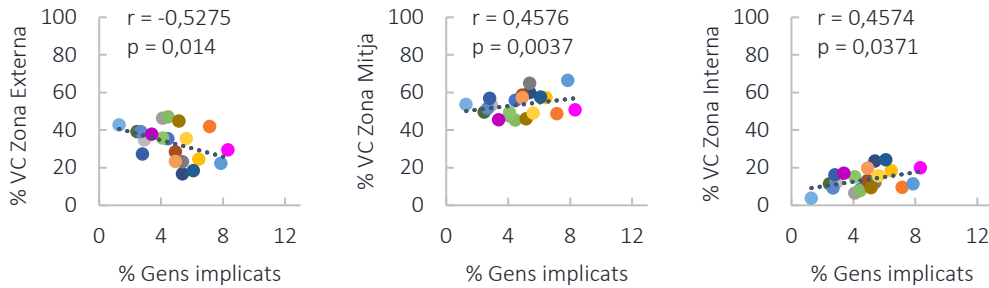


Figura 4.10 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació al contingut de GC dels cromosomes. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (% VC) i l'eix X el percentatge de gens implicats en el procés d'espermatogènesi. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

Anàlisi de la distribució relativa

Dades descriptives

El número de vegades que es va analitzar la presència o absència d'encavalcament per cada parella de cromosomes⁶ així com la freqüència d'encavalcament es detalla a la (Taula 4.4). Les parelles de cromosomes que van mostrar una freqüència més elevada d'encavalcament van ser: 1 i 18, 12 i 15, 15 i XY, 6 i 13 i XY i 17, amb una freqüència d'encavalcament de 0,80, 0,80, 0,80, 0,75 i 0,50, respectivament. D'altra banda, les parelles de cromosomes que van mostrar una freqüència d'encavalcament més baixa van ser: 8 i 9, 11 i 18, 1 i 19, 5 i 18, 5 i 13 i 10 i XY amb una freqüència d'encavalcament de 0, 0, 0, 0,91, 0,13 i 0,13 respectivament.

L'anàlisi d'agrupaments de cromosomes segons la similitud de freqüències d'encavalcament entre parelles de cromosomes va revelar quatre agrupacions de cromosomes: el grup A, format pels cromosomes 14, 17 i XY; el grup B, format pels cromosomes 12, 15 i 19; el grup C, format pels cromosomes 2, 3, 6, 9, 10, 13, 16 i 18; i el grup D, format pels cromosomes 1, 4, 5, 7, 8 i 11 (Figura 4.61).

⁶ Els cromosomes X i Y es van tractar com una unitat conjunta degut a la seva elevada freqüència d'encavalcament i a la inferència que aquest fet causaria en l'anàlisi del posicionament relatiu dels altres cromosomes.

2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	XY
0,42	0,24	0,56	0,58	0,42	0,41	0,58	0,43	0,25	0,67	0,14	0,59	0,49	0,37	0,36	0,25	0,80	0,00	0,28
26	0,40	0,39	0,39	0,42	0,47	0,39	0,23	0,38	0,40	0,14	0,38	0,44	0,41	0,41	0,44	0,36	0,50	0,38
17	15	0,28	0,40	0,57	0,36	0,54	0,29	0,39	0,19	0,65	0,31	0,44	0,25	0,50	0,67	0,38	0,67	0,47
54	28	18	0,43	0,32	0,50	0,50	0,57	0,29	0,67	0,33	0,47	0,47	0,33	0,27	0,35	0,33	0,25	0,67
26	54	15	28	0,42	0,44	0,35	0,21	0,18	0,20	0,29	0,13	0,52	0,56	0,18	0,39	0,09	0,33	0,50
24	24	14	25	24	0,21	0,43	0,38	0,25	0,36	0,29	0,75	0,28	0,28	0,55	0,23	0,43	0,30	0,50
17	17	59	18	18	14	0,69	0,29	0,29	0,63	0,53	0,31	0,50	0,36	0,35	0,67	0,20	0,42	0,59
24	23	13	24	23	47	13	0	0,25	0,62	0,39	0,25	0,42	0,24	0,30	0,31	0,43	0,44	0,25
7	13	14	7	14	8	17	8	0,33	0,70	0,27	0,43	0,14	0,33	0,31	0,33	0,48	0,40	0,25
8	16	18	7	17	8	21	8	45	0,40	0,42	0,71	0,29	0,20	0,26	0,50	0,59	0,60	0,13
6	5	16	6	5	14	16	13	10	10	0,54	0,57	0,33	0,50	0,46	0,33	0,00	0,40	0,57
7	7	17	6	7	14	17	13	11	12	35	0,20	0,17	0,80	0,39	0,33	0,33	0,69	0,20
17	8	16	17	8	4	16	4	7	7	7	10	0,53	0,40	0,46	0,25	0,40	0,50	0,61
53	27	18	57	27	25	18	24	7	7	6	6	17	0,48	0,53	0,55	0,33	0,25	0,44
19	42	12	21	41	18	14	17	12	15	4	5	5	21	0,21	0,54	0,36	0,60	0,80
14	17	50	15	17	11	52	10	16	19	13	13	13	15	14	0,44	0,30	0,46	0,36
20	18	9	20	18	35	9	35	6	6	9	9	4	20	13	9	0,20	0,50	0,75
5	11	8	6	11	7	10	7	29	29	6	6	5	6	11	10	5	0,40	0,60
3	6	12	4	6	10	12	9	5	5	25	26	8	4	5	11	8	5	0,38

Taula 4.4 Taula de recompte d'encavalcaments. A la part ombrejada amb tons blavosos s'indica la freqüència d'encavalcament entre totes les parelles de cromosomes. A la part sense ombrejat s'indica el número d'observacions realitzades per a cada parella de cromosomes.

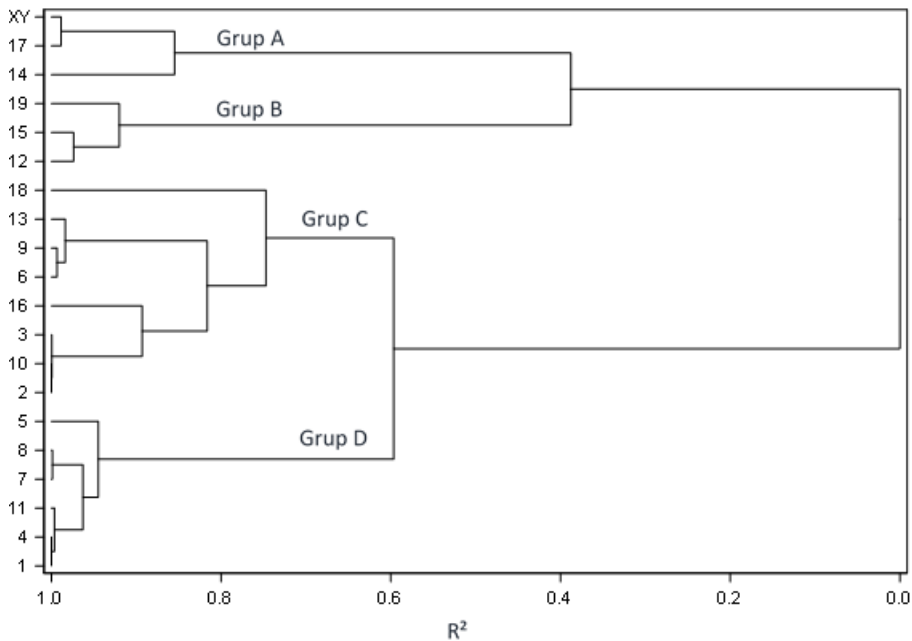


Figura 4.11 Anàlisi d'agrupaments dels cromosomes (El peu de figura continua a la pàgina següent) →

—► en funció de la similitud de les freqüències d'encavalcament entre parelles de cromosomes. A l'eix Y s'indica cadascun dels cromosomes analitzats i a l'eix X es representa el coeficient de determinació R^2 .

Comparativa d'agrupaments de cromosomes

- Mida

No es van observar diferències estadísticament significatives entre els grups A, B, C i D establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.11**) en relació a la mida dels cromosomes que els formen ($\bar{x}^A = 95,20$ Mb $\bar{x}^B = 117,09$ Mb, $\bar{x}^C = 132,07$ Mb, $\bar{x}^D = 150,12$ Mb) (ANOVA: $p = 0,0738$) (**Figura 4.12, I**).

- Contingut de GC

No es van observar diferències estadísticament significatives entre els grups A, B, C i D establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.11**) en relació al contingut de GC dels cromosomes que els formen ($\bar{x}^A = 42,43$ % de GC, $\bar{x}^B = 41,27$ % de GC, $\bar{x}^C = 41,73$ % de GC, $\bar{x}^D = 42,72$ % de GC) (ANOVA: $p = 0,1164$) (**Figura 4.12, II**).

- Densitat gènica

No es van observar diferències estadísticament significatives entre els grups A, B, C i D establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.11**) en relació a la densitat gènica dels cromosomes que els formen ($\bar{x}^A = 1635$ gens, $\bar{x}^B = 1824,33$ gens, $\bar{x}^C = 2173,38$ gens, $\bar{x}^D = 2773,83$ gens) (ANOVA: $p = 0,0521$) (**Figura 4.12, III**).

- Gens implicats en el procés d'espermatogènesi

No es van observar diferències estadísticament significatives entre els grups A, B, C i D establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.11**) en relació al percentatge de gens implicats en el procés d'espermatogènesi ($\bar{x}^A = 3,12$ % de gens, $\bar{x}^B = 4,81$ % de gens, $\bar{x}^C = 4,40$ % de gens, $\bar{x}^D = 5,86$ % de gens) (ANOVA: $p = 0,1058$) (**Figura 4.12, IV**).



Figura 4.12 Representació gràfica de la comparativa entre grups de cromosomes establerts per l'anàlisi d'agrupaments en relació als següents paràmetres cromosòmics: (I) mida, (II) contingut de GC, (III) densitat gènica i (IV) gens implicats en el procés de l'espermatogènesi.

Anàlisi de l'encavalcament de cromosomes amb regions NOR

No es van observar diferències estadísticament significatives entre la freqüència de solapaments de cromosomes que contenen regions NOR i cromosomes que no en contenen i la freqüència de solapament de parelles de cromosomes que ambdós contenen regions NOR (Test d'efectes fixes: $p=0,7041$) (Figura 4.13).

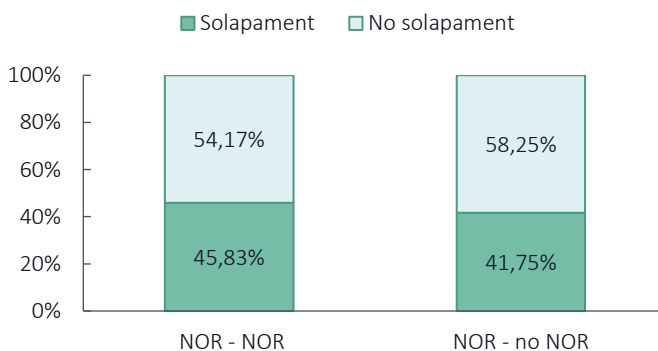


Figura 4.13 Gràfica de la mitjana d'absència i presència de solapament entre cromosomes que contenen NOR amb cromosomes que també contenen NOR (NOR-NOR) i entre cromosomes que contenen NOR i cromosomes que no contenen NOR (NOR - no NOR).

ESPERMATÒCITS I A L'ESTADI DE PRELEPTOTÈ MITJÀ-ZIGOTÈ

Es van capturar i analitzar un total de 1013 territoris cromosòmics d'un total de 92 nuclis identificats com a espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè. Aquests nuclis van presentar un marcatge positiu per la proteïna SYCP3 en forma de punts i/o filaments no definits, un marcatge negatiu per la histona H1T i una tinció amb DAPI caracteritzada per la presència de d'un o varis cromocentres i una morfologia arrodonida (**Figura 4.12**).

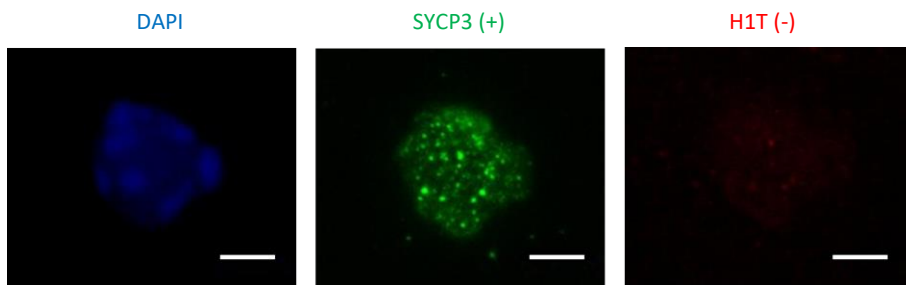


Figura 4.14 Espermatòcit I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè identificat mitjançant el patró de marcatge resultant d'aplicar tècniques d'immunofluorescència per detectar les proteïnes SYCP3 i H1T i la valoració morfològica del nucli mitjançant la tinció amb DAPI. La barra d'escala equival a 5µm.

Anàlisi de volum cromosòmic

Cromosomes homòlegs junts

La mitjana de percentatge de volum nuclear ocupat per cada parella de cromosomes homòlegs es detalla a la **Taula 4.5**. Els cromosomes que van mostrar una mitjana d'ocupació més elevada van ser el 3, el 2 i el 12 amb els percentatges 3,66 %, 3,59 % i 3,02 %, respectivament. Els cromosomes que van mostrar una mitjana d'ocupació més baixa van ser el 15, el 19 i el 17 amb els percentatges 1,36 %, 1,38 % i 1,53 %, respectivament.

Es va observar una correlació significativa entre la proporció de volum nuclear ocupada pels cromosomes homòlegs junts i la mida cromosòmica (correlació de Pearson; $r = 0,7573$, $p = <0,0001$) (**Figura 4.13**).

Cr.	N	\bar{x}	std	cv	min	max
1	43	2,44	1,82	74,72	0,18	7,41
2	34	3,59	2,28	63,52	0,63	8,42
3	39	3,66	1,81	49,46	0,81	10,93
4	47	3,00	2,57	85,73	0,25	11,41
5	37	2,47	1,60	64,65	0,46	7,56
6	41	2,76	1,54	55,96	0,34	6,07
7	38	2,74	1,61	58,65	0,28	8,05
8	36	1,97	0,87	44,32	0,34	3,96
9	41	1,91	1,15	60,38	0,43	5,74
10	42	2,91	2,03	69,76	0,46	8,10
11	47	1,87	1,23	65,84	0,02	5,22
12	47	3,02	1,73	57,12	0,23	10,82
13	39	2,44	2,22	91,08	0,33	9,51
14	52	2,29	2,06	90,18	0,02	10,13
15	29	1,36	1,09	80,13	0,03	4,76
16	37	2,07	1,51	72,68	0,05	6,48
17	32	1,53	1,29	84,24	0,06	6,80
18	40	1,68	1,41	84,09	0,08	7,20
19	44	1,38	1,15	83,64	0,11	5,75
X	44	2,84	3,61	126,97	0,59	24,25
Y	48	1,86	1,70	91,89	0,05	8,14

Taula 4.5 Proporció de volum nuclear ocupat pels cromosomes de *Mus musculus* en nuclis d'espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè. (**Cr**) cromosomes, (**N**) número d'observacions, (\bar{x}) mitjana de la proporció de volum nuclear ocupada per cromosoma, (**std**) desviació estàndard, (**cv**) coeficient de variació, (**min**) valor mínim i (**max**) valor màxim.

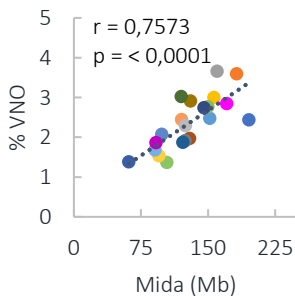


Figura 4.15 Gràfica de dispersió de la proporció de volum nuclear ocupada pels cromosomes homòlegs junts en relació a la mida cromosòmica. L'eix Y indica el percentatge de volum nuclear ocupat (% VNO) i l'eix X la mida cromosòmica mesurada en mega bases (Mb). Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

Cromosomes homòlegs separats

La mitjana de percentatge de volum nuclear ocupat per cada cromosoma homòleg separat es detalla a la . Els tres cromosomes que van mostrar una mitjana d'ocupació més elevada van ser l'Y, l'1, i el 7 amb els percentatges 2,02 %, 1,94 % i 1,76 %, respectivament. Els cromosomes que van mostrar una mitjana d'ocupació més baixa van ser el 13, el 8 i el 9 amb els percentatges 0,65 %, 0,78 % i 0,86 %, respectivament.

No es va observar una correlació significativa entre la proporció de volum nuclear ocupada pels cromosomes homòlegs separats i la mida cromosòmica (correlació de Pearson; $r=0,0614$, $p=0,7915$) (Figura 4.16).

Cr.	N	\bar{x}	std	cv	min	max
1	28	1,94	1,79	92,12	0,16	5,98
2	10	1,24	1,31	105,42	0,37	4,80
3	22	1,22	0,82	67,24	0,33	3,30
4	24	1,22	0,78	63,81	0,27	2,68
5	8	0,94	0,58	61,33	0,26	1,79
6	14	1,76	1,10	62,21	0,53	4,23
7	22	1,76	0,99	56,22	0,39	4,37
8	16	0,78	0,55	70,60	0,05	2,41
9	16	0,86	0,60	69,10	0,22	2,31
10	22	1,70	0,91	53,64	0,48	3,27
11	8	1,22	0,57	46,54	0,56	2,24
12	8	1,58	1,00	63,59	0,73	3,69
13	24	0,65	0,35	52,93	0,18	1,38
14	14	1,08	0,58	53,53	0,13	1,86
15	8	0,99	0,64	65,08	0,08	1,89
16	20	1,59	1,00	63,09	0,08	2,93
17	8	1,00	0,39	39,38	0,60	1,84
18	20	1,18	0,66	56,10	0,12	2,35
19	2	1,46	0,58	39,87	1,05	1,88
X	4	1,05	0,80	75,68	0,12	2,57
Y	4	2,02	1,71	84,67	0,11	4,26

Taula 4.6 Resum descriptiu de les dades de proporció de volum nuclear ocupat dels cromosomes de cariotip de ratolí *Musc musculus*. (**Cr**) cromosomes, (**N**) número d'observacions, (**\bar{X}**) mitjana de la proporció de volum nuclear ocupada per cromosoma, (**std**) desviació estàndard, (**cv**) coeficient de variació, (**min**) valor mínim i (**max**) valor màxim

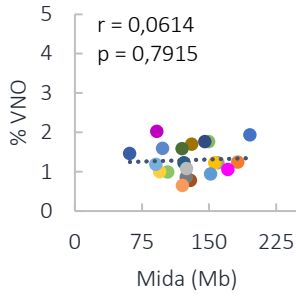


Figura 4.16 Gràfica de dispersió de la proporció de volum nuclear ocupada pels cromosomes homòlegs separats en relació a la mida cromosòmica. L'eix Y indica el percentatge de volum nuclear ocupat (% VNO) i l'eix X la mida cromosòmica mesurada en mega bases (Mb). Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

Anàlisi de la distribució radial

Dades descriptives

Els resultats de la distribució radial dels cromosomes es detallen a la **Taula 4.7** i són gràficament representats a la **Figura 4.17**.

	N	%VC			Desv			T-test		
		Externa	Mitja	Interna	Externa	Mitja	Interna	E vs M	E vs I	M vs I
1	70	33,34	49,82	16,84	30,43	21,89	22,07	0,0478*	0,0196*	0,0004*
2	44	30,31	52,15	17,54	26,25	18,27	18,96	0,0388*	0,1540	0,0039*
3	61	50,33	44,42	5,25	25,92	21,17	9,96	0,5013	<,0001*	<,0001*
4	71	28,2	54,71	17,1	23,35	17,95	21,86	0,0016*	0,1104	<,0001*
5	45	20,62	58,79	20,59	19,68	16,87	20,32	0,0003*	0,9975	0,0022*
6	55	38,8	50,62	10,58	27,09	19,55	15,06	0,2136	<,0001*	<,0001*
7	61	29,58	56,39	14,03	21	16,21	19,4	0,0033*	0,0278*	<,0001*
8	52	30,77	56,74	12,48	24,75	19,85	20,47	0,0089*	0,0137*	<,0001*
9	58	21,37	61,66	16,97	20,85	17,97	21,75	<,0001*	0,5564	<,0001*
10	64	38,86	50,36	10,78	27,93	21,36	15,12	0,1912	<,0001*	<,0001*
11	55	17,89	64,86	17,25	20,1	19,54	17,63	<,0001*	0,9327	<,0001*
12	55	45,51	46,37	8,12	25,92	19,46	12,76	0,9270	<,0001*	<,0001*
13	63	18,2	64,81	16,99	20,21	19,31	20,78	<,0001*	0,8641	<,0001*
14	66	45,77	41,76	12,48	31,86	22,17	21,44	0,6289	<,0001*	0,0009*
15	36	41,52	43,97	14,51	33,38	24,75	25,24	0,8293	0,0047*	0,0172*
16	57	52,47	39,3	8,23	29,1	21,76	16,44	0,1342	<,0001*	0,0004*
17	40	45,71	45,41	8,88	30,15	24,71	15,62	0,9780	<,0001*	0,0009*
18	61	43,63	46,3	10,07	30,84	24,52	17,82	0,7625	<,0001*	<,0001*
19	47	37,83	48,96	13,21	34,03	27,65	21,5	0,2743	0,0023*	0,0010*
X	56	50,76	39,84	9,4	33,65	23,89	15,19	0,2200	<,0001*	0,0007*
Y	52	57	32,9	10,1	34,68	24,58	19,39	0,0058*	<,0001*	0,0113*
		37,07	50,01	12,92						

Taula 4.7 Distribució radial dels cromosomes al nucli dels espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè. (El peu de figura continua a la pàgina següent) →

← S'indica (**N**) número de cromosomes analitzats, (**% VC**) mitjanes de percentatges de volum cromosòmic present en les zones **externa**, **mitja** i **interna** del nucli per a cada cromosoma, (**Desv**) desviació estàndard i (**E vs M**) el valor de p de la comparativa del % VC de la zona externa amb el % VC de la zona mitja, (**E vs I**) el valor de p de la comparativa del % VC de la zona externa amb el % VC de la zona interna. (**M vs I**) el valor de p de la comparativa del % VC de la zona mitja amb el % VC de la zona interna.

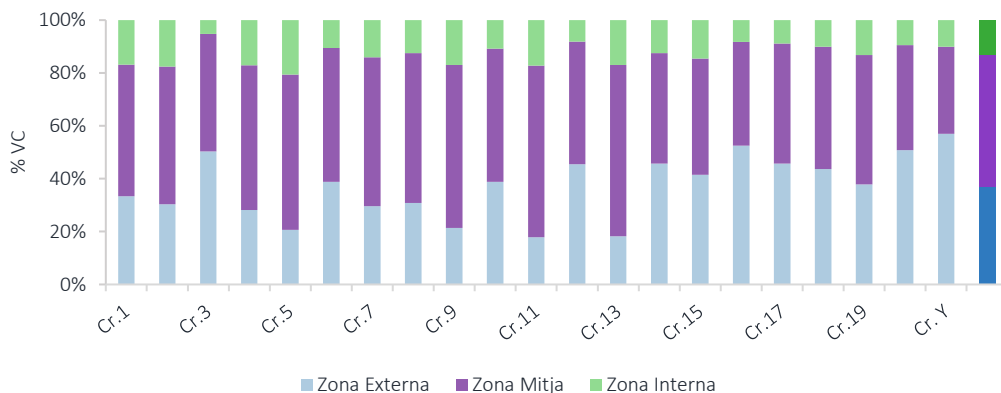


Figura 4.17 Representació gràfica de les mitjanes de percentatges de volum cromosòmic present en les zones externa, mitja i interna del nucli per a cada cromosoma en els nuclis dels espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè.

La comparativa entre el volum cromosòmic present a la zona externa del nucli respecte el volum cromosòmic present a la zona interna (**Taula 4.7**) va revelar, de manera estadísticament significativa (T-test: $p < 0,05$), la presència de més volum cromosòmic a la zona externa del nucli en el cas dels cromosomes 1, 3, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X, i Y. No es va observar cap cas en que un cromosoma presentés més volum a la zona interna del nucli de manera estadísticament significativa (T-test: $p > 0,05$). En el cas dels cromosomes 2, 4, 5, 9, 11 i 13 no es van observar diferències estadísticament significatives (T-test: $p > 0,05$).

L'anàlisi d'agrupaments de cromosomes segons el patró de distribució del volum cromosòmic en les tres zones del nucli va determinar tres agrupacions de cromosomes (**Figura 4.18**): el grup A, format pels cromosomes 3, 6, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y mostra un patró de distribució de volum cromosòmic marcat per una tendència a presentar més volum cromosòmic a la zona externa; el grup B, format pels cromosomes 5, 9, 11 i 13 mostra un patró de distribució de volum cromosòmic marcat per una tendència a presentar més volum cromosòmic a la zona interna; i finalment, el grup C, format pels cromosomes 1, 2, 4, 7 i 8 mostra un patró de distribució de

volum cromosòmic marcat per una tendència a presentar un volum a les tres zones similar a la mitjana global. Els resultats es representen gràficament a la **Figura 4.19**.

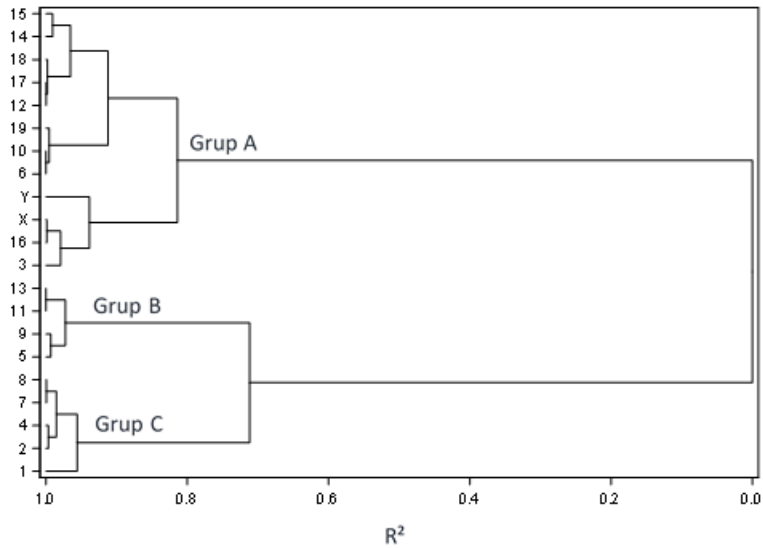


Figura 4.18 Resultats de l'anàlisi d'agrupaments dels cromosomes en funció de la similitud dels percentatges de volum cromosòmic present en les zones externa, mitja i interna del nucli per a cada cromosoma. A l'eix Y s'indica cadascun dels cromosomes analitzats i a l'eix X es representa el coeficient de determinació R^2 .

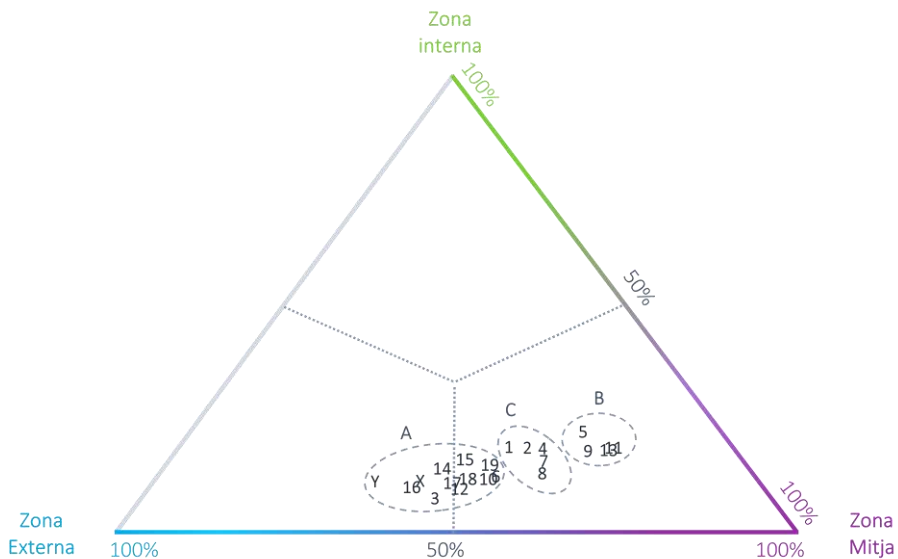


Figura 4.19 Representació gràfica de l'anàlisi d'agrupaments dels cromosomes en funció de la similitud dels percentatges de volum cromosòmic present en les zones externa, mitja i interna del nucli per a cada cromosoma.

Correlacions lineals

- Mida cromosòmica

No es va observar una correlació significativa entre la mida cromosòmica i el percentatge de volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,2542$, $p = 0,2661$) a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,2141$, $p = 0,3515$) i a la zona interna (correlació de Pearson; $r = 0,2862$, $p = 0,2084$) (Figura 4.20).

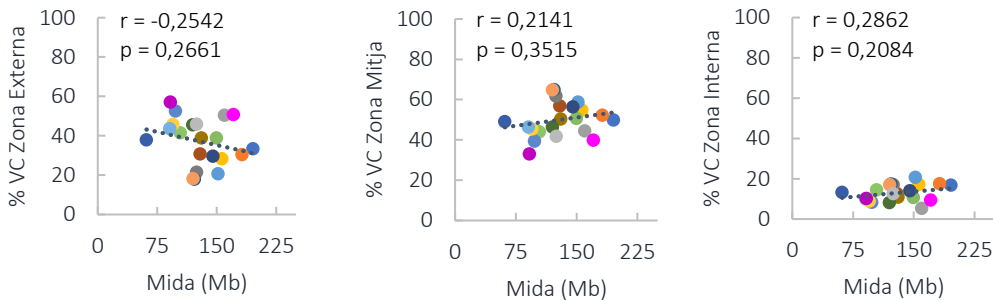


Figura 4.20 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació a la mida cromosòmica. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (% VC) i l'eix X la mida cromosòmica mesurada en mega bases (Mb). Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

- Contingut de GC

Es va observar una correlació significativa entre el contingut de GC dels cromosomes i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,7226$, $p = 0,0002$) i a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,7454$, $p = 0,0001$). No es va observar una correlació significativa entre el contingut de GC dels cromosomes i el volum cromosòmic present a la zona interna (correlació de Pearson; $r = 0,5241$, $p = 0,0147$). Concretament, els resultats van indicar que els cromosomes que contenen menys GC presenten més volum a la zona externa i els cromosomes que contenen més GC presenten més volum a la zona mitja (Figura 4.21).

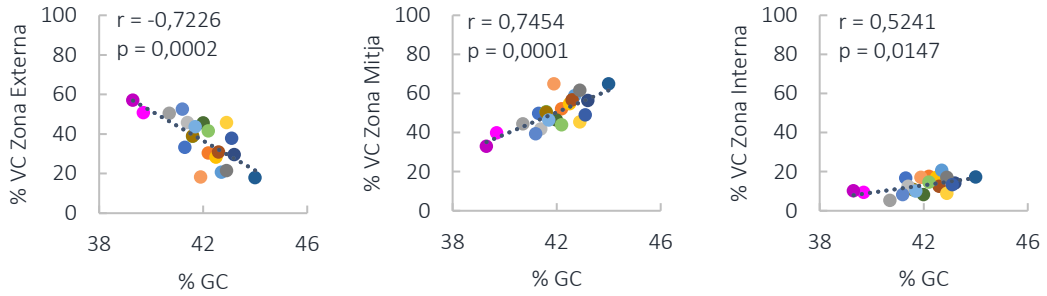


Figura 4.21 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació al contingut de GC dels cromosomes. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (% VC) i l'eix X el percentatge de GC. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

· Densitat gènica

Es va observar una correlació significativa entre la densitat gènica dels cromosomes i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,6688$, $p = 0,0009$), a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,6279$, $p = 0,0023$) i a la zona interna (correlació de Pearson; $r = -0,5449$, $p = 0,0106$) (**Figura 4.22**). Concretament, els resultats van indicar que els cromosomes que contenen més gens presenten més volum a la zona interna i els cromosomes que contenen menys gens presenten més volum a la zona externa.

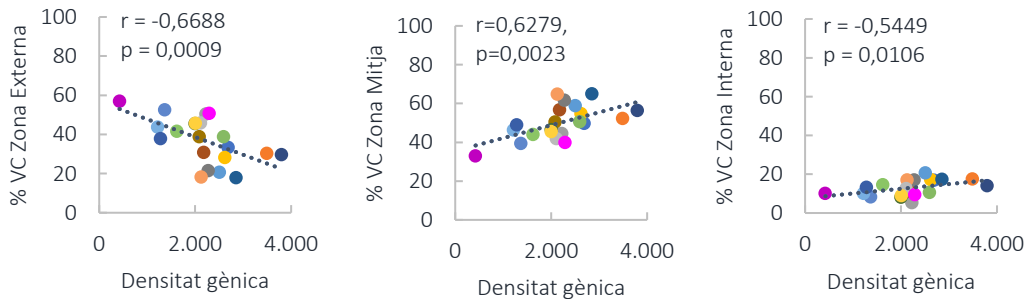


Figura 4.22 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació al contingut de GC dels cromosomes. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (% VC) i l'eix X el nombre de gens de cada cromosoma. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

- Quantitat de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi

Es va observar una correlació significativa entre el contingut de gens implicats en el procés d'espermatogènesi i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,2400$, $p = <0,0001$), a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,18621$, $p = <0,0001$ i també a la zona interna (correlació de Pearson; $r = 0,1506$, $p = <0,0001$) (**Figura 4.23**). Concretament, els resultats van indicar que els cromosomes amb més contingut de gens implicats en el procés d'espermatogènesi presenten més volum a la zona interna del nucli i, en canvi, els cromosomes amb menys contingut de gens implicats en el procés d'espermatogènesi presenten més volum a la zona externa del nucli.

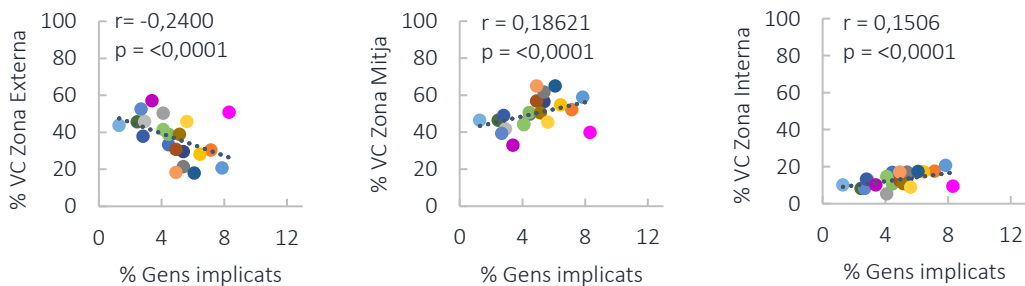


Figura 4.23 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació al contingut de GC dels cromosomes. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (% VC) i l'eix X el percentatge de gens implicats en el procés d'espermatogènesi. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

Anàlisi de la distribució relativa

Dades descriptives

El número de vegades que es va analitzar la presència o absència d'encavalcament per cada parella de cromosomes⁷ així com la freqüència d'encavalcament es detalla a la (**Taula 4.8**). Les parelles de cromosomes que van mostrar una freqüència més elevada d'encavalcament van ser: 2 i 12, 5 i 7, 2 i 5, 2 i 9 i 1 i 2. amb una freqüència d'encavalcament de 0,73, 0,73, 0,72, 0,71 i 0,66, respectivament. D'altra banda, les parelles de cromosomes que van mostrar una freqüència

⁷ Els cromosomes X i Y es van tractar com una unitat conjunta degut a la seva elevada freqüència d'encavalcament i a la inferència que aquest fet causaria en l'anàlisi del posicionament relatiu dels altres cromosomes.

d'encavalcament més baixa van ser: 8 i 4, 12 i 15, 13 i 8, 15 i 14, 12 i 17 i 15 i 19 amb una freqüència d'encavalcament de 0, 0, 0, 14, 0, 14, 0, 14 i 0,14, respectivament.

Cr.	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	XY
1	0,66	0,41	0,39	0,64	0,50	0,22	0,50	0,53	0,48	0,52	0,39	0,29	0,57	0,29	0,15	0,37	0,46	0,37	0,43
2	29	0,40	0,48	0,72	0,46	0,50	0,50	0,71	0,57	0,58	0,73	0,33	0,46	0,55	0,38	0,60	0,20	0,36	0,56
3	34	10	0,34	0,22	0,54	0,30	0,62	0,21	0,40	0,36	0,50	0,36	0,26	0,44	0,33	0,29	0,46	0,40	0,38
4	87	25	41	0,46	0,46	0,38	0,00	0,56	0,44	0,62	0,48	0,47	0,38	0,60	0,41	0,44	0,46	0,47	0,46
5	28	47	9	24	0,57	0,73	0,60	0,57	0,29	0,43	0,62	0,27	0,46	0,21	0,13	0,43	0,57	0,46	0,18
6	24	24	13	22	21	0,29	0,50	0,19	0,44	0,46	0,57	0,17	0,50	0,28	0,50	0,41	0,28	0,33	0,40
7	32	12	76	40	11	14	0,50	0,27	0,31	0,36	0,50	0,47	0,27	0,18	0,32	0,57	0,46	0,22	0,41
8	18	16	13	14	15	62	14	0	0,39	0,39	0,29	0,14	0,46	0,46	0,25	0,39	0,20	0,33	0,33
9	19	7	14	18	7	26	15	29	0,40	0,50	0,57	0,27	0,53	0,29	0,30	0,50	0,36	0,52	0,20
10	25	7	15	23	7	25	16	26	75	0,40	0,43	0,30	0,48	0,43	0,50	0,38	0,44	0,42	0,25
11	23	12	11	21	14	13	11	13	24	30	0,53	0,29	0,48	0,25	0,40	0,33	0,39	0,55	0,29
12	23	11	12	21	13	14	12	14	23	30	61	0,46	0,38	0,00	0,46	0,14	0,33	0,47	0,23
13	28	9	39	34	11	24	32	29	30	27	14	13	0,18	0,20	0,39	0,24	0,39	0,36	0,42
14	79	24	38	80	24	18	34	13	17	23	21	21	34	0,14	0,22	0,39	0,29	0,33	0,21
15	24	40	9	20	42	18	11	13	7	7	8	7	5	21	0,50	0,33	0,57	0,14	0,60
16	34	8	73	42	8	12	74	12	10	10	10	11	36	37	8	0,29	0,50	0,22	0,35
17	19	15	7	16	14	49	7	49	22	21	6	7	21	13	12	7	0,50	0,17	0,38
18	24	5	11	22	7	25	13	25	70	77	31	30	26	21	7	8	20	0,35	0,33
19	19	11	10	19	11	9	9	9	21	26	51	51	11	18	7	9	6	26	0,18

Taula 4.8 Taula de freqüències i d'observacions d'encavalcaments entre cromosomes als nuclis dels espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè. A la part superior i amb tons blavosos s'indica la freqüència d'encavalcament entre totes les parelles de cromosomes. A la part inferior s'indica el número d'observacions realitzades per a cada parella de cromosomes.

L'anàlisi d'agrupaments de cromosomes segons la similitud de freqüències d'encavalcament entre parelles de cromosomes va revelar quatre agrupacions de cromosomes: el grup A, format pels cromosomes 15 i XY; el grup B, format pels cromosomes 13, 16 i 18; el grup C, format pels cromosomes 4, 9, 11, 12, 14 i 19; i el grup D, format pels cromosomes 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10 i 17 (Figura 4.24).

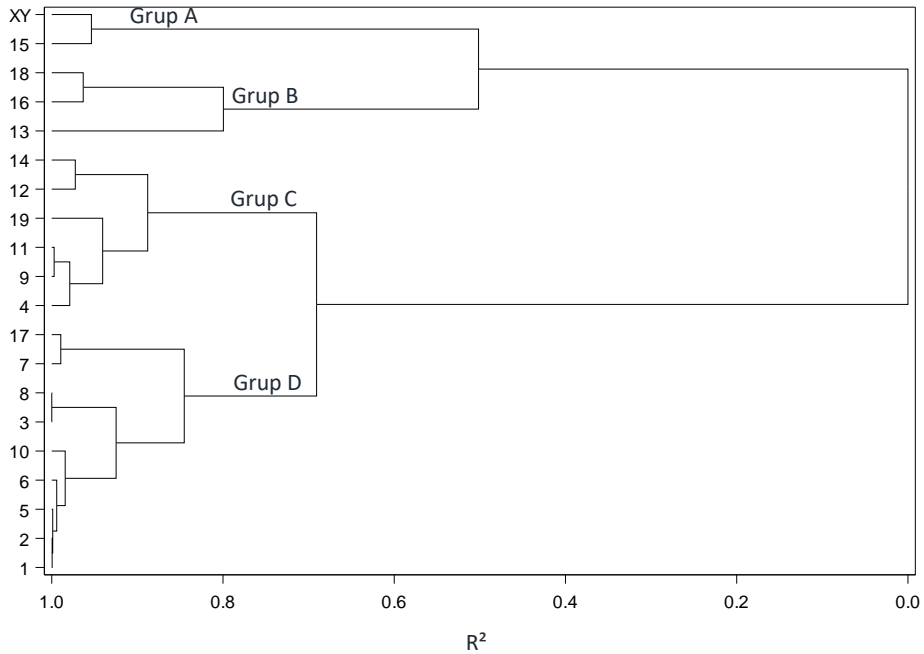


Figura 4.24 Anàlisi d'agrupaments dels cromosomes en funció de la similitud de les freqüències d'encavalcament entre parelles de cromosomes. A l'eix Y s'indica cadascun dels cromosomes analitzats i a l'eix X es representa el coeficient de determinació R².

Comparativa d'agrupaments de cromosomes

- Mida

No es van observar diferències estadísticament significatives entre els grups A, B, C i D establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.24**) en relació a la mida dels cromosomes que els formen ($\bar{X}^A = 117,71$ Mb $\bar{X}^B = 103,11$ Mb, $\bar{X}^C = 118,28$ Mb, $\bar{X}^D = 158,86$ Mb) (ANOVA: $p = 0,0782$) (**Figura 4.12, I**).

- Contingut de GC

No es van observar diferències estadísticament significatives entre els grups A, B, C i D establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.24**) en relació al contingut de GC dels cromosomes que els formen ($\bar{X}^A = 40,85$ % de GC, $\bar{X}^B = 41,60$ % de GC, $\bar{X}^C = 42,65$ % de GC, $\bar{X}^D = 42,09$ % de GC) (ANOVA: $p = 0,1248$) (**Figura 4.25, I**).

- Densitat gènica

Es van observar diferències estadísticament significatives entre els grups A, B, C i D establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.24**) en relació a la densitat gènica dels cromosomes que els formen ($\bar{x}^A = 1488,50$ gens, $\bar{x}^B = 1570,67$ gens, $\bar{x}^C = 2191$ gens, $\bar{x}^D = 2619,22$ gens) (ANOVA: $p = 0,0292$) (**Figura 4.25, III**).

- Gens implicats en el procés d'espermatogènesi

No es van observar diferències estadísticament significatives entre els grups A, B, C i D establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.24**) en relació al percentatge de gens implicats en el procés d'espermatogènesi ($\bar{x}^A = 4,98$ % de gens, $\bar{x}^B = 2,97$ % de gens, $\bar{x}^C = 4,36$ % de gens, $\bar{x}^D = 5,46$ % de gens) (ANOVA: $p = 0,1367$) (**Figura 4.25, IV**).

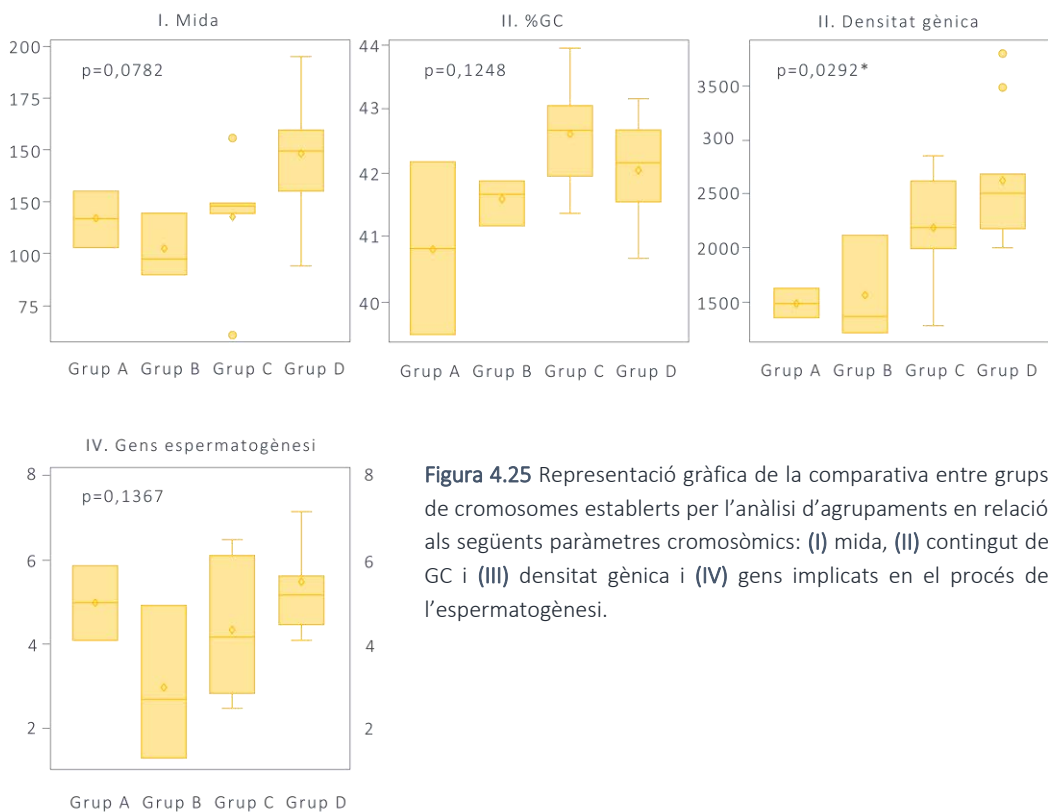


Figura 4.25 Representació gràfica de la comparativa entre grups de cromosomes establerts per l'anàlisi d'agrupaments en relació als següents paràmetres cromosòmics: (I) mida, (II) contingut de GC i (III) densitat gènica i (IV) gens implicats en el procés de l'espermatogènesi.

Anàlisi de l'encavalcament de cromosomes amb regions NOR

No es van observar diferències estadísticament significatives entre la freqüència de solapaments de cromosomes que contenen regions NOR i cromosomes que no en contenen i la freqüència de solapament de parelles de cromosomes que ambdós contenen regions NOR (Test d'efectes fixes: $p=0,081$) (Figura 4.26).

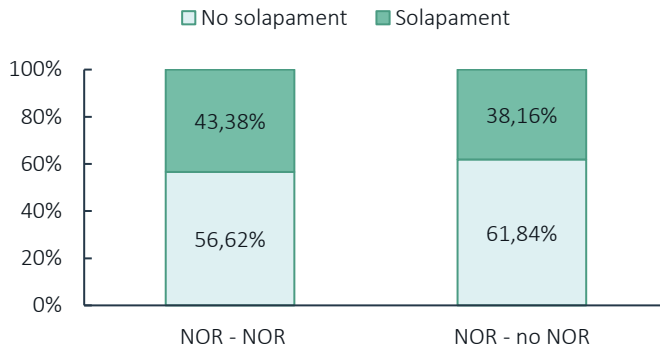


Figura 4.26 Representació gràfica de la mitjana d'absència i presència de solapament entre cromosomes que contenen NOR amb cromosomes que també contenen NOR (NOR-NOR) i entre cromosomes que contenen NOR i cromosomes que no contenen NOR (NOR-no NOR).

ESPERMATÒCITS I A L'ESTADI DE PAQUITÈ

Es van capturar i analitzar un total de 1098 territoris cromosòmics d'un total de 154 nuclis de cèl·lules identificades com a espermatòcits I a l'estadi de paquitè. Aquests nuclis van presentar un marcatge positiu per la proteïna SYCP3 en forma de filaments, un marcatge negatiu (paquitè primerenc) o positiu (paquitè tardà) per la histona H1T i una tinció amb DAPI caracteritzada per la presència de varis cromocentres i una morfologia nuclear arrodonida (Figura 4.27).

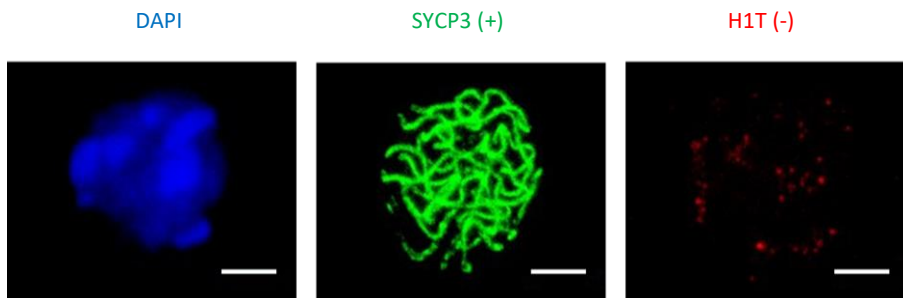


Figura 4.27 Espermatòcit I a l'estadi de paquitè primerenc identificat mitjançant el patró de marcatge resultant d'aplicar tècniques d'immunofluorescència per detectar les proteïnes SYCP3 i H1T i la valoració morfològica del nucli mitjançant la tinció amb DAPI. La barra d'escala equival a $5\mu\text{m}$.

Anàlisi del volum cromosòmic

La mitjana de percentatge de volum nuclear ocupat per cada cromosoma es detalla a la **Taula 4.9**. Els tres cromosomes que van mostrar una mitjana d'ocupació més elevada van ser el 2, el 7 i el 3 amb els percentatges 3,19 %, 3,11 % i 3,09 %, respectivament. Els cromosomes que van mostrar una mitjana d'ocupació més baixa van ser el 19, el 17 i el 18 amb els percentatges 1,28 %, 1,31 % i 1,63 %, respectivament.

Es va observar una correlació significativa entre la proporció de volum nuclear ocupada pels cromosomes i la mida cromosòmica (correlació de Pearson; $r = 0,6933$, $p = 0,0005$) (**Figura 4.28**).

Cr.	N	\bar{x}	std	cv	min	max
1	52	2,64	1,84	69,76	0,36	9,25
2	52	3,19	1,38	43,32	0,47	5,67
3	59	3,09	2,21	71,57	0,39	15,50
4	55	2,02	1,15	56,85	0,31	5,39
5	51	2,51	1,23	49,30	0,78	6,76
6	50	2,25	1,24	55,18	0,58	5,64
7	60	3,11	1,88	60,39	0,65	8,87
8	48	2,15	1,13	52,66	0,34	7,30
9	58	2,34	1,44	61,64	0,36	7,89
10	62	2,52	1,42	56,41	0,47	6,77
11	57	2,23	1,29	57,79	0,56	8,27
12	59	2,61	1,39	53,41	0,78	7,58
13	43	1,96	1,01	51,26	0,38	4,35
14	54	1,75	1,16	66,03	0,25	5,08
15	40	2,04	1,21	58,97	0,28	5,86
16	59	1,90	1,17	61,52	0,04	5,84
17	40	1,31	0,71	54,38	0,09	2,90
18	56	1,63	0,80	48,87	0,47	4,72
19	49	1,28	0,75	58,51	0,20	3,82
X	42	2,12	1,18	55,83	0,21	5,19
Y	42	2,38	1,78	75,00	0,62	9,26

Taula 4.9 Proporció de volum nuclear ocupat pels cromosomes de *Mus musculus* en nuclis d'espermatoïcits I a l'estadi de paquitè. (**Cr**) cromosomes, (**N**) número d'observacions, (\bar{x}) mitjana de la proporció de volum nuclear ocupada per cromosoma, (**std**) desviació estàndard, (**cv**) coeficient de variació, (**min**) valor mínim i (**max**) valor màxim.

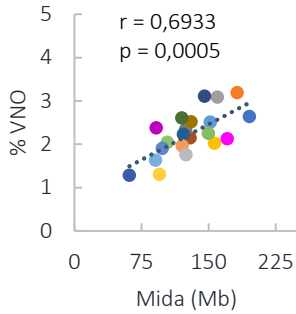


Figura 4.28 Gràfica de dispersió de la proporció de volum nuclear ocupada pels cromosomes en relació a la mida cromosòmica. L'eix Y indica el percentatge de volum nuclear ocupat (% VNO) i l'eix X la mida cromosòmica mesurada en mega bases (Mb). Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

Anàlisi de la distribució radial

Dades descriptives

Els resultats de la distribució radial dels cromosomes es detallen a la **Taula 4.10** i es representen gràficament a la **Figura 4.29**.

	N	% VC			Desv			T-test		
		Externa	Mitja	Interna	Externa	Mitja	Interna	E vs M	E vs I	M vs I
1	52	30,14	46,39	23,47	29,55	17,93	23,24	0,0867	0,4657	0,0465*
2	52	30,99	52,59	16,43	22,53	15,46	16,35	0,0273*	0,0724	0,0010*
3	59	40,09	48,71	11,20	26,05	20,16	11,09	0,3467	<,0001*	<,0001*
4	55	14,06	59,83	26,11	17,16	16,97	26,11	<,0001*	0,1667	0,0046*
5	51	15,34	63,04	21,62	13,92	12,33	21,62	<,0001*	0,4586	0,0005*
6	50	50,25	41,53	8,22	29,07	22,33	8,12	0,3651	<,0001*	0,0005*
7	60	22,69	58,32	18,99	20,06	14,86	18,99	<,0001*	0,6298	0,0002*
8	48	27,97	58,71	13,32	25,50	20,24	13,32	0,0030*	0,0602	<,0001*
9	58	15,74	61,77	22,49	17,77	15,62	22,49	<,0001*	0,4029	0,0005*
10	62	43,67	44,43	11,91	29,57	21,72	11,74	0,9308	<,0001*	0,0004*
11	57	19,65	63,67	16,68	15,40	17,13	16,68	<,0001*	0,6892	<,0001*
12	59	51,70	41,26	7,04	26,42	21,42	6,90	0,2398	<,0001*	<,0001*
13	43	26,15	58,00	15,85	24,34	19,65	15,85	0,0034*	0,2340	0,0005*
14	54	42,12	47,23	10,66	28,37	22,26	10,61	0,5901	<,0001*	0,0002*
15	40	51,92	39,78	8,30	29,95	21,99	8,24	0,2517	<,0001*	0,0028*
16	60	48,64	44,61	6,75	30,34	27,23	6,62	0,6538	<,0001*	<,0001*
17	40	43,09	48,31	8,60	28,70	24,49	8,51	0,6392	<,0001*	0,0004*
18	56	48,59	42,91	8,50	29,09	23,40	8,39	0,5353	<,0001*	0,0002*
19	49	46,95	44,48	8,57	32,75	25,90	8,49	0,8024	<,0001*	0,0003*
X	42	36,28	49,46	14,25	30,64	22,30	14,23	0,2221	0,0116*	0,0027*
Y	42	50,64	41,46	7,90	30,91	25,31	7,74	0,3841	<,0001*	0,0013*
		36,03	50,31	13,66						

Taula 4.10 Distribució radial dels cromosomes al nucli dels espermatòcits I a l'estadi de paquitè. (El peu de figura continua a la pàgina següent) →

← S'indica (**N**) número de cromosomes analitzats, (**% VC**) mitjanes de percentatges de volum cromosòmic present en les zones **externa**, **mitja** i **interna** del nucli per a cada cromosoma, (**Desv**) desviació estàndard i (**E vs M**) el valor de p de la comparativa del % VC de la zona externa amb el % VC de la zona mitja, (**E vs I**) el valor de p de la comparativa del % VC de la zona externa amb el % VC de la zona interna. (**M vs I**) el valor de p de la comparativa del % VC de la zona mitja amb el % VC de la zona interna.

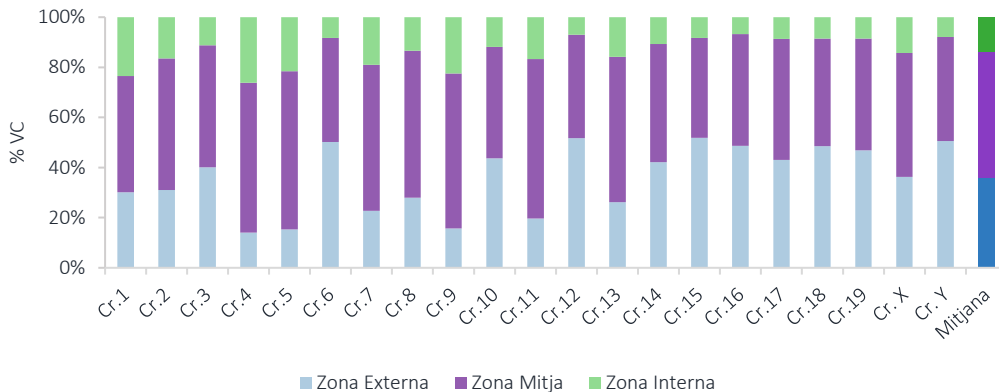


Figura 4.29 Representació gràfica de les mitjanes de percentatges de volum cromosòmic present en les zones externa, mitja i interna del nucli per a cada cromosoma en nuclis d'espermatòcits I l'estadi de paquitè.

La comparativa entre el volum cromosòmic present a la zona externa del nucli respecte el volum cromosòmic present a la zona interna (**Figura 4.29**) va revelar, de manera estadísticament significativa (T-test: $p < 0,05$), la presència de més volum cromosòmic a la zona externa del nucli en el cas dels cromosomes 3, 6, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y. No es va observar cap cas en que un cromosoma presentés més volum a la zona interna del nucli de manera estadísticament significativa (T-test: $p > 0,05$). En el cas dels cromosomes 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 11 i 13 no es van observar diferències estadísticament significatives entre el volum present a la zona externa i el volum present a la zona interna (T-test: $p > 0,05$).

L'anàlisi d'agrupaments de cromosomes segons el patró de distribució del volum cromosòmic en les tres zones del nucli va determinar tres agrupacions de cromosomes (**Figura 4.30**): el grup A, format pels cromosomes 3, 6, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18 i 19, XY mostra un patró de distribució de volum cromosòmic marcat per una tendència a presentar més volum cromosòmic a la zona perifèrica que la resta de cromosomes; el grup B, format pels cromosomes 4, 5, 7, 9, 11 mostra un patró de distribució de volum cromosòmic marcat per una tendència a presentar més volum cromosòmic a la zona interna que la resta dels cromosomes; i finalment, el grup C, format pels cromosomes 1, 2, 8 i 13 mostra un patró de distribució de volum cromosòmic marcat per una

tendència a presentar un volum a les tres zones similar a la mitjana global. Els resultats es representen gràficament a la **Figura 4.31**.

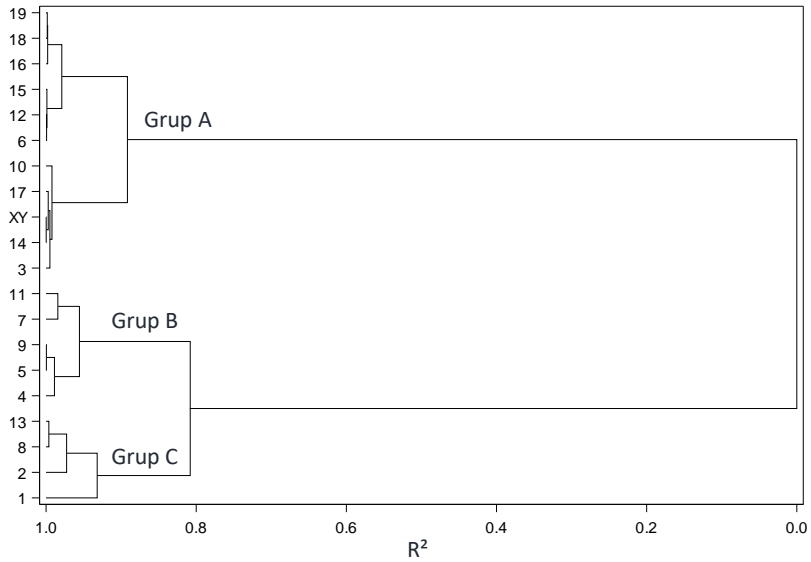


Figura 4.30 Resultats de l'anàlisi d'agrupaments dels cromosomes en funció de la similitud dels percentatges de volum cromosòmic present en les zones externa, mitja i interna del nucli per a cada cromosoma. A l'eix Y s'indica cadascun dels cromosomes analitzats i a l'eix X es representa el coeficient de determinació R^2 .

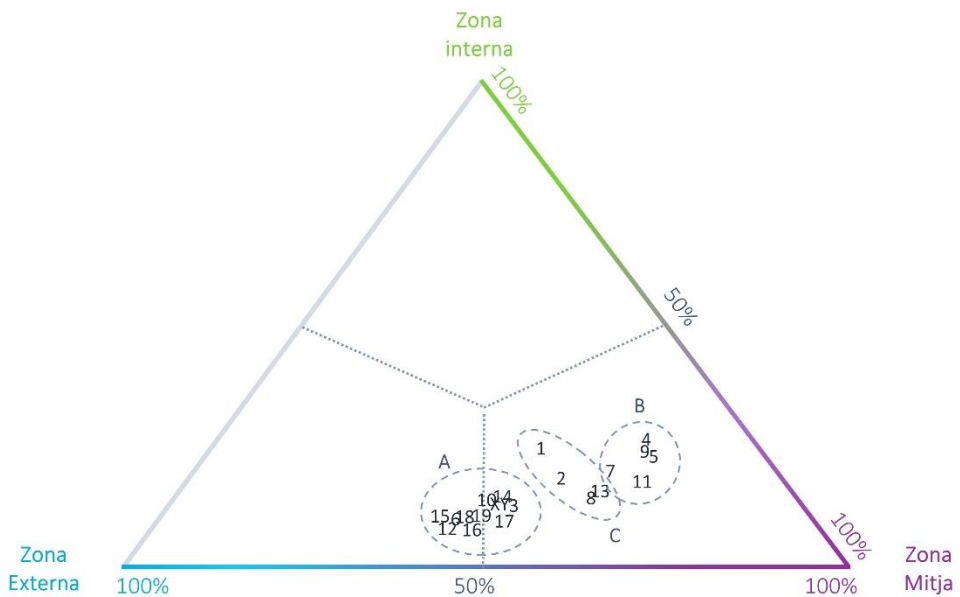


Figura 4.31 Representació gràfica de l'anàlisi d'agrupaments dels cromosomes en funció de la similitud dels percentatges de volum cromosòmic present en les zones **externa**, **mitja** i **interna** del nucli per a cada cromosoma.

Correlacions lineals

· Mida cromosòmica

Es va observar una correlació significativa entre la mida cromosòmica i el percentatge de volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,4713$, $p = 0,0310$) i a la zona interna (correlació de Pearson; $r = 0,6225$, $p = 0,0026$) (**Figura 4.32**). Concretament, els resultats van indicar que els cromosomes més grans presenten més volum a la zona interna del nucli i els cromosomes més petits presenten més volum a la zona externa del nucli. No es va observar una correlació significativa entre la mida cromosòmica i el percentatge de volum cromosòmic present a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,3133$, $p = 0,1667$).

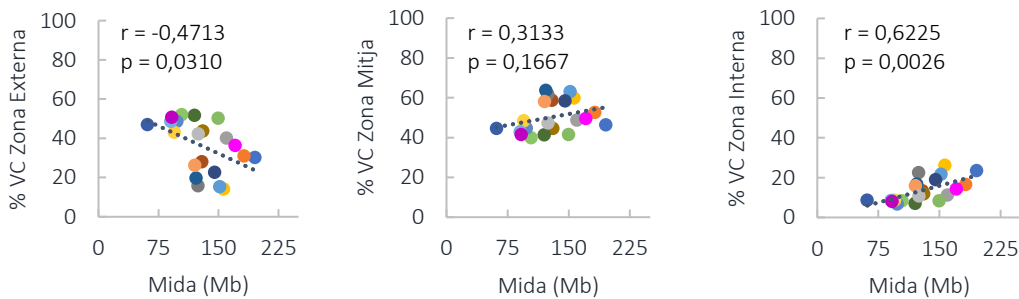


Figura 4.32 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació a la mida cromosòmica. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (% VC) i l'eix X la mida cromosòmica mesurada en mega bases (Mb). Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

· Contingut de GC

Es va observar una correlació significativa entre el contingut de GC dels cromosomes i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,4773$, $p = 0,0287$) i la zona interna (correlació de Pearson; $r = 0,5491$, $p = 0,0099$). No es va observar una correlació significativa entre el contingut de GC dels cromosomes i el volum cromosòmic present a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,3233$, $p = 0,1528$). Concretament, els resultats van indicar que els cromosomes que contenen menys GC presenten més volum a la zona externa del nucli i els cromosomes que contenen més GC presenten més volum a la zona interna del nucli (**Figura 4.33**).

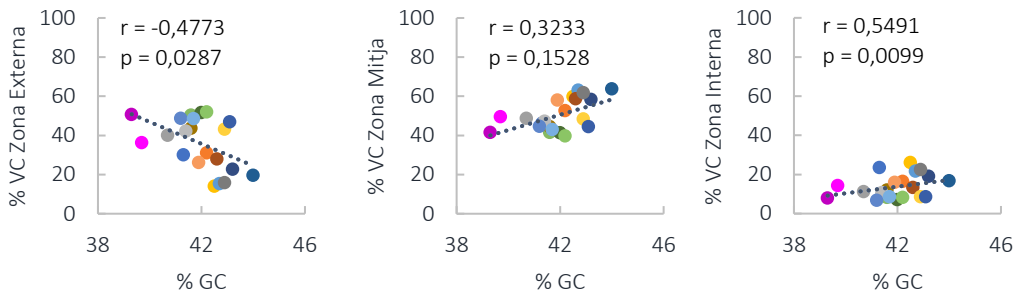


Figura 4.33 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació al contingut de GC dels cromosomes. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (% VC) i l'eix X el percentatge de GC. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

• Densitat gènica

Es va observar una correlació significativa entre la densitat gènica dels cromosomes i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,6258$, $p = 0,0024$), a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,5734$, $p = 0,0066$) i a la zona interna (correlació de Pearson; $r = 0,6234$, $p = 0,0025$) (**Figura 4.34**). Concretament, els resultats van indicar que els cromosomes que contenen més densitat gènica presenten més volum a la zona mitja i interna del nucli i els cromosomes que contenen menys densitat gènica presenten més volum a la zona externa del nucli.

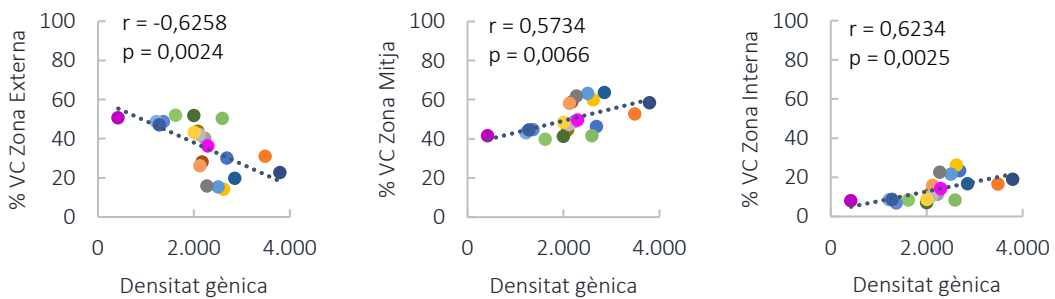


Figura 4.34 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació a la densitat gènica dels cromosomes. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (% VC) i l'eix X el número de gens de cada cromosoma. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

· Quantitat de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi

Es va observar una correlació significativa entre el contingut de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,6693$, $p = 0,0009$), a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,63858$, $p = 0,0018$) i també a la zona interna (correlació de Pearson; $r = 0,6338$, $p = 0,0020$) (**Figura 4.35**). Concretament, els resultats van indicar que els cromosomes amb més contingut de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi presenten més volum a la zona mitja i interna del nucli i, en canvi, els cromosomes amb menys contingut de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi presenten més volum a la zona externa del nucli.

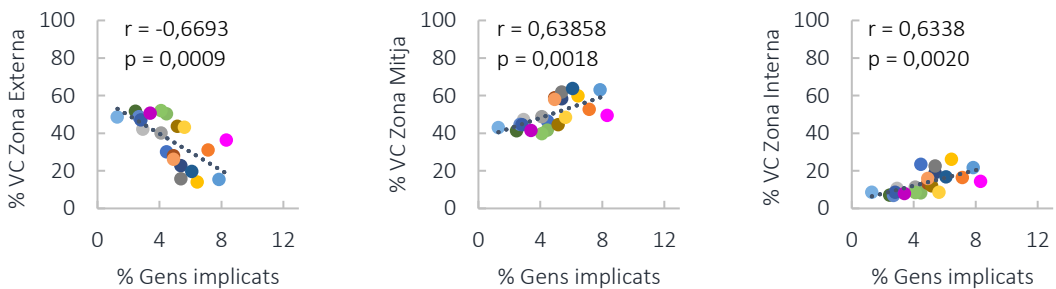


Figura 4.35 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació a la quantitat de gens implicats en l'espermatogènesi dels cromosomes. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (% VC) i l'eix X el percentatge de gens implicats en el procés d'espermatogènesi. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

Anàlisi de la distribució relativa

Dades descriptives

El número de vegades que es va analitzar la presència o absència d'encavalcament per cada parella de cromosomes⁸ així com la freqüència d'encavalcament es detalla a la (**Taula 4.11**). Tots els cromosomes es van encavalcar amb els altres cromosomes almenys una vegada. Les parelles de cromosomes que van mostrar una freqüència més elevada d'encavalcament van ser: 1 i 2, 4

⁸ Degut a que a l'estadi de paquitè els cromosomes X i Y es troben aparellats i, per tant, sempre s'observen encavalcats, es van tractar com una unitat conjunta.

i 11, 2 i 4, 2 i 8, 13 i 15 amb una freqüència d'encavalcament de 0,90, 0,83, 0,73, 0,73 i 0,71, respectivament. D'altra banda, les cinc parelles de cromosomes que van mostrar una freqüència d'encavalcament més baixa van ser: 14 i 17, 16 i 17, 10 i 12, 6 i 15 i 13 i 19, amb una freqüència d'encavalcament de 0,09, 0,09, 0,09, 0,1 i 0,1, respectivament.

Cr.	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	XY
1	0,90	0,38	0,58	0,60	0,18	0,44	0,64	0,56	0,42	0,61	0,44	0,40	0,61	0,56	0,31	0,60	0,47	0,40	0,40
2	10	0,56	0,73	0,67	0,46	0,67	0,73	0,33	0,28	0,63	0,63	0,33	0,46	0,50	0,56	0,60	0,33	0,29	0,25
3	16	16	0,44	0,60	0,44	0,48	0,50	0,47	0,16	0,20	0,47	0,56	0,13	0,33	0,54	0,18	0,33	0,23	0,63
4	52	11	16	0,36	0,39	0,50	0,39	0,53	0,42	0,83	0,42	0,53	0,32	0,30	0,31	0,46	0,41	0,27	0,40
5	10	51	15	11	0,36	0,29	0,36	0,39	0,22	0,69	0,31	0,50	0,36	0,45	0,24	0,40	0,33	0,50	0,58
6	11	11	16	13	11	0,50	0,40	0,39	0,43	0,22	0,44	0,25	0,23	0,10	0,36	0,35	0,36	0,29	0,58
7	16	18	56	16	17	16	0,44	0,63	0,30	0,57	0,50	0,53	0,38	0,59	0,33	0,36	0,24	0,42	0,41
8	11	11	16	13	11	48	16	0,50	0,58	0,44	0,28	0,25	0,23	0,70	0,29	0,30	0,42	0,24	0,33
9	18	18	17	19	18	13	19	12	0,42	0,32	0,43	0,50	0,37	0,56	0,20	0,33	0,32	0,17	0,33
10	19	18	19	19	18	14	20	12	57	0,30	0,10	0,50	0,20	0,17	0,36	0,67	0,39	0,33	0,42
11	18	16	15	18	16	18	14	18	19	20	0,32	0,31	0,32	0,33	0,39	0,15	0,39	0,35	0,23
12	18	16	15	19	16	18	14	18	21	21	57	0,31	0,42	0,33	0,23	0,39	0,37	0,33	0,23
13	15	12	16	15	12	12	17	12	12	12	13	13	0,27	0,71	0,47	0,67	0,42	0,10	0,33
14	51	11	16	53	11	13	16	13	19	20	19	19	15	0,30	0,25	0,09	0,17	0,25	0,40
15	9	40	15	10	40	10	17	10	18	18	9	9	7	10	0,47	0,44	0,22	0,29	0,29
16	16	18	56	16	17	14	58	14	20	22	13	13	17	16	17	0,09	0,11	0,46	0,53
17	10	10	11	11	10	40	11	40	12	12	13	13	12	11	9	11	0,50	0,23	0,42
18	17	18	15	17	18	14	17	12	54	56	18	19	12	18	18	18	12	0,24	0,33
19	15	14	13	15	14	17	12	17	18	18	48	49	10	16	7	11	13	17	0,50

Taula 4.11 Taula de freqüències i d'observacions d'encavalcaments entre cromosomes als nuclis dels espermatòcits I a l'estadi de paquitè. A la part superior i amb tons blavosos s'indica la freqüència d'encavalcament entre totes les parelles de cromosomes. A la part inferior s'indica el número d'observacions realitzades per a cada parella de cromosomes.

L'anàlisi d'agrupaments de cromosomes segons la similitud de freqüències d'encavalcament entre parelles de cromosomes va revelar tres agrupacions de cromosomes: el grup A, format pels cromosomes 16, 19 i XY; el grup B, format pels cromosomes 3, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 18; i el grup C, format pels cromosomes 1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 14 (**Figura 4.36**).

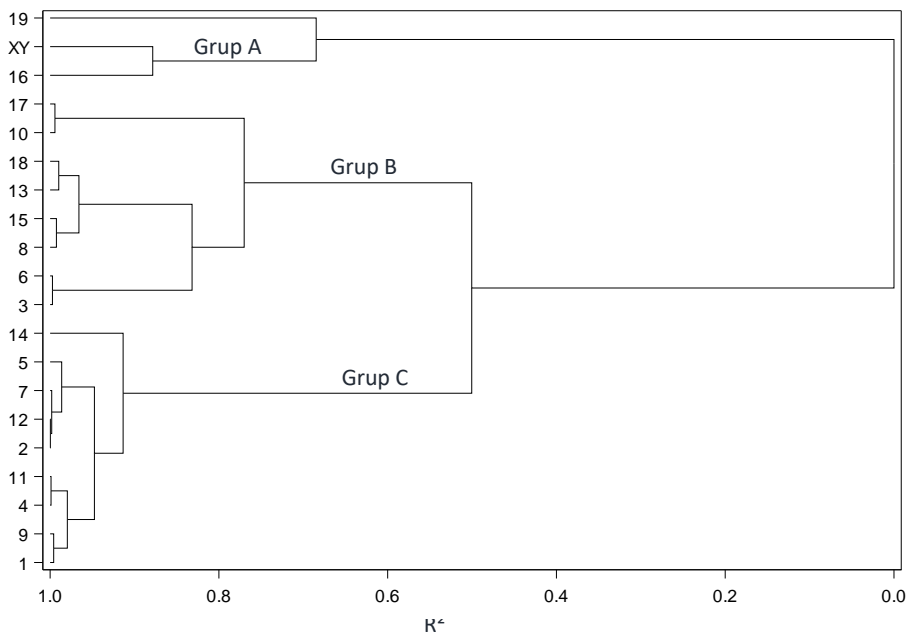


Figura 4.36 Anàlisi d'agrupaments dels cromosomes en funció de la similitud de les freqüències d'encavalcament entre parelles de cromosomes. A l'eix Y s'indica cadascun dels cromosomes analitzats i a l'eix X es representa el coeficient de determinació R^2 .

Comparativa d'agrupaments de cromosomes

· Mida

Es van observar diferències estadísticament significatives entre els grups A, B i C establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.36**) en relació a la mida dels cromosomes que els formen ($\bar{X}^A=97,01$ Mb, $\bar{X}^B=122,50$ Mb, $\bar{X}^C=147,01$ Mb) (ANOVA: $p = 0,0335$) (**Figura 4.37, I**).

· Contingut de GC

No es van observar diferències estadísticament significatives entre els grups A, B i C establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.36**) en relació al contingut de GC dels cromosomes que els formen ($\bar{X}^A=41,27$ % de GC, $\bar{X}^B=41,90$ % de GC, $\bar{X}^C=42,47$ % de GC) (ANOVA: $p = 0,1734$) (**Figura 4.37, II**).

- Densitat gènica

Es van observar diferències estadísticament significatives entre els grups A, B i C establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.36**) en relació a la densitat gènica dels cromosomes que els formen ($\bar{X}^A=1335,67$ gens, $\bar{X}^B=2006,88$ gens, $\bar{X}^C=2705,11$ gens) (ANOVA: $p = 0,0014$) (**Figura 4.37, III**).

- Gens implicats en el procés d'espermatogènesi

No es van observar diferències estadísticament significatives entre els grups A, B i C establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.36**) en relació al percentatge de gens implicats en el procés d'espermatogènesi ($\bar{X}^A=3,79$ % de gens, $\bar{X}^B=4,32$ % de gens, $\bar{X}^C=5,35$ % de gens) (Test Kruskal-Wallis: $p = 0,2364$) (**Figura 4.37, IV**).

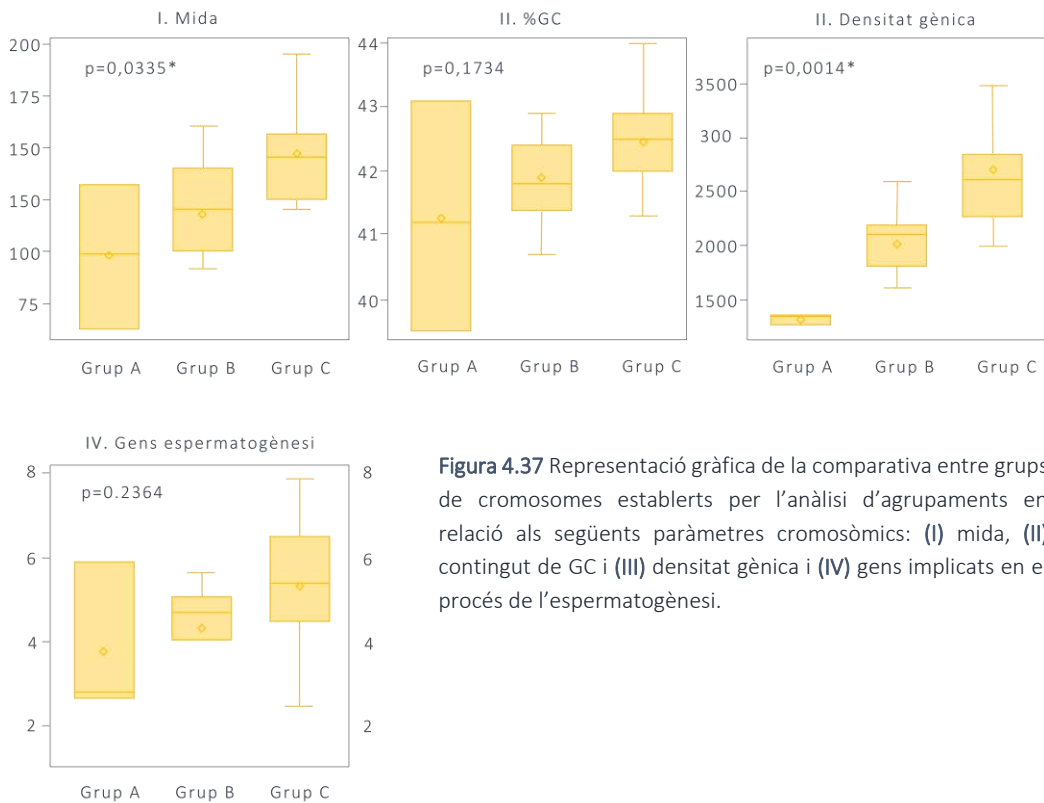


Figura 4.37 Representació gràfica de la comparativa entre grups de cromosomes establerts per l'anàlisi d'agrupaments en relació als següents paràmetres cromosòmics: (I) mida, (II) contingut de GC i (III) densitat gènica i (IV) gens implicats en el procés de l'espermatogènesi.

Anàlisi de l'encavalcament de cromosomes amb regions NOR

No es van observar diferències estadísticament significatives entre la freqüència de solapaments de cromosomes que contenen regions NOR i cromosomes que no en contenen i la freqüència de solapament de parelles de cromosomes que ambdós contenen regions NOR (Test d'efectes fixes: $p = 0,1203$) (Figura 4.38).

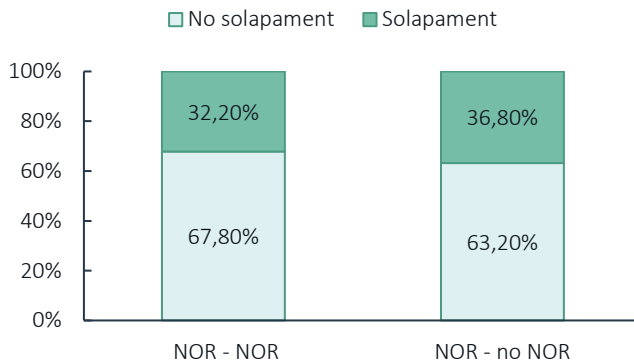


Figura 4.38 Representació gràfica de la mitjana d'absència i presència de solapament entre cromosomes que contenen NOR amb cromosomes que també contenen NOR (NOR-NOR) i entre cromosomes que contenen NOR i cromosomes que no contenen NOR (NOR-no NOR).

ESPERMÀTIDES RODONES

Es van capturar i analitzar un total de 2132 territoris cromosòmics d'un total de 321 nuclis de cèl·lules identificades com a espermatides rodones. Aquests nuclis presentaven un marcatge negatiu per la proteïna SYCP3, un marcatge positiu per la histona H1T i una tinció amb DAPI caracteritzada per la presència d'un cromocentre i una morfologia nuclear arrodonida (Figura 4.39).

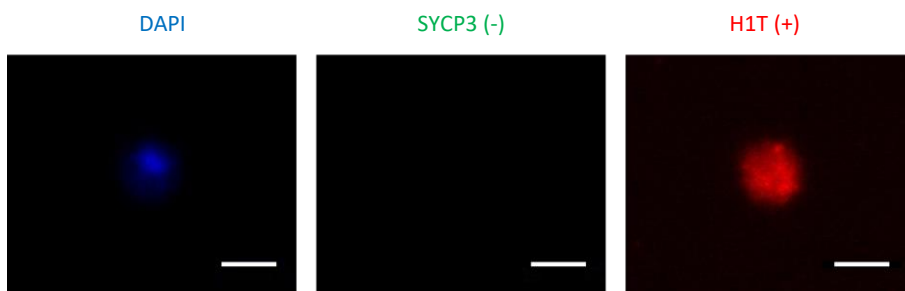


Figura 4.39 Nucli d'espermatida rodona identificat mitjançant el patró de marcatge resultant d'aplicar tècniques d'immunofluorescència per detectar les proteïnes SYCP3 i H1T i la valoració morfològica del nucli mitjançant la tinció amb DAPI. La barra d'escala equival a 5µm.

Anàlisi del volum cromosòmic

El percentatge de volum nuclear ocupat per cada cromosoma es detalla a la **Taula 4.12**. Els cromosomes que van mostrar una mitjana de volum nuclear ocupat més elevada van ser l'Y, el 3 i el 12 respectivament. Els cromosomes que van mostrar una mitjana d'ocupació més baixa van ser el 15, el 17 i el 19, respectivament.

Es va observar una correlació significativa entre la proporció de volum nuclear ocupada pels cromosomes i la mida cromosòmica (correlació de Pearson; $r = 0,4788$, $p = 0,0281$) (**Figura 4.40**). Concretament els resultats van indicar que els cromosomes més grans ocupen més volum nuclear.

Cr.	N	\bar{x}	std	cv	min	max
1	113	1,54	0,94	60,89	0,12	4,29
2	105	1,61	1,12	69,38	0,01	6,31
3	100	2,00	1,26	62,89	0,16	5,99
4	120	1,72	1,70	98,91	0,04	11,41
5	106	1,41	1,40	98,78	0,11	7,54
6	129	1,59	0,95	60,01	0,12	5,08
7	100	1,51	1,21	79,65	0,11	7,64
8	126	1,36	1,06	78,03	0,14	4,50
9	123	1,19	1,08	90,64	0,03	6,97
10	123	1,62	1,15	70,85	0,08	6,95
11	112	1,19	0,84	70,59	0,03	5,04
12	116	1,82	1,34	74,02	0,16	6,66
13	101	1,37	1,28	93,64	0,15	6,16
14	121	1,31	1,06	80,80	0,06	6,79
15	76	0,80	0,64	80,67	0,03	4,05
16	85	1,07	1,15	107,59	0,05	8,81
17	103	0,89	0,89	100,80	0,02	7,25
18	97	1,06	0,82	77,80	0,09	3,93
19	75	1,03	0,90	87,13	0,02	5,03
X	51	1,66	0,89	53,25	0,12	4,05
Y	50	2,21	1,52	69,01	0,00	9,95

Taula 4.12 Proporció de volum nuclear ocupat pels cromosomes de *Mus musculus* en nuclis d'espermatides rodones. (**Cr**) cromosomes, (**N**) número d'observacions, (\bar{x}) mitjana de la proporció de volum nuclear ocupada per cromosoma, (**std**) desviació estàndard, (**cv**) coeficient de variació, (**min**) valor mínim i (**max**) valor màxim.

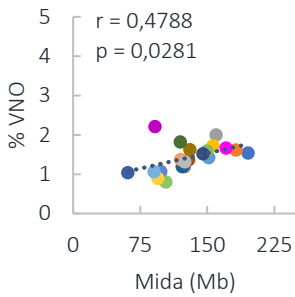


Figura 4.40 Gràfica de dispersió de la proporció de volum nuclear ocupada pels cromosomes en relació a la mida cromosòmica. L'eix Y indica el percentatge de volum nuclear ocupat (% VNO) i l'eix X la mida cromosòmica mesurada en mega bases (Mb). Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

Anàlisi de la distribució radial

Dades descriptives

Els resultats de la distribució radial dels cromosomes es detallen a la **Taula 4.13** i es representen gràficament a la **Figura 4.41**.

	N	%VC			Desv			T-test		
		Externa	Mitja	Interna	Externa	Mitja	Interna	E vs M	E vs I	M vs I
1	113	26,73	59,31	13,96	26,34	21,50	20,35	<,0001*	0,0129*	<,0001*
2	108	38,87	51,94	9,17	31,14	25,58	17,05	0,0562	<,0001*	<,0001*
3	100	49,80	45,49	4,66	28,42	25,58	12,62	0,5350	<,0001*	<,0001*
4	121	13,77	63,14	23,11	18,77	19,89	23,77	<,0001*	0,0958	<,0001*
5	109	14,34	67,59	18,08	19,38	19,52	20,20	<,0001*	0,4890	<,0001*
6	130	42,97	50,14	6,86	28,99	24,48	14,60	0,2480	<,0001*	<,0001*
7	100	9,67	68,73	21,62	13,32	19,37	21,73	<,0001*	0,0420*	<,0001*
8	126	22,55	63,96	13,50	24,57	22,44	20,17	<,0001*	0,0547	<,0001*
9	123	14,87	71,96	13,18	18,83	18,39	16,47	<,0001*	0,7075	<,0001*
10	123	42,53	49,28	8,16	30,65	24,43	14,51	0,2884	<,0001*	<,0001*
11	113	14,77	67,33	17,91	16,23	18,53	22,02	<,0001*	0,5528	<,0001*
12	118	44,52	46,26	9,11	29,46	24,46	17,97	0,7874	<,0001*	<,0001*
13	104	21,96	68,89	9,16	22,99	20,41	14,41	<,0001*	0,0052*	<,0001*
14	122	28,15	58,31	13,40	26,33	24,25	21,34	<,0001*	0,0032*	<,0001*
15	77	29,22	61,76	8,99	25,57	24,49	18,73	<,0001*	0,0003*	<,0001*
16	85	37,25	51,39	11,30	30,43	25,48	19,31	0,0661	<,0001*	<,0001*
17	103	26,60	55,90	17,44	29,05	23,25	22,15	<,0001*	0,1168	<,0001*
18	97	35,33	53,77	10,83	31,81	27,36	18,42	0,0112*	<,0001*	<,0001*
19	76	29,71	55,82	14,41	30,14	24,80	20,09	0,0014*	0,0174*	<,0001*
X	52	10,29	60,03	29,68	19,40	21,84	25,79	<,0001*	0,0366*	0,0158*
Y	52	20,77	54,44	24,60	24,46	21,86	25,04	0,0005*	0,6583	0,0132*
Total	(X)	<u>27,70</u>	<u>58,55</u>	<u>13,73</u>						
	(Y)	<u>28,22</u>	<u>58,27</u>	<u>13,47</u>						

Taula 4.13 Distribució radial dels cromosomes al nucli dels espermatòcits I a l'estadi d'espermatides rodones. (El peu de figura continua a la pàgina següent) →

← S'indica (**N**) número de cromosomes analitzats, (**% VC**) mitjanes de percentatges de volum cromosòmic present en les zones **externa**, **mitja** i **interna** del nucli per a cada cromosoma, (**Desv**) desviació estàndard i (**E vs M**) el valor de p de la comparativa del % VC de la zona externa amb el % VC de la zona mitja, (**E vs I**) el valor de p de la comparativa del % VC de la zona externa amb el % VC de la zona interna. (**M vs I**) el valor de p de la comparativa del % VC de la zona mitja amb el % VC de la zona interna.

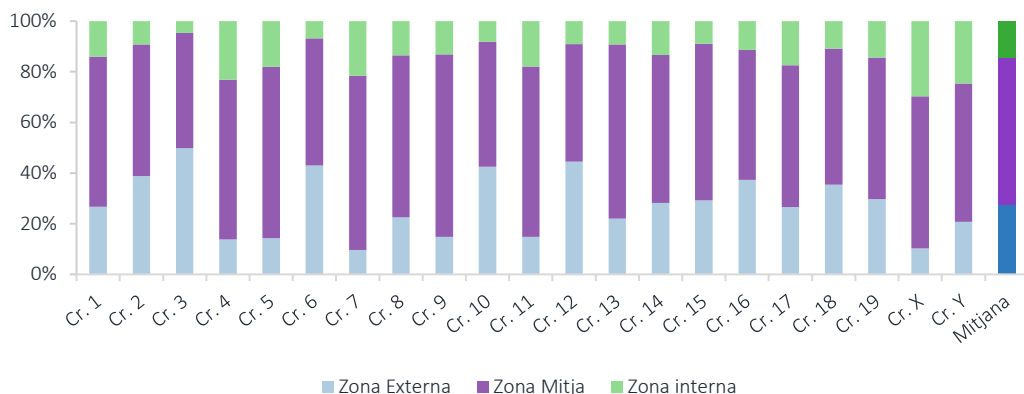


Figura 4.41 Representació gràfica de les mitjanes de percentatges de volum cromosòmic present a les zones externa, mitja i interna del nucli per a cada cromosoma en nuclis a l'estadi d'espermàtida rodona.

La comparativa entre el volum cromosòmic present a la zona externa del nucli respecte el volum cromosòmic present a la zona interna (**Taula 4.13, T-test**) va revelar, de manera estadísticament significativa (T-test: $p < 0,05$), la presència de més volum cromosòmic a la zona externa del nucli en el cas dels cromosomes 1, 2, 3, 6, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18 i 19, i a la zona interna del nucli en el cas dels cromosomes 7 i X. En el cas dels cromosomes 4, 5, 9, 11 i Y no es van observar diferències estadísticament significatives (T-test: $p > 0,05$).

L'anàlisi d'agrupaments de cromosomes segons el patró de distribució del volum cromosòmic en les tres zones del nucli va determinar tres agrupacions de cromosomes (**Figura 4.42**): el grup A, format pels cromosomes 2, 3, 6, 10, 12, 16 i 18, mostra un patró de distribució de volum cromosòmic marcat per una tendència a presentar més volum cromosòmic a la zona perifèrica que la resta de cromosomes; el grup B, format pels cromosomes 4, 5, 7, 9, 11, X i Y, mostra un patró de distribució de volum cromosòmic marcat per una tendència a presentar més volum cromosòmic a la zona interna que la resta dels cromosomes; i finalment, el grup C, format pels cromosomes 1, 8, 13, 14, 15, 17 i 19, mostra un patró de distribució de volum cromosòmic

marcat per una tendència a presentar un volum a les tres zones similar a la mitjana global. Els resultats es representen gràficament a la **Figura 4.43**.

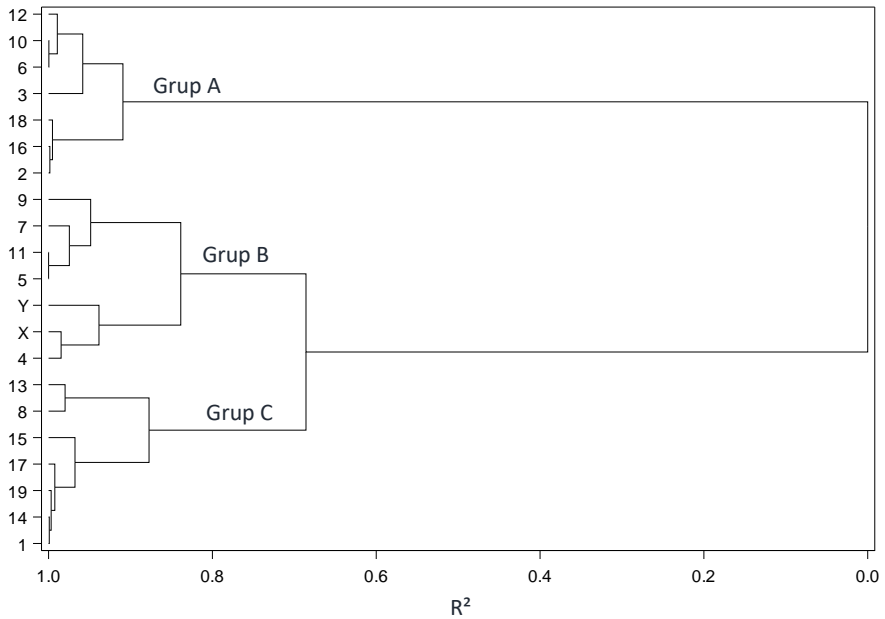


Figura 4.42 Resultats de l'anàlisi d'agrupaments dels cromosomes en funció de la similitud dels percentatges de volum cromosòmic present en les zones externa, mitja i interna del nucli per a cada cromosoma. A l'eix Y s'indica cadascun dels cromosomes analitzats i a l'eix X es representa el coeficient de determinació R^2 .

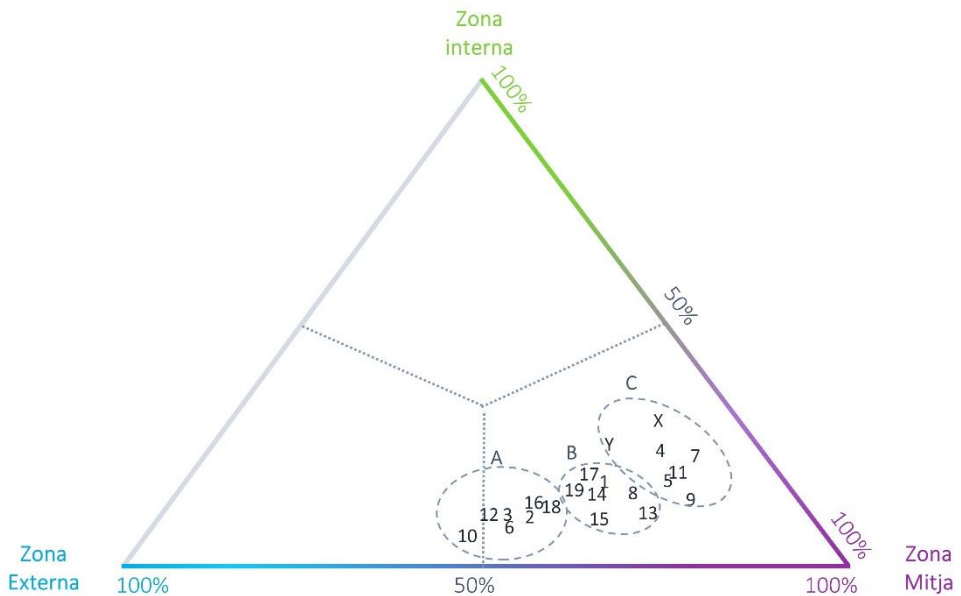


Figura 4.43 Representació gràfica de l'anàlisi d'agrupaments dels cromosomes en funció de la similitud dels percentatges de volum cromosòmic present en les zones externa, mitja i interna del nucli per a cada cromosoma.

Correlacions lineals

· Mida cromosòmica

No es va observar una correlació significativa entre la mida cromosòmica i el percentatge de volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,0695$, $p = 0,7646$), a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,0701$, $p = 0,7626$), i a la zona interna (correlació de Pearson; $r = 0,0631$, $p = 0,7859$) (Figura 4.44).

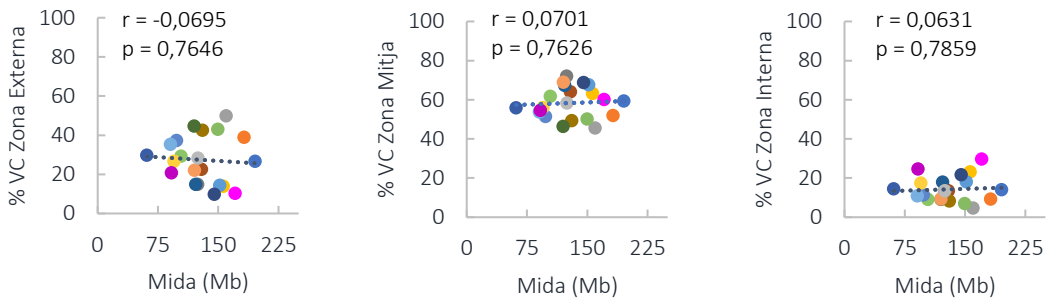


Figura 4.44 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació a la mida cromosòmica. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (%VC) i l'eix X la mida cromosòmica mesurada en mega bases (Mb). Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

· Contingut de GC

No es va observar una correlació significativa entre el contingut de GC dels cromosomes i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,2391$, $p = 0,2966$), i a la zona interna (correlació de Pearson; $r = -0,1245$, $p = 0,5907$). Es va observar una correlació significativa entre el contingut de GC dels cromosomes i el volum cromosòmic present a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,4788$, $p = 0,0281$). Concretament, els resultats van indicar que els cromosomes que contenen més GC presenten més volum a la zona mitja del nucli (Figura 4.45).

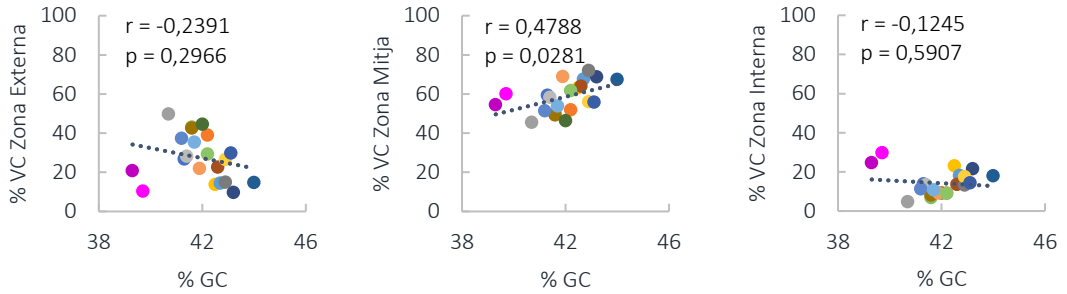


Figura 4.45 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació al contingut de GC dels cromosomes. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (%VC) i l'eix X el percentatge de GC. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

· Densitat gènica

No es va trobar una correlació significativa entre la densitat gènica dels cromosomes i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,2137$, $p = 0,3523$), a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,3244$, $p = 0,1514$) i a la zona interna (correlació de Pearson; $r = -0,0249$, $p = 0,9148$) (Figura 4.46).

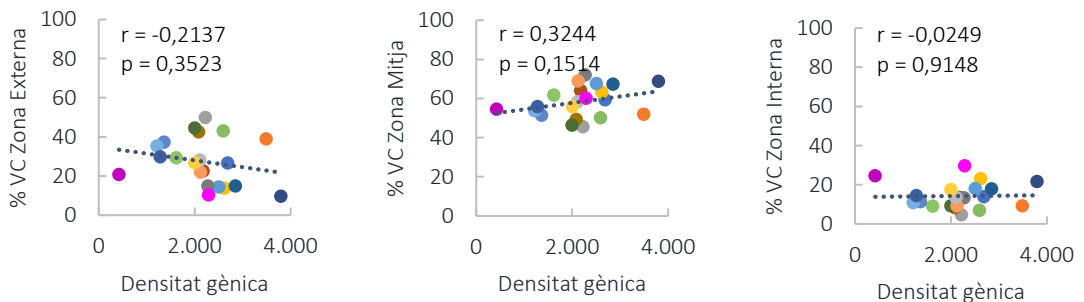


Figura 4.46 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació al contingut de gens dels cromosomes. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (%VC) i l'eix X el percentatge de GC. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

· Quantitat de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi

Es va observar una correlació significativa entre el contingut de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,2137$, $p = <0,0001$), a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,1561$, $p = <0,0001$) i també a la zona interna (correlació de Pearson; $r = 0,1265$, $p = <0,0001$) (Figura 4.47). Concretament, els

resultats van indicar que els cromosomes amb més contingut de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi presenten més volum a la zona interna del nucli i, en canvi, els cromosomes amb menys contingut de gens implicats en el procés d'espermatogènesi presenten menys volum a la zona interna del nucli.

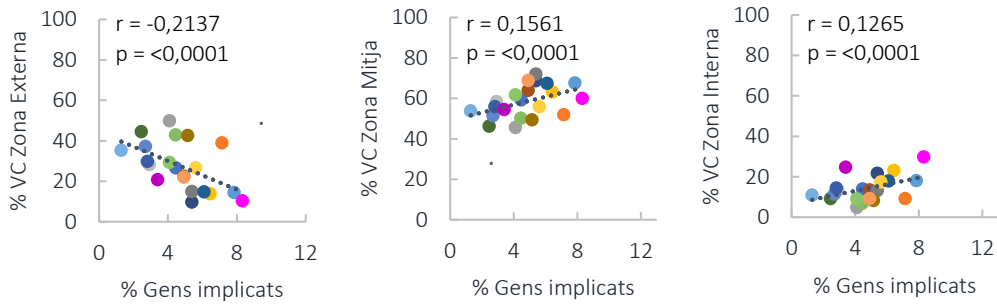


Figura 4.47 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació al contingut de gens implicats en el procés d'espermatogènesi dels cromosomes. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (%VC) i l'eix X el percentatge de gens implicats en aquest procés. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

- Quantitat de gens implicats en el procés de l'espermiogènesi

Es va observar una correlació significativa entre el contingut de gens implicats en el procés de l'espermiogènesi i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,1575$, $p = <0,0001$), a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,0758$, $p = 0,0004$) a la zona interna (correlació de Pearson; $r = 0,1329$, $p = <0,0001$) (**Figura 4.48**). Concretament, els resultats van indicar que els cromosomes amb més contingut de gens implicats en el procés de l'espermiogènesi mostren més volum a la zona interna del nucli i, en canvi, els cromosomes amb menys contingut de gens implicats en el procés de l'espermiogènesi mostren menys volum a la zona interna del nucli.

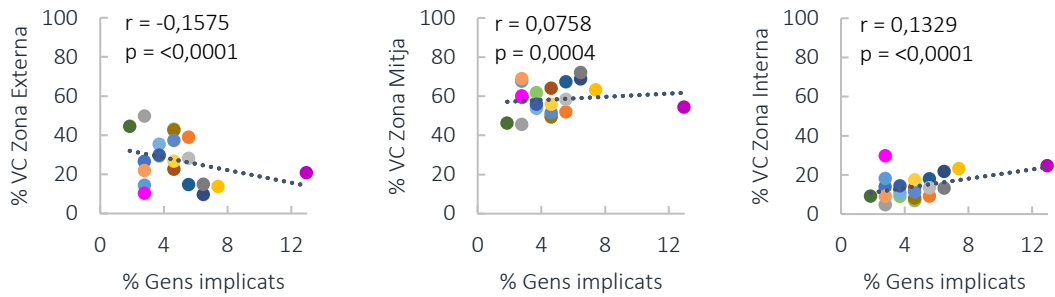


Figura 4.48 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació al contingut de gens implicats en el procés d'espermiogènesi dels cromosomes. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (%VC) i l'eix X el percentatge de gens implicats en aquest procés. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

Anàlisi de la distribució relativa

Dades descriptives

El número de vegades que es va analitzar la presència o absència d'encavalcament per cada parella de cromosomes⁹ i la freqüència de presència d'encavalcament es detalla a la **Taula 4.14**. Tots els cromosomes es van encavalcar amb els altres cromosomes almenys una vegada. Les cinc parelles de cromosomes que van mostrar una freqüència més elevada d'encavalcament van ser: 19 i XY, 7 i 19, 4 i 9, 7 i XY, 11 i 14, 15 i XY amb els valors de 0,79, 0,71, 0,67, 0,67, 0,64 i 0,64 respectivament. D'altra banda, les cinc parelles de cromosomes que van mostrar una freqüència d'encavalcament més baixa van ser: 10 i 15, 2 i 16, 5 i 13, 6 i 13, 12 i 15, amb una freqüència d'encavalcament de 0,13, 0,14, 0,16, 0,18, 0,18 respectivament.

⁹ Es va realitzar un anàlisi comparatiu entre les distàncies del cromosoma X i Y amb la resta de cromosomes. Degut a que els resultats no van mostrar diferències significatives (T-test: $p = 0,574$) es van tractar els cromosomes X i Y com una unitat conjunta.

Cr.	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	XY
1	0,43	0,48	0,48	0,34	0,43	0,56	0,40	0,63	0,53	0,54	0,29	0,37	0,50	0,28	0,32	0,49	0,32	0,55	0,57
2	47	0,31	0,39	0,45	0,43	0,28	0,34	0,42	0,52	0,52	0,29	0,38	0,45	0,14	0,39	0,53	0,47	0,50	
3	25	26	0,40	0,27	0,47	0,45	0,30	0,38	0,30	0,41	0,60	0,35	0,28	0,22	0,34	0,36	0,31	0,38	0,50
4	110	49	25	0,47	0,31	0,56	0,28	0,67	0,45	0,57	0,44	0,50	0,36	0,33	0,50	0,38	0,29	0,44	0,48
5	47	104	26	49	0,28	0,40	0,36	0,32	0,52	0,38	0,38	0,16	0,31	0,49	0,27	0,32	0,47	0,29	0,44
6	42	46	30	45	46	0,35	0,46	0,25	0,41	0,35	0,36	0,18	0,33	0,38	0,36	0,51	0,35	0,21	0,44
7	25	25	98	25	25	31	0,42	0,29	0,35	0,52	0,62	0,57	0,36	0,39	0,39	0,39	0,25	0,71	0,67
8	42	44	30	43	44	122	31	0,22	0,33	0,35	0,39	0,23	0,46	0,22	0,52	0,32	0,31	0,37	0,35
9	32	19	21	39	19	40	21	36	0,39	0,33	0,34	0,31	0,45	0,31	0,53	0,39	0,42	0,46	0,36
10	32	21	23	38	21	39	23	36	119	0,39	0,21	0,31	0,44	0,13	0,19	0,32	0,36	0,38	0,33
11	28	21	22	35	21	26	23	26	51	49	0,40	0,30	0,64	0,45	0,61	0,38	0,36	0,43	0,52
12	28	23	25	34	24	28	26	28	50	48	112	0,31	0,37	0,18	0,48	0,43	0,29	0,48	0,35
13	27	24	23	26	25	33	23	31	32	32	33	36	0,26	0,45	0,62	0,37	0,27	0,35	0,40
14	110	48	25	118	48	43	25	41	40	39	36	35	27	0,43	0,27	0,49	0,28	0,50	0,36
15	39	75	18	42	77	39	18	37	16	16	11	11	11	40	0,33	0,44	0,36	0,50	0,64
16	22	22	83	22	22	25	85	25	19	21	18	21	21	22	15	0,43	0,20	0,43	0,41
17	37	38	22	37	38	101	23	103	31	31	21	23	27	35	32	21	0,36	0,38	0,56
18	25	15	16	31	15	34	16	32	96	95	39	38	26	32	14	15	28	0,32	0,41
19	22	15	16	27	14	19	17	19	35	34	75	75	20	28	8	14	16	28	0,79

Taula 4.14 Taula de freqüències i d'observacions d'encavalcaments entre cromosomes als nuclis de les espermàtides rodones. A la part superior i amb tons blavosos s'indica la freqüència d'encavalcament entre totes les parelles de cromosomes. A la part inferior s'indica el número d'observacions realitzades per a cada parella de cromosomes.

L'anàlisi d'agrupaments de cromosomes segons la similitud de freqüències d'encavalcament entre parelles de cromosomes va revelar tres agrupacions de cromosomes (**Figura 4.49**): el "grup" A, format tan sols pel cromosoma 18; el grup B, format pels cromosomes: 13, 15, 16, 17, 19 i XY i el grup C, format pels cromosomes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 i 14.

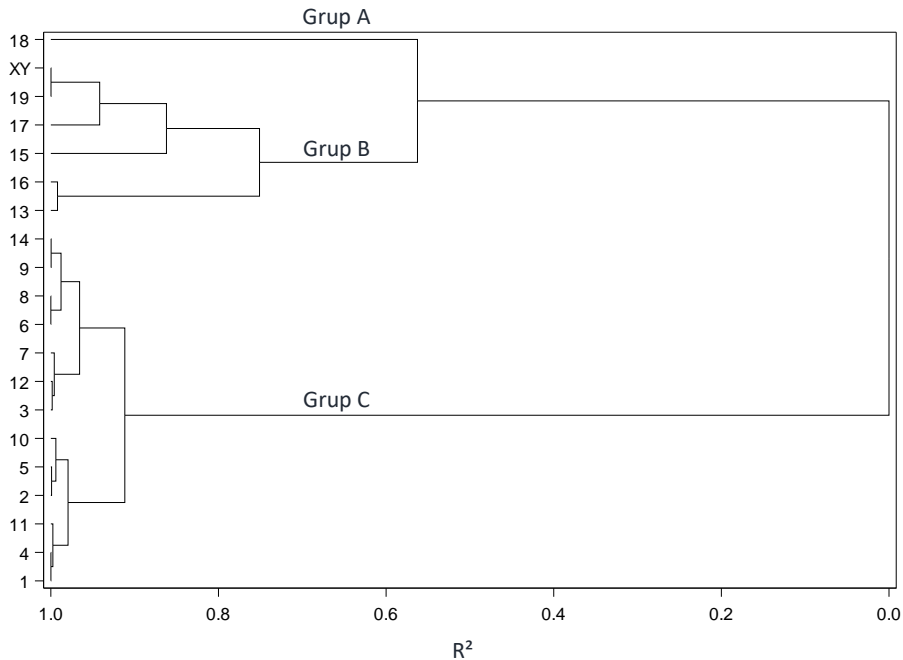


Figura 4.49 Resultats de l'anàlisi d'agrupaments dels cromosomes en funció de la similitud de les freqüències d'encavalcament entre parelles de cromosomes. A l'eix Y s'indica cadascun dels cromosomes analitzats i a l'eix X es representa el coeficient de determinació R^2 .

Comparativa d'agrupaments de cromosomes¹⁰

· Mida

Es van observar diferències estadísticament significatives entre el grup B i el grup C establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.49**) en relació a la mida dels cromosomes que els formen ($\bar{x}^B = 108,35$ Mb, $\bar{x}^C = 145,61$ Mb) (T-test: $p = 0,0153$) (**Figura 4.50, I**).

· Contingut de GC

No es van observar diferències estadísticament significatives entre el grup B i el grup C establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.49**) en relació al contingut de GC dels cromosomes que els formen ($\bar{x}^B = 41,83\%$ de GC, $\bar{x}^C = 42,21\%$ GC) (T-test: $p = 0,4652$) (**Figura 4.50, II**).

¹⁰ El grup A es va excloure de la comparativa d'agrupaments de cromosomes degut a que només estava format pel cromosoma 18 i per tant no mostrava una associació preferent sinó un comportament diferent als altres cromosomes.

- Densitat gènica

Es van observar diferències estadísticament significatives entre el grup B i el grup C establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.49**) en relació a la densitat gènica dels cromosomes que els formen ($\bar{x}^B = 1782,17$ gens, $\bar{x}^C = 2571,62$ gens) (Test de Wilcoxon: $p = 0,011$) (**Figura 4.50, III**).

- Gens implicats en el procés d'espermatogènesi

No es van observar diferències estadísticament significatives entre els grups B i C establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.49**) en relació al percentatge de gens implicats en el procés d'espermatogènesi ($\bar{x}^B = 4,34\%$ de gens, $\bar{x}^C = 5,14\%$ de gens) (T-test: $p = 0,2893$) (**Figura 4.50, IV**).

- Gens implicats en el procés d'espermioènesi

No es van observar diferències estadísticament significatives entre els grups B i C establerts per l'anàlisi d'agrupaments (**Figura 4.49**) en relació al percentatge de gens implicats en el procés d'espermioènesi ($\bar{x}^B = 4,55\%$ de gens, $\bar{x}^C = 4,7\%$ de gens) (Test Kruskal-Wallis: $p = 0,8618$) (**Figura 4.50, V**).

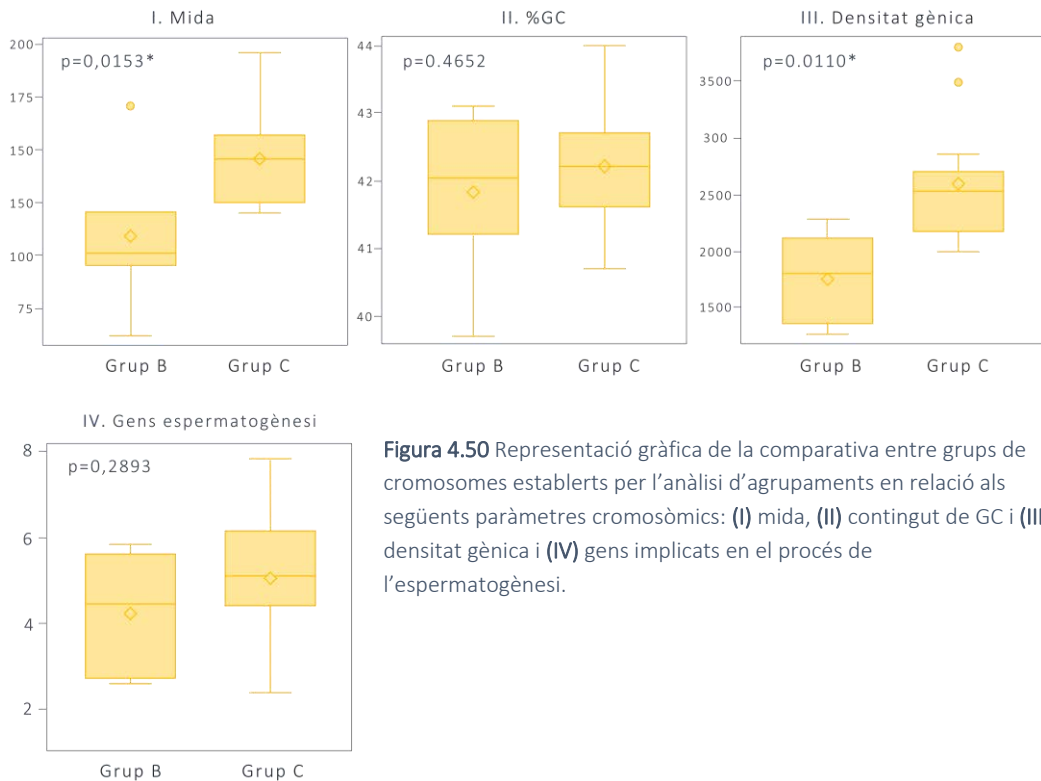


Figura 4.50 Representació gràfica de la comparativa entre grups de cromosomes establerts per l'anàlisi d'agrupaments en relació als següents paràmetres cromosòmics: (I) mida, (II) contingut de GC i (III) densitat gènica i (IV) gens implicats en el procés de l'espermatogènesi.

Anàlisi de l'encavalcament de cromosomes amb regions NOR

No es van observar diferències estadísticament significatives entre la freqüència de solapaments de cromosomes que contenen regions NOR i cromosomes que no en contenen i la freqüència de solapament de parelles de cromosomes que ambdós contenen regions NOR (Test d'efectes fixes: $p = 0,7803$) (Figura 4.51).

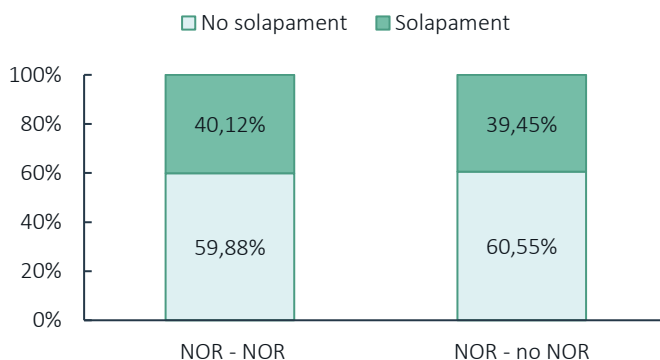


Figura 4.51 Representació gràfica de la mitjana d'absència i presència de solapament entre cromosomes que contenen NOR amb cromosomes que també contenen NOR (NOR-NOR) i entre cromosomes que contenen NOR i cromosomes que no contenen NOR (NOR-no NOR).

ESPERMATOZOIDES

Es van capturar i analitzar un total de 469 territoris cromosòmics d'un total de 144 nuclis d'espermatozoides. Aquests nuclis presentaven una tinció amb DAPI caracteritzada per la presència d'un o dos cromocentres i una morfologia nuclear en forma de ganxo podent-hi distingir una zona apical estreta i una zona basal més ample (**Figura 4.52**).

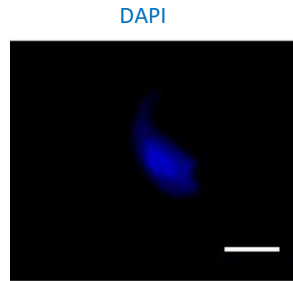


Figura 4.52 Nucli d'espermatozoide identificat mitjançant el patró de marcatge resultant de la contracció amb DAPI.

Anàlisi de volum cromosòmic

El percentatge de volum nuclear ocupat per cada cromosoma es detalla a la **Taula 4.15**. Els tres cromosomes que van mostrar una mitjana d'ocupació més elevada van ser l'Y, el 12 i el 10 amb els percentatges 3,16 %, 2,09 % i 2,00 %, respectivament. Els cromosomes que van mostrar una mitjana d'ocupació més baixa van ser el 18, el 19 i el 9 amb els percentatges 1,24 %, 1,17 % i 1,09 % respectivament.

No es va observar una correlació significativa entre la proporció de volum nuclear ocupada pels cromosomes i la mida cromosòmica (correlació de Pearson; $r = -0,07796$, $p = 0,7369$) (**Figura 4.53**).

Cr.	N	\bar{x}	std	cv	min	max
1	29	1,45	0,73	50,19	0,35	3,50
2	15	1,44	0,84	58,71	0,48	3,30
3	23	1,82	1,56	85,37	0,36	7,03
4	25	1,65	0,64	38,64	0,64	3,13
5	13	1,40	1,04	74,45	0,22	4,18
6	22	1,42	0,70	49,57	0,06	2,76
7	26	1,40	1,58	112,98	0,29	8,16
8	24	1,30	0,62	47,34	0,48	2,75
9	34	1,09	0,76	69,98	0,13	3,35
10	38	2,00	1,04	51,95	0,44	3,97
11	12	1,39	0,57	41,08	0,21	1,93
12	15	2,09	1,38	65,93	0,54	4,34
13	61	1,66	1,23	74,27	0,11	6,68
14	23	1,55	1,15	74,48	0,06	4,58
15	7	1,30	0,88	67,43	0,55	3,11
16	16	1,95	2,69	137,99	0,22	9,95
17	11	1,35	0,86	63,56	0,51	3,44
18	14	1,24	1,08	87,39	0,04	3,12
19	3	1,17	0,91	77,75	0,53	2,21
X	34	1,81	1,13	62,71	0,39	4,85
Y	24	3,16	2,69	85,14	0,79	11,38

Taula 4.15 Proporció de volum nuclear ocupat pels cromosomes de *Mus musculus* en nuclis d'espermatozoides. **(Cr)** cromosomes, **(N)** número d'observacions, **(\bar{x})** mitjana de la proporció de volum nuclear ocupada per cromosoma, **(std)** desviació estàndard, **(cv)** coeficient de variació, **(min)** valor mínim i **(max)** valor màxim.

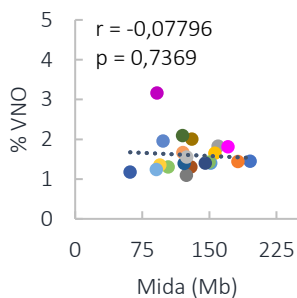


Figura 4.53 Gràfica de dispersió de la proporció de volum nuclear ocupada pels cromosomes en relació a la mida cromosòmica. L'eix Y indica el percentatge de volum nuclear ocupat (% VNO) i l'eix X la mida cromosòmica mesurada en mega bases (Mb). Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

Anàlisi de la distribució radial

Dades descriptives

Els resultats de la distribució radial dels cromosomes es detallen a la **Taula 4.16** i es representen gràficament a la **Figura 4.54**.

	N	% VC			Desv			T-test		
		Externa	Mitja	Interna	Externa	Mitja	Interna	E vs M	E vs I	M vs I
1	29	21,70	62,00	16,30	20,12	18,27	19,08	0,0024*	0,6054	0,0024*
2	15	33,99	53,14	12,87	24,70	27,46	13,79	0,3316	0,1602	0,0547
3	23	42,23	44,80	12,97	25,76	19,21	23,49	0,8578	0,0117*	0,0372*
4	25	18,61	56,63	24,76	23,02	17,62	20,81	0,0062*	0,6337	0,0652
5	13	16,79	66,91	16,30	14,27	11,01	16,49	0,0118*	0,9742	0,0265*
6	22	33,97	42,50	23,53	32,49	22,47	28,57	0,5517	0,4616	0,2759
7	26	27,81	52,07	20,12	28,70	22,87	24,90	0,0759	0,5261	0,0461*
8	24	28,96	57,37	13,67	26,90	20,73	15,22	0,0521	0,171	0,006*
9	34	26,58	51,87	21,55	28,40	25,59	29,04	0,0337*	0,6421	0,0326*
10	38	29,03	54,28	16,69	25,14	23,84	23,09	0,0282*	0,1931	0,0037*
11	12	19,10	58,41	22,49	16,07	6,46	16,86	0,052*	0,8509	0,1442
12	15	29,32	54,48	16,21	24,92	27,09	16,53	0,1869	0,3973	0,0719
13	61	27,70	56,31	15,99	26,71	19,81	18,00	0,0017*	0,1108	<,0001*
14	23	31,42	53,72	14,86	23,91	20,11	18,48	0,1424	0,1709	0,0197*
15	7	37,77	47,73	14,50	30,64	24,08	19,18	0,7134	0,2945	0,2585
16	16	34,28	58,81	6,91	19,13	21,45	6,79	0,1879	0,0206*	0,0048*
17	11	32,77	50,43	16,80	32,20	25,25	17,95	0,4092	0,3769	0,1614
18	14	35,50	43,85	20,65	36,05	28,55	27,46	0,6527	0,3931	0,2859
19	3	22,99	33,18	43,83	31,57	24,34	46,55	0,7705	0,6546	0,8404
X	34	12,69	60,75	26,56	14,12	20,91	24,08	<,0001*	0,2185	0,0273*
Y	24	27,08	58,87	14,05	18,28	18,86	16,49	0,0359*	0,2569	0,0067*
		<u>28,11</u>	<u>53,24</u>	<u>18,65</u>						

Taula 4.16 Distribució radial dels cromosomes al nucli dels espermatozoides. S'indica (**N**) número de cromosomes analitzats, (**% VC**) mitjanes de percentatges de volum cromosòmic present en les zones **externa**, **mitja** i **interna** del nucli per a cada cromosoma, (**Desv**) desviació estàndard i (**E vs M**) el valor de p de la comparativa del % VC de la zona externa amb el % VC de la zona mitja, (**E vs I**) el valor de p de la comparativa del % VC de la zona externa amb el % VC de la zona interna. (**M vs I**) el valor de p de la comparativa del % VC de la zona mitja amb el % VC de la zona interna.

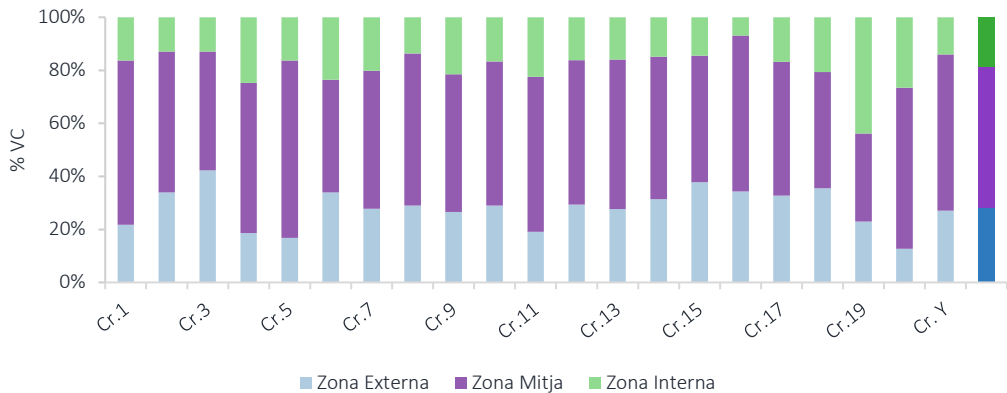


Figura 4.54 Representació gràfica de les mitjanes de percentatges de volum cromosòmic present en les zones externa, mitja i interna del nucli per a cada cromosoma als nuclis espermàtics.

La comparativa entre el volum cromosòmic present a la zona externa del nucli respecte el volum cromosòmic present a la zona interna (**Taula 4.16**) va revelar, de manera estadísticament significativa (T-test: $p < 0,05$), la presència de més volum cromosòmic a la zona externa del nucli en el cas dels cromosomes 3 i 16. En el cas dels cromosomes 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, X i Y no es van observar diferències estadísticament significatives (T-test: $p > 0,05$).

L'anàlisi d'agrupaments de cromosomes segons el patró de distribució del volum cromosòmic en les tres zones del nucli va determinar tres agrupacions de cromosomes (**Figura 4.55**): el grup A, format pels cromosomes 3, 6, 18 i 19; el grup B, format pels cromosomes 2, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 i Y i finalment, el grup C, format pels cromosomes 1, 4, 5, 11 i X. Els resultats es representen gràficament a la **Figura 4.56**.

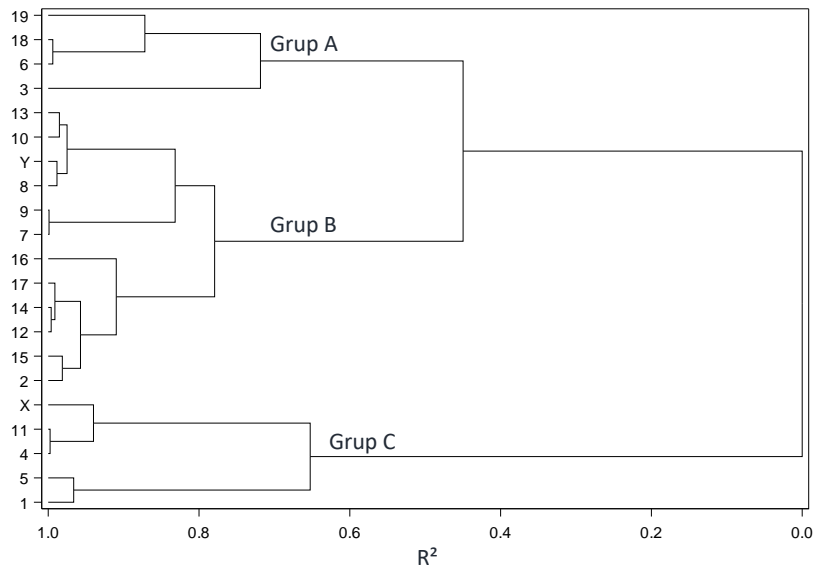


Figura 4.55 Resultats de l'anàlisi d'agrupaments dels cromosomes en funció de la similitud dels percentatges de volum cromosòmic present en les zones externa, mitja i interna del nucli per a cada cromosoma. A l'eix Y s'indica cadascun dels cromosomes analitzats i a l'eix X es representa el coeficient de determinació R^2 .

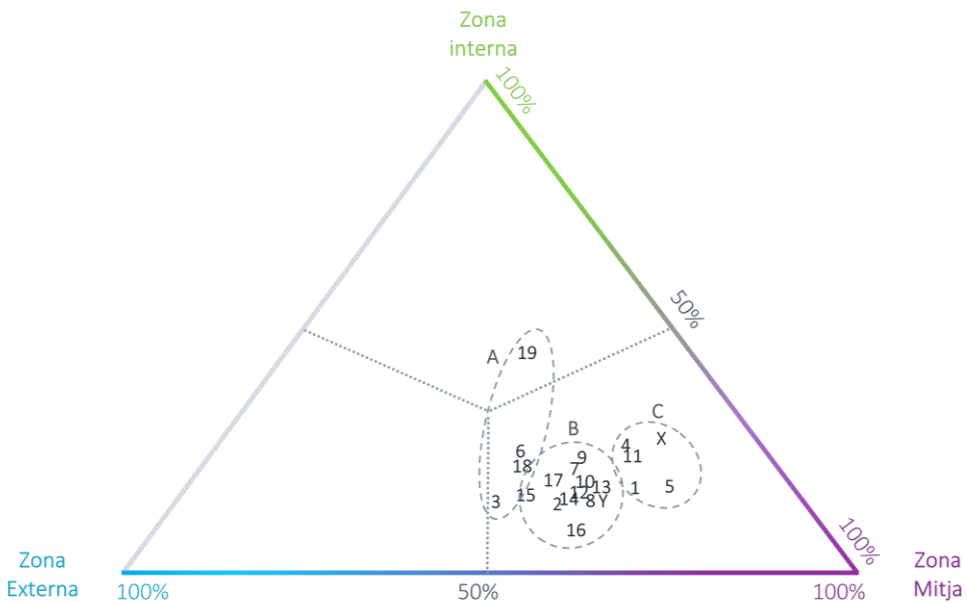


Figura 4.56 Representació gràfica de l'anàlisi d'agrupaments dels cromosomes en funció de la similitud dels percentatges de volum cromosòmic present en les zones externa, mitja i interna del nucli dels espermatozoides.

Correlacions lineals

· Mida cromosòmica

No es va observar una correlació significativa entre la mida cromosòmica i el percentatge de volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,1516$, $p = 0,5355$) i a la zona interna (correlació de Pearson; $r = -0,3618$, $p = 0,128$). Es va observar una correlació significativa entre la mida cromosòmica i el percentatge de volum cromosòmic present a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,4670$, $p = 0,0438$). Concretament, els resultats van indicar que els cromosomes més grans presenten més volum a la zona mitja del nucli (**Figura 4.57**).

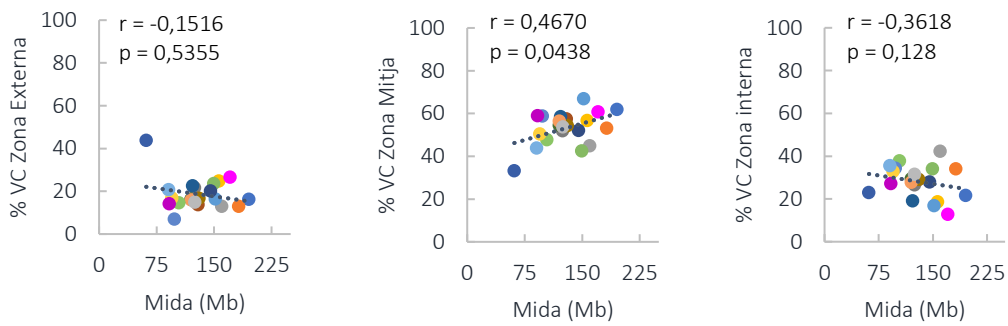


Figura 4.57 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació a la mida cromosòmica. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (% VC) i l'eix X la mida cromosòmica mesurada en mega bases (Mb). Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

· Contingut de GC

Es va observar una correlació significativa entre el contingut de GC dels cromosomes i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,5843$, $p = 0,0086$) i la zona interna (correlació de Pearson; $r = -0,4893$, $p = 0,0335$). No es va observar una correlació significativa entre el contingut de GC dels cromosomes i el volum cromosòmic present a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,0835$, $p = 0,7339$). Concretament, els resultats van indicar que els cromosomes que contenen menys GC presenten més volum a la zona externa del nucli i els cromosomes que contenen més GC presenten més volum a la zona interna nucli (**Figura 4.58**).

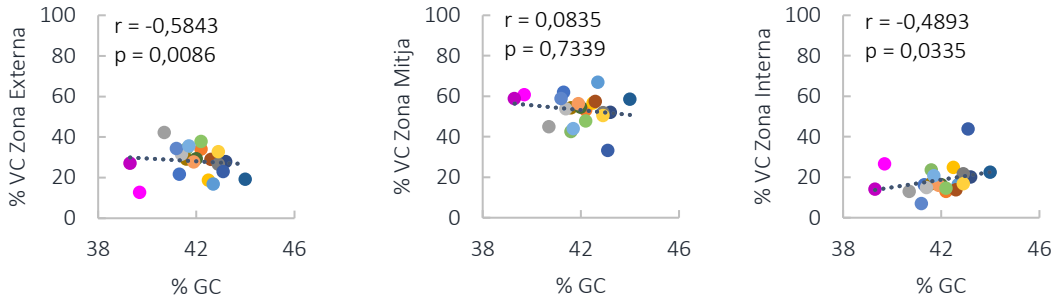


Figura 4.58 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació al contingut de GC dels cromosomes. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (%VC) i l'eix X el percentatge de GC. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

· Densitat gènica

No es va observar una correlació significativa entre la densitat gènica dels cromosomes i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,2886$, $p = 0,2307$), a la zona mitjana (correlació de Pearson; $r = 0,3484$, $p = 0,1438$) i a la zona interna (correlació de Pearson; $r = -0,1130$, $p = 0,6450$) (**Figura 4.59**).

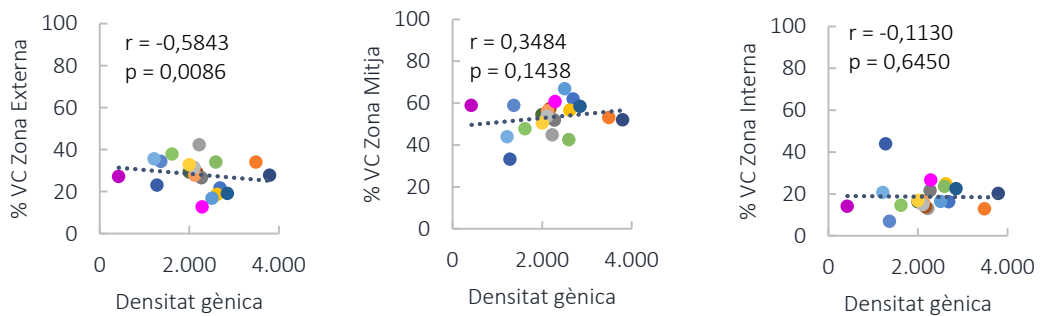


Figura 4.59 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació al contingut de gens dels cromosomes. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (%VC) i l'eix X el número de gens de cada cromosoma. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

- Quantitat de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi

Es va observar una correlació significativa entre el contingut de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,1661$, $p = 0,0002$), a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,12033$, $p = 0,0080$) i també a la zona interna (correlació de Pearson; $r = 0,0923$, $p = 0,0421$) (Figura 4.60). Concretament, els resultats van indicar que els cromosomes amb més contingut de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi presenten més volum a la zona interna del nucli i, en canvi, els cromosomes amb menys contingut de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi presenten menys volum a la zona interna del nucli.

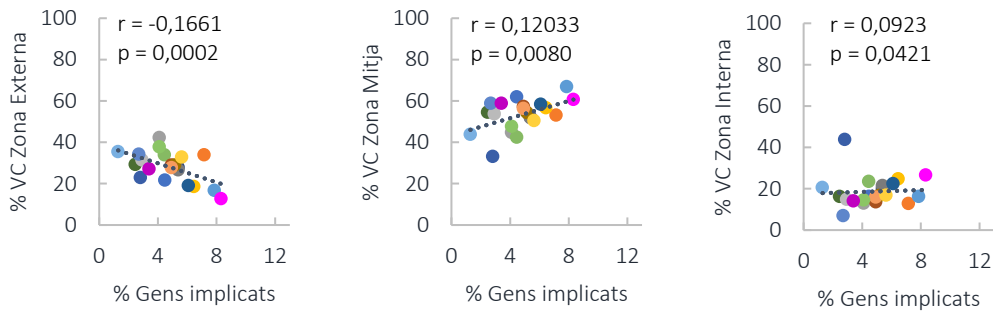


Figura 4.60 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació a la quantitat de gens implicats en el procés d'espermatogènesi dels cromosomes. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (%VC) i l'eix X el percentatge de gens implicats en el procés d'espermatogènesi. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

- Quantitat de gens implicats en el procés de l'espermioogènesi

No es va observar una correlació significativa entre el contingut de gens implicats en el procés de l'espermioogènesi i el volum cromosòmic present a la zona externa (correlació de Pearson; $r = -0,0094$, $p = 0,8360$), a la zona mitja (correlació de Pearson; $r = 0,0031$, $p = 0,9449$) i a la zona interna (correlació de Pearson; $r = 0,0057$, $p = 0,9004$) (Figura 4.61).

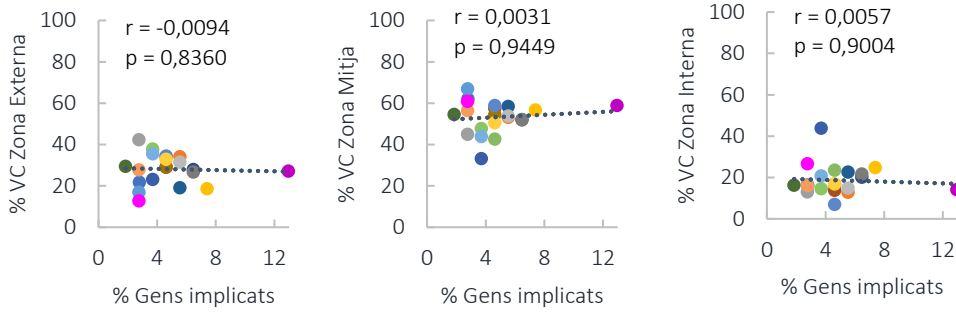


Figura 4.61 Representació gràfica de dispersió del posicionament radial dels cromosomes en relació a la quantitat de gens implicats en el procés de l'espermiogènesi. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (%VC) i l'eix X el percentatge de gens implicats en el procés d'espermiogènesi. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

Anàlisi de la distribució relativa

L'anàlisi de la distribució relativa dels cromosomes en el nucli dels espermatozoides no es va realitzar degut a l'obtenció de poques dades de presència o absència d'encavalcament entre les parelles de cromosomes **Taula 4.17**.

Cr.	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	XY
1	5	7	25	5	3	7	5	8	8	5	5	5	22	3	3	2	1	2	5
2		0	4	10	3	0	5	1	1	4	5	1	4	5	0	2	0	1	0
3			6	0	1	20	0	0	0	0	0	13	6	0	14	0	0	0	10
4				5	2	6	4	7	7	5	5	4	21	3	3	1	1	2	4
5					1	0	3	0	0	4	6	2	5	6	0	1	0	1	0
6						3	18	1	1	0	0	7	2	1	1	10	0	0	3
7							2	2	2	0	0	13	6	0	14	1	1	0	9
8								2	2	0	0	6	4	2	0	11	1	0	1
9									34	4	4	4	6	1	0	1	14	2	2
10										4	4	6	6	1	0	1	14	2	3
11											12	1	4	1	0	0	1	3	0
12												2	4	2	0	0	1	3	0
13													5	1	6	3	1	0	33
14														3	3	1	0	2	4
15															0	1	0	1	0
16																0	0	0	6
17																	0	0	0
18																		0	1
19																			0

Taula 4.17 Número d'observacions d'encavalcament realitzades entre les parelles de cromosomes.

Anàlisi de la distribució longitudinal

Dades descriptives

Els resultats de la distribució radial dels cromosomes es detallen a la **Taula 4.18** i es representen gràficament a la **Figura 4.62**.

	N	% VC			Desv		
		Apical	Basal	A ₁	Apical	Basal	A ₁
1	29	42,55	57,45	1,51	41,77	41,86	5,5
2	15	39,95	60,05	5,77	42,50	41,78	19,74
3	23	46,25	53,75	6,11	45,92	45,72	19,36
4	25	44,50	55,50	0,00	42,20	42,20	0
5	13	28,70	71,30	0,00	36,98	36,95	0
6	22	28,18	71,82	0,00	38,26	38,32	0
7	26	20,16	79,84	0,00	34,97	34,97	0
8	24	42,46	57,54	1,73	45,61	45,44	5,84
9	34	41,22	58,78	3,94	44,72	44,78	13,76
10	38	37,85	62,15	4,36	42,98	42,76	15,19
11	12	46,01	53,99	1,81	48,74	48,75	4,42
12	15	63,84	36,16	12,18	42,52	44,71	23,43
13	61	33,85	66,15	1,34	42,34	42,75	5,07
14	23	39,87	60,13	3,83	40,28	42,11	12,52
15	7	72,09	27,91	3,01	44,23	41,76	5,11
16	16	56,10	43,90	0,65	43,37	43,73	2,26
17	11	55,57	44,43	0,26	45,66	47,62	0,83
18	14	36,32	63,68	7,60	40,68	44,07	18,41
19	3	0,69	99,31	0,00	1,19	1,14	0
X	34	71,16	28,84	0,01	37,43	35,78	0,03
Y	24	81,45	18,55	1,29	35,12	33,72	6,02
		<u>44,23</u>	<u>55,77</u>		41,77	41,86	

Taula 4.18 Resultats de l'anàlisi descriptiu de la distribució longitudinal dels cromosomes al nucli de les espermatides rodones. S'indica (**N**) número de cromosomes analitzats, (**% VC**) mitjanes de percentatges de volum cromosòmic present en les zones **apical** i **basal** del nucli per a cada cromosoma i (**Desv**) desviació estàndard.

Els cinc cromosomes que van mostrar més presència de volum cromosòmic a la part apical₁ del nucli dels espermatozoides van ser el 12, el 2, el 3, el 18 i el 10 amb els percentatges de 23,43%, 19,74%, 19,36%, 18,41% i 15,19%, respectivament.

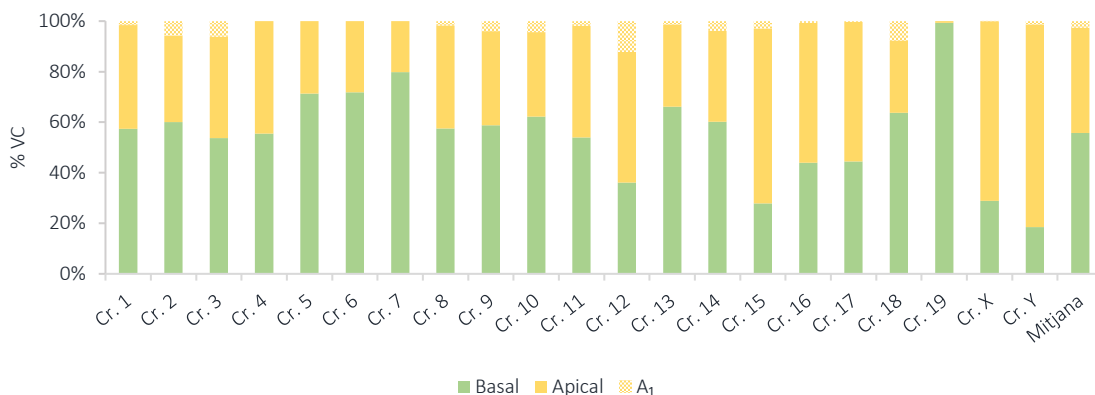


Figura 4.62 Representació gràfica de les mitjanes de percentatges de volum cromosòmic present en les zones apical, basal i apical₁. La zona apical inclou la zona apical₁.

L'anàlisi d'agrupaments de cromosomes segons el patró de distribució del volum cromosòmic en les dues zones del nucli dels espermatozoides va determinar quatre agrupacions de cromosomes (**Figura 4.63**): el grup A, format pels cromosomes X i Y mostra un patró de distribució de volum cromosòmic marcat per una tendència a presentar més volum cromosòmic a la zona apical que la resta de cromosomes; el grup B, format pels cromosomes 12, 15, 16 i 17 mostra un patró de distribució de volum cromosòmic marcat per una tendència a presentar un volum cromosòmic a la zona apical lleugerament superior al volum que presenten a la zona basal; el grup C, format pels cromosomes 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 18 i 19 mostra un patró de distribució de volum cromosòmic marcat per una tendència a presentar més volum a la zona basal del nucli, i finalment, el grup D, format pels cromosomes 1, 4, 9, i 14 mostra un patró de distribució de volum cromosòmic marcat per una tendència a presentar un volum similar a les dues zones del nucli.

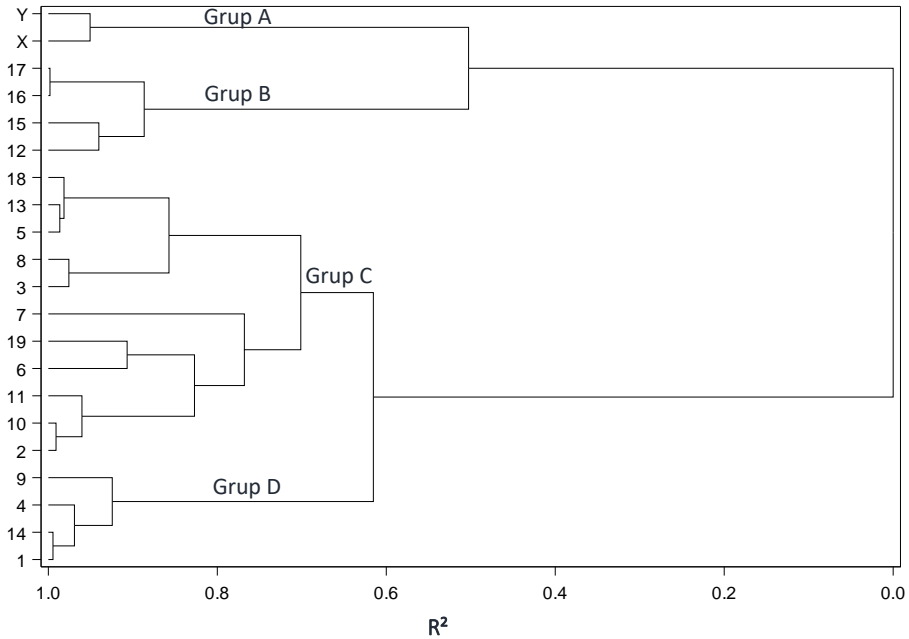


Figura 4.63 Anàlisi d'agrupaments dels cromosomes en funció de la similitud dels percentatges de volum cromosòmic present en les zones apical i basal del nucli per a cada cromosoma. A l'eix Y s'indica cadascun dels cromosomes analitzats i a l'eix X es representa el coeficient de determinació R^2 .

Correlacions lineals

· Mida cromosòmica

No es va observar una correlació significativa entre la mida cromosòmica i el percentatge de volum cromosòmic present a la zona apical (correlació de Pearson; $r = -0,0279$, $p = 0,5734$) i a la zona basal (correlació de Pearson; $r = 0,0310$, $p = 0,5312$) (Figura 4.64).

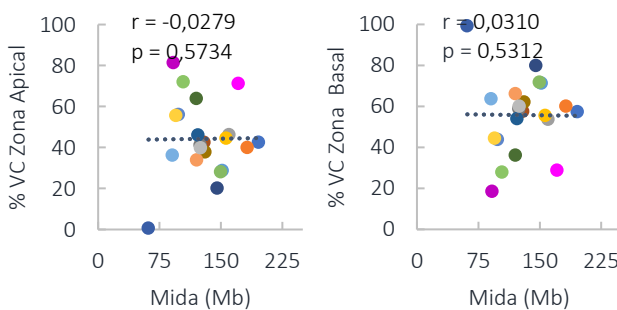


Figura 4.64 Representació gràfica de dispersió del posicionament longitudinal dels cromosomes en relació a la mida cromosòmica. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (%VC) i l'eix X la mida cromosòmica mesurada en mega bases (Mb). Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

· Contingut de GC

Es va observar una correlació significativa entre la el contingut de GC dels cromosomes i el percentatge de volum cromosòmic present a la zona apical (correlació de Pearson; $r = -0,0443$, $p = 0,3709$) i a la zona basal (correlació de Pearson; $r = 0,0533$, $p = 0,2815$) (Figura 4.65).

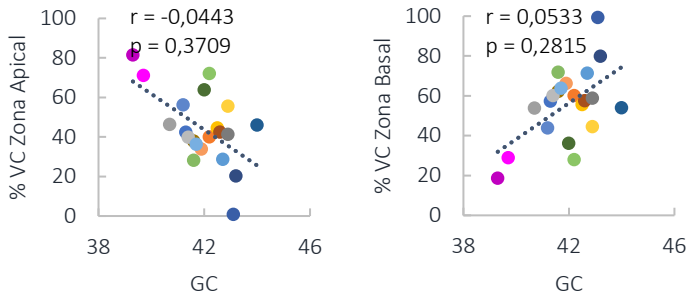


Figura 4.65 Representació gràfica de dispersió del posicionament longitudinal dels cromosomes en relació al contingut de GC dels cromosomes. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (%VC) i l'eix X el percentatge de GC. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

· Densitat gènica

Es va observar una correlació significativa entre la el contingut de GC dels cromosomes i el percentatge de volum cromosòmic present a la zona apical (correlació de Pearson; $r = -0,3564$, $p = 0,1127$) i a la zona basal (correlació de Pearson; $r = 0,3510$, $p = 0,1187$) (Figura 4.66). Concretament, els resultats van indicar que els cromosomes amb més densitat gènica presenten més volum a la zona basal del nucli i, en canvi, els cromosomes amb menys densitat gènica presenten més volum a la zona apical del nucli.

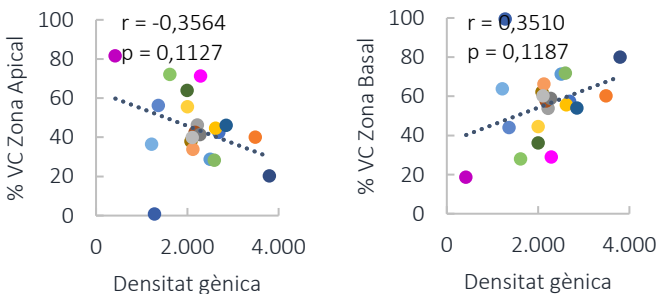


Figura 4.66 Representació gràfica de dispersió del posicionament longitudinal dels cromosomes en relació al contingut de gens dels cromosomes. (El peu de figura continua a la pàgina següent) →

← L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (%VC) i l'eix X el percentatge de GC. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

- Quantitat de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi

No es va observar una correlació significativa entre la el contingut de GC dels cromosomes i el percentatge de volum cromosòmic present a la zona apical (correlació de Pearson; $r = 0,0394$, $p = 0,8654$) i a la zona basal (correlació de Pearson; $r = -0,01351$, $p = 0,9536$) (Figura 4.67).

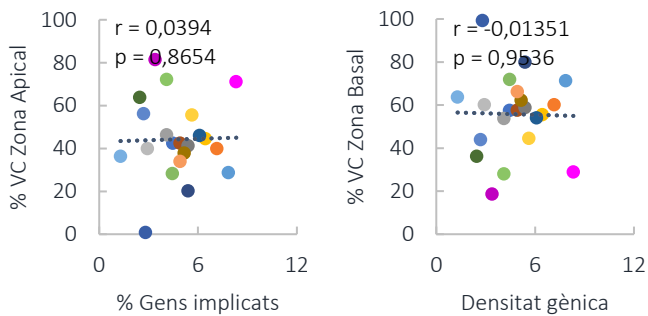


Figura 4.67 Representació gràfica de dispersió del posicionament longitudinal dels cromosomes en relació al contingut de gens implicats en el procés d'espermatogènesi dels cromosomes. L'eix Y indica el percentatge de volum cromosòmic (%VC) i l'eix X el percentatge de gens implicats en aquest procés. Les dades per a cada cromosoma estan representades segons el següent codi de colors: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X i Y.

ANÀLISI COMPARATIU DEL POSICIONAMENT CROMOSÒMIC

Els valors de l'índex Kappa de l'anàlisi comparatiu entre els grups de cromosomes amb un posicionament radial similar i entre els grups de cromosomes amb un posicionament relatiu preferent establerts per l'anàlisi d'agrupaments en cada tipus cel·lular es detallen a la **Figura 4.68**.

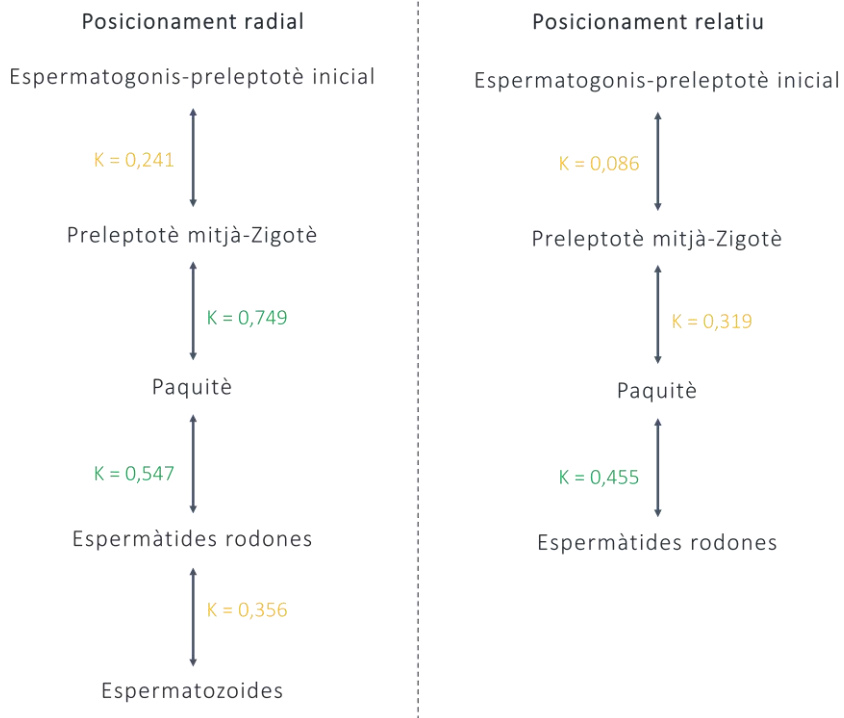


Figura 4.68 Resultats de la comparativa entre els grups de cromosomes amb un **posicionament radial** similar i entre els grups de cromosomes amb un **posicionament relatiu** preferent establerts per l'anàlisi d'agrupaments en cada tipus cel·lular. S'indica el valor de índex Kappa (**K**).

A decorative watercolor splash in shades of green and white, located at the top of the page. The splash has irregular, organic edges and varies in opacity, creating a layered, artistic effect.

5.DISCUSSION

Durant les darreres dècades, els avanços en la microscòpia, les metodologies basades en FISH i el desenvolupament de la tecnologia Hi-C han permès l'anàlisi l'organització cromosòmica en les cèl·lules en interfase, proporcionant evidències de la distribució no aleatòria dels cromosomes en els nuclis somàtics. A més, s'ha observat que la territorialitat cromosòmica és específica de tipus cel·lular evidenciant la seva implicació en la regulació i manteniment de l'expressió gènica. No obstant, el posicionament dels cromosomes en les diferents fases que configuren el procés de l'espermatogènesi, els mecanismes que l'estableixen així com la seva relació amb la funció biològica són poc coneguts. En el present projecte de tesi doctoral, s'han descrit les característiques de la dinàmica cromosòmica del procés de l'espermatogènesi de *Mus musculus* en cinc estadis diferents, que cobreixen la totalitat del procés, amb la voluntat de discernir i comprendre els processos que determinen el posicionament dels cromosomes. Per fer-ho, s'argumentaran aspectes relacionats amb la dinàmica d'aproximació dels cromosomes homòlegs o la relació del volum dels cromosomes amb la seva mida. També es discutirà la relació entre el posicionament radial dels cromosomes i l'activitat gènica, tot destacant el comportament dels cromosomes sexuals. D'altra banda, es posarà èmfasi en la importància del posicionament relatiu preferent dels cromosomes en la regulació de l'expressió gènica, així com en la formació de reorganitzacions cromosòmiques. Així mateix, es discutirà la relació entre la distribució longitudinal dels cromosomes en el nucli dels espermatozoides, la fecundació i els primers estadis de desenvolupament embrionari. Finalment, es realitzarà un recull de nous plantejaments que evoquen els resultats del present estudi.

RELACIÓ DE PROXIMITAT ENTRE CROMOSOMES HOMÒLEGS

Durant els estadis d'espermatogoni-preleptotè inicial i preleptotè mitjà-zigotè es va observar la presència d'un o dos senyals d'hibridació per cromosoma en funció de si els cromosomes homòlegs compartien un mateix territori –permetent tan sols la observació d'una entitat cromosòmica– o bé si estaven separats –permetent distingir dues entitats individuals.

Concretament, a l'estadi d'espermatogoni-preleptotè inicial, un 74% dels cromosomes homòlegs es van observar com una entitat conjunta. Aquests resultats suggereixen que prèviament al procés de la meiosi, un elevat nombre de cromosomes homòlegs es localitzen físicament propers. En les cèl·lules somàtiques, en canvi, diversos estudis descriuen una baixa freqüència d'interacció física entre cromosomes homòlegs (Heride et al. 2010, Selvaraj et al. 2013). Per exemple, Heride i col·laboradors (2010) demostren que en les cèl·lules epitelials

humanes, la distància entre cromosomes homòlegs és superior a la distància entre cromosomes heteròlegs. En aquest mateix estudi, els resultats evidencien que només entre un 8% i un 30% dels casos, els cromosomes homòlegs comparteixen un mateix territori i que, aquest percentatge és variable en funció del cromosoma estudiat. De fet, s'ha postulat que els cromosomes homòlegs es mantenen allunyats d'una manera activa per assegurar que la regulació de l'expressió dels seus elements es realitza de forma independent (Heride et al. 2010). No obstant, s'ha suggerit que, prèviament a aquesta situació i de manera puntual, els cromosomes homòlegs han d'interaccionar per tal d'establir una comunicació trans-al·lèlica, anomenada transvecció, necessària per a la determinació de l'expressió monoal·lèlica (Heride et al. 2010, Hewitt et al. 2010, Krueger et al. 2012). Un exemple molt clar d'aquesta comunicació es produeix en el cas de la interacció dels cromosomes X en femelles de mamífers per tal de dur a terme la inactivació d'un dels dos cromosomes (Anguera et al. 2006). Alternativament, s'ha suggerit que el manteniment dels cromosomes homòlegs en dominis nuclears distants evitaria el possible dany a ambdues còpies d'un gen davant de situacions que puguin produir dany en el DNA (Heride et al. 2010).

Els resultats en l'etapa espermatogoni-preleptotè inicial són clarament divergents respecte els descrits en cèl·lules somàtiques, suggerint la seva relació amb els esdeveniments meiòtics que tindran lloc en fases més avançades. En aquest sentit, aquest comportament cromosòmic podria tenir implicacions funcionals dirigides a avançar en el procés d'aproximació dels cromosomes homòlegs per tal de facilitar i assegurar la correcta evolució del procés d'aparellament i sinapsi d'aquests cromosomes. Diferents arguments donen suport a aquesta interpretació.

En primer lloc, en l'estadi espermatogoni-preleptotè inicial hi tenen cabuda els espermatogonis tipus A i els B, així com els espermatòcits I a l'estadi de preleptotè inicial. La ràtio esperada dels espermatogonis tipus A i tipus B i els espermatòcits I a l'estadi de preleptotè és aproximadament de 1:1:3 (Oakberg 1956, Marchetti et al. 2018). Així doncs, probablement, la majoria de nuclis analitzats d'aquest interval són espermatòcits I primerencs i estiguin a punt d'iniciar l'aproximació gradual dels cromosomes homòlegs amb la finalitat d'aparellar-se.

En segon lloc, els nostres resultats suggereixen que en estadis previs a la replicació del DNA a preleptotè, la majoria dels cromosomes homòlegs ja comparteixen un mateix territori cromosòmic al nucli. De fet, en altres models d'estudi també s'ha observat una agregació dels cromosomes homòlegs abans d'iniciar el procés de la meiosi. Aquest és el cas dels dípters (Metz et al 1916, Wandall i Svendsen 1985) i dels llevats (Scherthan et al. 1994). No obstant, en el

model murí, s'ha descrit que el procés d'aproximació dels cromosomes s'inicia després de la replicació del DNA a preleptotè, coincidint amb l'ancoratge dels telòmers a l'embolcall nuclear (Scherthan et al. 1996). Concretament, Scherthan i col·laboradors (1996), mitjançant la tècnica de FISH i utilitzant una sonda pericentromèrica del cromosoma 8, tan sols van observar una agregació dels cromosomes homòlegs del 9% en els espermatogonis A, del 10% en els cas dels espermatogonis "rodons" i del 4% en el cas dels espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà. Tot i que aquests resultats s'oposen als nostres, cal remarcar que aquesta dada es desprèn d'estudis que presenten limitacions metodològiques; la utilització d'una sonda pericentromèrica específica d'un únic cromosoma pot donar lloc a resultats esbiaixats: per una banda, la distància entre una regió pericentromèrica i el límit del territori cromosòmic pot ser suficientment gran com per classificar dos cromosomes homòlegs com a desagregats quan realment els seus territoris s'encavalquen. D'altra banda, l'anàlisi d'un sol cromosoma no permet extreure conclusions del comportament global de tots els cromosomes i per tant pot estar proporcionant una dada subestimada d'aquest valor.

Pel que fa a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè, els nostres resultats evidencien que el percentatge de cromosomes homòlegs junts augmenta fins a un 85%. Es ben conegut que, a l'inici d'aquest estadi, els telòmers ja es troben ancorats a l'embolcall nuclear. Després, durant la fase de leptotè, els telòmers lliscaran per l'embolcall nuclear fins trobar el seu cromosoma homòleg. Finalment, a la fase de zigotè els cromosomes homòlegs realitzaran l'aparellament i la sinapsi, tot formant l'estructura polaritzada en *bouquet*. Així doncs, l'increment del percentatge de cromosomes homòlegs junts observat en aquest estadi coincideix amb l'avançament en el procés meiótic i, per tant, en la realització de l'aparellament i la sinapsi. El fet que el percentatge d'associació en aquest interval cel·lular no assoleixi el 100% de les observacions mereix una explicació. Possiblement, si poguéssim dividir aquest interval en fraccions més definides com per exemple, preleptotè mitja, preleptotè tardà, leptotè, zigotè inicial i zigotè tardà veuríem un increment progressiu del percentatge de cromosomes homòlegs que es troben junts fins arribar al 100%. De fet, en el cas dels espermatòcits I a l'estadi de paquitè, els nostres resultats indiquen que el 100% dels cromosomes homòlegs s'observen sempre com una sola entitat, coincidint amb el seu estat d'aparellament total a través de l'estructura del SC. Reforçant aquesta hipòtesi, Scherthan i col·laboradors (1996) observen els cromosomes homòlegs junts en el 100% de les observacions en el cas dels espermatòcits I a l'estadi de zigotè i de paquitè.

Finalment, de manera coherent amb la seva ploïdia, en el cas de les espermàtides rodones i dels espermatozoides es va observar sempre una sola entitat híbrida per cromosoma coincidint

amb la dotació haploide d'aquests dos tipus cel·lulars. Aquestes observacions confirmen l'estabilitat cromosòmica de la soca C57BL6 utilitzada per dur a terme l'estudi i la fiabilitat del disseny experimental aplicat per a l'establiment dels cinc intervals cel·lulars analitzats.

RELACIÓ ENTRE VOLUM I MIDA CROMOSÒMICA

Pel que fa el volum nuclear que ocupen els cromosomes, els nostres resultats evidencien que hi ha una correlació significativa envers la mida cromosòmica determinada en Mb; els cromosomes més grans ocupen més volum nuclear i els cromosomes més petits n'ocupen menys. Aquest fet succeeix en tots els intervals cel·lulars estudiats excepte en el cas específic dels cromosomes homòlegs separats dels espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè i, en el cas dels espermatozoides.

La baixa freqüència d'observacions de cromosomes homòlegs separats en aquest tipus cel·lular podria ser un argument que expliqués l'absència de correlació entre la mida cromosòmica i el volum nuclear ocupat. Tot i així, en el cas particular dels espermatozoides, el fet que els cromosomes espermàtics presentin uns nivells de condensació molt elevats (Ward i Coffey 1991; Miller et al. 2010) podria ser un argument addicional. Al final de l'espermatogènesi, durant la fase d'espermogènesi, les histones són substituïdes per les protamines, unes proteïnes que compactaran encara més el DNA (Ward i Coffey 1991, Govin et al. 2004, Balhorn 2007; Miller et al. 2010). Concretament, alguns autors xifren aquest augment de la compactació com a 10 vegades superior (Miller et al. 2010). No obstant, després del procés de reemplaçament d'histones per protamines, s'ha observat que entre un 1% i un 5% del genoma manté la presència d'histones (Balhorn 1977). Tot i que hi ha poc coneixement sobre el mapeig de retenció d'histones per cromosoma, algunes dades apunten que aquestes es mostren diferencialment repartides entre els diferents cromosomes. Per exemple, Yoshida i col·laboradors (2018) descriuen que la histona 3 (H3) s'observa en molt baixa freqüència en els cromosomes X i Y. Per tant, aquest fet podria indicar que la compactació dels cromosomes en el nucli dels espermatozoides esdevingui a diferents graus segons el percentatge de retenció d'histones per cromosoma impeding observar una correlació entre la mida cromosòmica i el volum ocupat.

POSICIONAMENT RADIAL

La mitjana de percentatge de volum cromosòmic present en cada zona del nucli – externa, mitja i interna – va permetre conèixer el posicionament radial dels diferents cromosomes a cada tipus

cel·lular estudiat. Els resultats van revelar una clara tendència de posicionament no aleatori dels cromosomes respecte l'eix centre perifèric del nucli en els cinc intervals estudiats.

El mètode de partició del nucli dividint el seu radi en tres segments iguals resulta en la formació de tres zones nuclears concèntriques de diferent volum: la zona externa, la qual ocupa un 70,37% del volum nuclear total; la zona mitja, la qual ocupa un 25,93% del volum nuclear total i la zona interna, la qual ocupa un 3,70% del volum nuclear total. En l'hipotètic cas de que el volum cromosòmic estigués repartit equitativament dins el volum nuclear, s'esperarien uns percentatges de volum cromosòmic a cada zona del nucli similars a aquests valors. No obstant, en els cinc intervals cel·lulars analitzats es va observar la presència de més volum cromosòmic a la zona mitja i interna del nucli respecte el volum esperat. De manera similar, a nivell de cromosomes individuals i en els cinc intervals analitzats, es va observar que la majoria dels cromosomes mostren més volum a la zona mitja i interna respecte l'esperat.

Així doncs, veiem que la distribució del volum cromosòmic no s'adiu a l'espai disponible a cada zona del nucli; les zones mitja i interna presenten una quantitat de volum cromosòmic superior a l'esperat tenint en compte el baix percentatge de volum nuclear que representen (29,63%). Per tant, els resultats suggereixen que, tot i la presència de més volum cromosòmic a la zona perifèrica del nucli respecte a la zona interna, el volum cromosòmic a les zones mitja i interna estaria molt concentrat i, en canvi, el volum cromosòmic present a la perifèria estaria més dispers. Com s'ha explicat anteriorment¹¹, la part interna del nucli és una zona de caire transcripcionalment activa (Ioannou i Griffin 2011; Meaburn i Misteli 2007). Possiblement, l'expressió gènica necessària per dur a terme el correcte desenvolupament del procés de l'espermatogènesi requereix aquesta elevada concentració de la cromatina a la part interna del nucli per tal d'afavorir l'accessibilitat dels elements reguladors de la transcripció talment com s'ha suggerit en cèl·lules somàtiques en interfase (Ioannou i Griffin 2011; Meaburn i Misteli 2007).

De fet, donant suport a aquesta interpretació, els nostres resultats van evidenciar un posicionament intern preferent d'aquells cromosomes amb un alt contingut de GC i també d'aquells cromosomes amb una elevada densitat gènica, ambdós paràmetres indirectament vinculats amb l'expressió gènica. Concretament, el posicionament radial condicionat pel contingut de GC es va observar en tots els estadis cel·lulars analitzats excepte en espermatòides rodones i el condicionat per la densitat gènica es va observar en el cas dels espermatòcits I a

¹¹ Apartat 1. Introducció, secció "Factors que condicionen la territorialitat cromosòmica", secció "Aspectes funcionals de la territorialitat cromosòmica"

l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè i a l'estadi de paquitè. Aquests resultats coincideixen amb els descrits en cèl·lules somàtiques on també s'ha observat un posicionament radial relacionat amb la densitat gènica (Croft et al. 1999; Bridger et al. 2000; Boyle et al. 2001; Tanabe et al. 2002; Cremer et al. 2003) i el contingut de GC (Cremer i Cremer 2010; Federico et al. 2008).

A més, quan de manera més específica, es va analitzar la correlació entre la quantitat de gens implicats en el procés d'espermatogènesi dels cromosomes amb el seu posicionament radial, els resultats van ser significatius per als cinc estadis cel·lulars. Els cromosomes amb més quantitat de gens implicats en aquest procés van mostrar més volum cromosòmic a la zona interna del nucli. Concretament, els cromosomes que contenen més gens implicats en el procés de l'espermatogènesi són els cromosomes el 2, el 4, el 5 i X. D'aquests cromosomes, els cromosomes 4 i 5 van presentar un posicionament mig-intern en els cinc intervals estudiats. Possiblement, els gens implicats en el procés de l'espermatogènesi continguts en aquests cromosomes tenen una activitat transcripcional mantinguda en els cinc estadis analitzats. En canvi, el cromosoma X i el cromosoma 2 mostren un posicionament radial menys conservat; el cromosoma 2 mostra un posicionament extern al nucli dels espermatogoni-preleptotè inicial, un posicionament mig-intern als espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè i de paquitè, un posicionament extern a les espermàtides rodones i mig-intern als espermatozoides. El cromosoma X, mostra un posicionament mig-intern a l'etapa espermatogoni-preleptotè inicial, extern al nucli dels espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè i de paquitè i intern al nucli de les espermàtides rodones i els espermatozoides. El canvi de posicionament radial d'aquests cromosomes suggereix que els gens continguts en els cromosomes 2 i X podrien mostrar funcions específiques de fase i, que per tant, haguessin de ser expressats en estadis puntuals del procés de l'espermatogènesi. De fet, s'ha observat que els cromosomes sexuals experimenten un procés d'inactivació mantenint un estat de repressió de l'expressió gènica fins a les etapes postmeiòtiques, coincidint amb un canvi de posicionament radial (Foster et al. 2005, Namekawa et al. 2006, Mudrak et al. 2013).

Així mateix, la correlació lineal entre la quantitat de gens implicats en el procés de l'espermogènesi i el posicionament radial dels cromosomes al nucli de les espermàtides rodones també va mostrar de manera significativa que els cromosomes amb més quantitat de gens implicats en aquest procés mostraven més volum cromosòmic a la zona interna del nucli. En aquest cas, els cromosomes que tenen més quantitat de gens implicats en el procés d'espermogènesi són els cromosomes 4, 7, 9 i Y.

Per tant, els nostres resultats suggereixen que l'activitat gènica és un paràmetre que condiciona el posicionament radial dels cromosomes en els cinc tipus cel·lulars estudiats. Aquesta interpretació coincideix amb les dades descrites en el nucli de les cèl·lules somàtiques; diversos estudis observen una localització preferent dels cromosomes amb una alta activitat gènica a la zona interna del nucli (Goetze et al. 2007, Cremer i Cremer 2010). Un exemple clar seria el cas del cromosoma X inactivat en cèl·lules humanes 46,XX el qual mostra un posicionament més perifèric que el seu homòleg actiu (Dyer et al. 1989). A més, diversos estudis han observat un repositionament dels gens activats cap a l'interior del nucli (revisat a Lanctôt et al. 2007), com per exemple, en el cas del locus de les cadenes pesades de les immunoglobulines (IgH) durant el desenvolupament dels limfòcits B (Kosak et al. 2002). Així doncs, el repositionament dels gens activats cap a la zona interna del nucli implicarà l'extensió del territori cromosòmic al qual pertany, també, cap a l'interior del nucli.

Un altre indicatiu de que l'activitat gènica és un paràmetre que condiciona el posicionament radial dels cromosomes rau en el comportament dels cromosomes sexuals. Els resultats de la distribució radial del volum cromosòmic evidencien que aquests cromosomes experimenten una dinàmica de posicionament específica. En primer lloc, en el nucli de les cèl·lules en l'etapa espermatogoni-preleptotè inicial, els cromosomes mostren un posicionament intermedi respecte l'eix centre-perifèria. Seguidament, al nucli dels espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè, s'observa una migració cap a la zona externa que es manté durant l'estadi de paquitè. Finalment, al nucli de les espermatòcits rodones, els cromosomes sexuals es localitzen a la part interna del nucli i es mantenen en aquesta regió també en el cas dels espermatozoides. Aquests resultats, podrien estar relacionats amb l'estat d'inactivació dels cromosomes sexuals durant el procés de l'espermatogènesi.

Els cromosomes X i Y estan sotmesos a un procés d'inactivació (MSCI, de l'anglès *meiotic sex chromosomes inactivation*) durant la profase I de la meiosi (Handel 2004; Larson et al. 2018). Aquest procés es reflecteix en una remodelació i compactació de la cromatina dels cromosomes X i Y formant així la vesícula sexual (SV, de l'anglès *sex vesicle*), un domini visible dins del nucli dels espermatòcits I a l'estadi de paquitè. De fet, la condensació i la inactivació dels cromosomes es produeix entre l'estadi de zigotè i l'estadi de paquitè (Solari 1974). El procés de formació de la SV coincideix amb el seu posicionament extern evidenciat pels nostres resultats i també per resultats d'altres estudis (Solari 1974, Handel 2004, Foster et al. 2005). Així doncs, al nucli dels espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè la SV mostra un posicionament a la zona externa del nucli –considerada de caire transcripcionalment repressiu. Es desconeix si els cromosomes sexuals migren a la zona perifèrica del nucli perquè necessiten inactivar-se o bé

perquè estan inactivats. En aquest sentit, Gillot et al. (2009) han postulat la implicació de la proteïna *Ret Finger* en el posicionament i inactivació de la SV. Aquesta proteïna es localitza únicament a un domini de la zona perifèrica del nucli dels espermatòcits I, juntament amb la matriu nuclear i en juxtaposició a la SV. A banda de marcar el posicionament de la SV, també, se li atribueix una funció de repressió transcripcional (Gillot et al. 2009).

Després d'aquests esdeveniments, els cromosomes sexuals mantenen el seu estat de repressió durant les diferents etapes de la meiosi fins assolir l'etapa postmeiòtica. Aquest estat s'anomena repressió postmeiòtica dels cromosomes sexuals (PSCR, de l'anglès *postmeiotic sex chromosomes repression*). A espermatòcits rodons, diversos gens continguts en aquests cromosomes escapen d'aquest procés de repressió. De fet, s'ha observat una elevada expressió de gens continguts en els cromosomes sexuals a les espermatòcits haploides (Mueller et al. 2008, Cortez et al. 2014, Larson et al. 2016), coincidint amb el reposicionament dels cromosomes X i Y cap a la zona interna del nucli – generalment considerada de caire transcripcionalment activa. Aquest reposicionament dels cromosomes sexuals en els estadis postmeiòtics també s'ha observat en altres estudis i en diferents espècies com per exemple en porc (Foster et al. 2005), ratolí (Namekawa et al. 2006) i humans (Mudrak et al. 2013).

La mida cromosòmica també és un factor que s'ha correlacionat amb el posicionament radial dels cromosomes en les cèl·lules somàtiques; els cromosomes petits es localitzen a la part interna del nucli, mentre que els grans es situen més perifèricament (Bolzer et al. 2005; Sun et al. 2000). Cal remarcar que, contràriament a l'activitat gènica, la mida no té implicacions funcionals que requereixin una distribució cromosòmica preferent. Per tal d'explicar aquesta correlació, Sun i col·laboradors (2000) van proposar dos models¹² biofísics anomenats model mitòtic predeterminat i model d'exclusió del volum. El primer explica que la distribució en roseta específica i no aleatòria dels cromosomes a la placa metafàsica –amb els centròmers encarats cap a l'interior de la roseta (Bolzer et al. 2005)– esdevé la causa de que els cromosomes petits es localitzin només a la part interna de la placa, mentre que els cromosomes grans s'estenen fins a l'exterior. El segon model afegeix que degut a que els cromosomes tenen un volum finit a dins d'un espai esfèric limitat per l'embolcall nuclear, tenen una capacitat limitada d'ocupar el domini d'un altre cromosoma. Així doncs, la correlació entre el posicionament radial dels cromosomes i la seva mida, observada en cèl·lules somàtiques, és una conseqüència, per una banda, de la distribució espacial en roseta que adopten els cromosomes a metafase I, per l'altra,

¹² Apartat 1. Introducció, secció "Factors que condicionen la territorialitat cromosòmica"

de la inclusió dels cromosomes en una estructura nuclear esfèrica que no permet una àmplia circulació dels cromosomes.

Seguint aquest raonament, durant els diferents estadis de la meiosi es produeixen un seguit de moviments cromosòmics per tal d'adoptar configuracions cromosòmiques espacials específiques com a estructures facilitadores de diferents tipus d'esdeveniments meiòtics. En primer lloc, a l'estadi d'espermatogoni-preleptotè inicial els telòmers i els centròmers mostren un posicionament dispers per tot el nucli cel·lular. Tot seguit, a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè es produeixen moviments cromosòmics amb la finalitat de que els cromosomes homòlegs s'aproximin i iniciïn l'aparellament mitjançant la formació del SC (Zickler i Kleckner 1998; Harper et al. 2004; Zickler i Kleckner 2015). Per tal de dur a terme l'aparellament entre cromosomes homòlegs, els cromosomes ancoren els seus telòmers a l'embolcall formant l'estructura anomenada *bouquet*. Un cop ancorats, els telòmers es desplacen fins aproximar-se cap als cromosomes homòlegs respectius (Zickler i Kleckner 1998, Hiraoka i Dernburg 2009, Berrios 2017). Finalment, a la fase de zigotè els cromosomes homòlegs ja estan aparellats i els telòmers s'agrupen a una zona del nucli mantenint l'estructura en forma de *bouquet* polaritzada. Per tant, a l'estadi de zigotè, contràriament a la disposició en roseta descrita en les cèl·lules somàtiques, els cromosomes més grans s'estendran fins a la zona interna del nucli i els cromosomes més petits, en canvi, tan sols s'estendran per les zones més perifèriques. No obstant, els nostres resultats no mostren una distribució radial correlacionada amb la mida als espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè. Possiblement, aquest fet és degut a que l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè no es tracta d'un estadi estàtic i concret sinó que consisteix en un interval cel·lular. De manera que el conjunt de moviments cromosòmics previs a l'establiment de la distribució específica en *bouquet* emmascaren la correlació significativa. De fet, els resultats de la correlació entre la mida cromosòmica i el seu posicionament radial en aquest interval mostren una lleu tendència dels cromosomes grans a mostrar un posicionament mig-intern. Aquesta tendència a l'efecte de la mida com a conseqüència de la distribució en *bouquet* es manifesta en resultats significatius a l'etapa de paquitè. En aquest estadi concret, els nostres resultats sí que demostren una correlació significativa entre la distribució radial dels cromosomes i la seva mida, possiblement perquè ja no parlem d'un interval cel·lular sinó d'un estadi concret. Concretament, els resultats van indicar que els cromosomes més grans presenten més volum a la zona interna del nucli i els cromosomes més petits presenten més volum a la zona externa.

En el cas de les espermàtides rodones i els espermatozoides, els cromosomes també mostren configuracions cromosòmiques espacials específiques dins del nucli. Les espermàtides rodones

mostren un agrupament dels centròmers a la regió interna del nucli (**Figura 1.5 H**) (Namekawa et al. 2006, Maezawa et al. 2017) i un posicionament telomèric no determinat. De manera similar, en el cas dels espermatozoides, els telòmers i els centròmers s'organitzen en un model anomenat *hairpin-loop* (Zalensky et al. 1995, Hazzouri et al. 2000, Moskovtsev et al. 2010, Ioannou et al. 2017). Aquest model consisteix en agrupacions dels telòmers mitjançant dímers o tetràmers i en agrupacions dels centròmers amb un posicionament radial no determinat. No obstant, tot i l'existència d'una distribució específica dels cromosomes, a diferència de l'estructura en *bouquet*, no s'ha descrit que aquesta disposició dels cromosomes tingui una distribució centre-perifèrica concreta. Coincidint amb aquest raonament, els nostres resultats demostren l'absència d'una correlació entre la mida cromosòmica i el posicionament radial.

Així doncs, tot i el manteniment de l'activitat gènica com influenciador del posicionament radial cromosòmic en els cinc tipus cel·lulars estudiats, els nostres resultats posen de manifest que existeix una dinàmica de posicionament al llarg de les diferents fases marcada pels moviments cromosòmics associats al procés de la recombinació i el posicionament dels telòmers i centròmers. Aquest fet és fàcilment observable a través dels resultats de la comparació del posicionament radial determinat per cada tipus cel·lular estudiat. En primer lloc, la comparació entre la distribució radial de l'interval d'espermatogoni-preleptotè inicial amb la distribució radial dels espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè evidencia una similitud *baixa*. Probablement aquests canvis són deguts a l'evolució d'un estat de proliferació mitòtica a un estat meiótic que requereix l'aparellament dels cromosomes homòlegs amb una distribució centromèrica i telomèrica concreta. En segon lloc, la distribució radial dels cromosomes als espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè mostra una concordança *molt bona* amb la distribució radial als espermatòcits I a l'estadi de paquitè. Aquests resultats, posen de manifest, per una banda, el manteniment de la distribució en *bouquet* en totes dues fases i, per l'altra, que totes dues fases formen part del procés meiótic i, per tant, amb patrons d'expressió gènica similars. En tercer lloc, el canvi de posicionament radial entre els espermatòcits I a l'estadi de paquitè i les espermàtides rodones és de caire *moderat*. Aquesta disminució de concordança és indicativa de l'evolució d'un estat meiótic a l'estat de diferenciació de l'espermioogènesi. Per últim, la concordança entre la distribució cromosòmica radial de les espermàtides rodones amb la dels espermatozoides va ser *baixa*. Possiblement, l'evolució d'espermàtides rodones a espermatozoides implica sotmetre's a un procés de diferenciació que inclou canvis morfològics del nucli que podrien ser la causa del canvi de posicionament radial dels cromosomes al nucli. A més a més, la baixa activitat d'expressió gènica al nucli de l'espermatozoide, així com la possible preparació per a un altre patró d'expressió gènica dirigit al desenvolupament embrionari també

podrien contribuir a aquest canvi, tal i com s'ha suggerit en diversos estudis (Greaves et al. 2003, Ioannou i Tempest 2018). En definitiva, els canvis de posicionament radial més substancials es produeixen entre estadis cel·lulars que marquen transicions entre els processos generals de l'espermatogènesi. Concretament, entre la fase mitòtica i la fase meiòtica, entre la fase meiòtica i la fase de diferenciació i entre la fase de diferenciació i l'espermatozoide.

POSICIONAMENT RELATIU

La freqüència d'encavalcament entre parelles de cromosomes va permetre identificar associacions preferents no aleatòries en tots els tipus cel·lulars estudiats. Aquest resultat suggereix que les interaccions entre cromosomes a l'interior del nucli de les cèl·lules germinals i dels espermatozoides estan regulades i tenen implicacions funcionals rellevants.

En cèl·lules somàtiques, altres autors han posat de manifest l'existència d'associacions preferents de cromosomes heteròlegs (Bolzer et al. 2005; Parada et al. 2004) suggerint que el posicionament preferent entre cromosomes podria tenir una funció rellevant en la regulació de l'expressió gènica. Concretament, la proximitat preferent entre cromosomes podria facilitar la regulació gènica en *trans*, és a dir, la interacció entre elements reguladors de l'expressió gènica localitzats en cromosomes diferents (revisat a Williams et al. 2010). De fet, s'han identificat interaccions intercromosòmiques funcionalment significatives (Spilianakis et al. 2005, Lomvardas et al. 2006, Apostolou i Thanos 2008). Per exemple, Apostolou i Thanos (2008) afirmen que l'expressió del gen de l'interferó β depèn de l'associació intercromosòmica de tres loci. Per a la troballa d'aquestes associacions intercromosòmiques funcionals han estat rellevants els estudis de l'organització espacial de la cromatina realitzats amb les tècniques basades en la captura de la conformació dels cromosomes (3C) presentada per Dekker i col·laboradors (2002). Aquests mètodes quantifiquen el nombre d'interaccions covalents entre fragments de DNA que es troben propers a l'espai tridimensional del nucli. Utilitzant els principis d'aquestes tècniques en combinació amb tècniques de seqüenciació massiva (Hi-C) s'obté informació de les seqüències genòmiques específiques que interaccionen físicament en l'organització tridimensional del genoma. A més a més, una altra àrea en què els avenços tecnològics han generat grans quantitats de dades és en la caracterització de l'estat funcional de la cromatina, realitzant estudis de les marques epigenètiques presents a la cromatina (Schones et al. 2011). Utilitzant aquestes tècniques, s'ha demostrat que tant la conformació de la cromatina analitzada amb la tècnica de Hi-C en els nuclis dels espermatozoides com el seu

estat epigenètic és una conseqüència de patró d'expressió gènic a l'estadi d'espermàtides rodones i un avançament cap a l'organització de les cèl·lules embrionàries (Jung et al, 2017).

Així doncs, tenint en compte aquests antecedents, no és agosarat suggerir que el posicionament relatiu no aleatori dels cromosomes, observat en els quatre estadis cel·lulars, podria esdevenir un nivell addicional de regulació de l'expressió gènica en el desenvolupament de l'espermatogènesi tenint un efecte durant el desenvolupament embrionari primerenc. En aquest sentit, l'aplicació de les tècniques de Hi-C en les diferents etapes del procés de l'espermatogènesi proporcionaria una informació rellevant i complementària als nostres resultats. L'utilització d'aquestes tècniques permetria determinar els loci específics que requereixen una interacció física per el correcte desenvolupament del procés de l'espermatogènesi.

Una altra conseqüència de les associacions preferents entre parelles de cromosomes és la freqüència a la que es produeixen reorganitzacions cromosòmiques estructurals. Tot i que els cromosomes ocupen regions discretes a dins del nucli, les seves vores s'encavalquen; els bucles de cromatina d'un cromosoma envaeixen el territori dels seus cromosomes veïns (Maharana et al. 2016). S'ha suggerit que els bucles de cromatina entrellaçats poden ser més susceptibles als trencaments de doble cadena (DSB, de l'anglès *double-strand breaks*) a causa de la seva naturalesa descondensada (Soutoglou i Misteli 2008). Amb altres paraules, la zona d'encavalcament entre territoris cromosòmics pot ser un lloc preferent de formació de reorganitzacions cromosòmiques estructurals entre cromosomes veïns. Reforçant aquesta hipòtesi, s'ha observat una correlació entre el nivell d'encavalcament de cromosomes i les freqüències de translocacions observades (Branco i Pombo 2006).

En cèl·lules somàtiques humanes, la proximitat preferent dels cromosomes a l'interior del nucli està relacionada amb la formació de translocacions cromosòmiques (Roix et al. 2003; Soutoglou i Misteli 2008). Diferents autors han observat una relació directa entre la freqüència a la que es presenten els diferents tipus de reorganitzacions cromosòmiques característiques de diferents tipus de limfomes i la distància física a la que es troben els loci implicats en l'aparició de la malaltia (Roix et al. 2003, Sklyar et al. 2016). En el model murí, s'ha observat que els cromosomes 12, 14 i 15 presenten un posicionament amb proximitat preferent en esplenòcits, essent també aquests cromosomes els que es troben freqüentment implicats en les translocacions cromosòmiques en cèl·lules T cancerígenes (Parada et al. 2002). En un altre estudi realitzat en limfòcits humans, s'observa una correlació significativa entre les associacions preferents de parelles de cromosomes i les freqüències de translocacions després d'induir

trencaments del DNA de doble cadena mitjançant l'exposició cel·lular a radiació ionitzant (Branco i Pombo 2006).

La formació d'una translocació cromosòmica és un procés que consisteix en la formació de DSB en un mínim de dos cromosomes que es troben físicament propers. En general, hi ha dues vies de reparació que contribueixen en la formació de translocacions cromosòmiques. La recombinació homòloga (RH) i la recombinació no homòloga (NHEJ, de l'anglès *non homologous end joining*). La primera requereix homologia i per tant, normalment, no condueix a la formació de reorganitzacions cromosòmiques. La via NHEJ, en canvi, no requereix homologia sinó que, simplement, enllaça els extrems de trencaments de doble cadena. Per tant, NHEJ és una via propensa a l'error que freqüentment dona lloc a reordenaments cromosòmics (Kanaar et al. 1998, Elliott i Jasin 2002). Així doncs, la formació de translocacions està íntimament relacionada amb el posicionament dels cromosomes implicats ja que requereix la interacció física dels elements implicats en la translocació.

Durant la meiosi, la reparació dels DSB induït per l'enzim SPO11 es produeix a l'estadi de zigotè. Així doncs, les parelles de cromosomes amb proximitat preferent en aquest estadi serien les predisposants a veure's implicades en la formació de reorganitzacions cromosòmiques estructurals. A més a més, s'ha suggerit que en el model murí, l'agrupació dels centròmers i telòmers en l'estructura de *bouquet*, conjuntament amb la composició molecular dels centròmers dels cromosomes acrocèntrics podrien predisposar a la formació d'aquest tipus d'alteracions en un grau més elevat que en d'altres espècies (revisat a Garagna et al. 2014). En aquest sentit, els nostres resultats del posicionament relatiu cromosòmic evidencien una proximitat preferent a l'etapa de zigotè entre les següents parelles de cromosomes: 2 i 12, 5 i 7, 2 i 5, 2 i 9. En canvi, les parelles de cromosomes que es veurien menys freqüentment implicades en una translocació serien 4 i 8, 8 i 9, 12 i 15 i 5 i 16.

No obstant, a diferència dels humans, el model murí no mostra una elevada freqüència de translocacions entre parelles de cromosomes concretes. De les 171 translocacions Robertsonianes diferents que teòricament poden formar-se dels 19 parells d'autosomes, 106 s'han descrit en poblacions salvatges (Gazave et al. 2003; Piálek et al. 2005). No obstant, cap de les translocacions Robertsonianes descrites en el model murí, ha mostrat una incidència destacada. De fet, aquesta elevada xifra de fusions descrites i la diversitat de cromosomes implicats en aquestes reordenacions van evocar a alguns autors a considerar que la freqüència d'implicació dels autosomes en les translocacions Robertsonianes en ratolí es produïa de manera aleatòria (Capanna et al. 1977). Ara bé, s'ha postulat que alguns cromosomes són menys

propensos a estar implicats en les translocacions Robertsonianes espontànies, com per exemple el cromosoma 19 (Nachman i Searle 1995; Bauchau 1990). De manera coherent amb aquestes observacions, les nostres dades de posicionament relatiu indiquen que el cromosoma 19, juntament amb el 13, el 15 i el 16, són els cromosomes amb una freqüència més baixa d'encavalcament. No obstant, en termes generals, el conjunt de les dades que es tenen fins al moment indiquen que el posicionament cromosòmic a zigotè no és un factor clarament implicat en la formació de translocacions Robertsonianes en el model murí.

A banda d'observar associacions preferents entre parelles de cromosomes, mitjançant, l'anàlisi d'agrupaments de cromosomes segons el patró d'encavalcament, també es van identificar associacions preferents de grups de cromosomes en cadascun dels estadis cel·lulars analitzats. Per tal d'esbrinar els mecanismes que regeixen aquesta distribució proximal dels cromosomes, es van analitzar els paràmetres cromosòmics de cada agrupació. Estudis previs del nostre grup indicaven que el posicionament relatiu cromosòmic en espermatòcits I humans a l'estadi de metafase I mostrava una associació preferent dels cromosomes segons la seva mida i densitat gènica en aquest estadi (Vergés et al. 2014), suggerint que el posicionament cromosòmic no és aleatori i que està influenciat per paràmetres intrínsecs dels cromosomes. De manera similar, els nostres resultats evidencien que els cromosomes amb una associació preferent mostren una similitud respecte la mida cromosòmica en el cas dels espermatòcits I a l'estadi de paquitè i a les espermàtides rodones. Tal i com ja s'ha comentat en l'apartat d'anàlisi de la distribució radial dels cromosomes, la mida no té implicacions funcionals que requereixin una distribució cromosòmica preferent sinó que, possiblement, és una conseqüència de la distribució específica dels cromosomes en els diferents estadis. Aquesta interpretació és coherent amb els resultats obtinguts, ja que, als espermatòcits I a l'estadi de paquitè els cromosomes adopten una distribució en *bouquet* no polaritzada i, per tant, els cromosomes més grans s'estendran fins les zones més internes del nucli on tindran més oportunitats d'encavalcar-se només amb altres cromosomes grans. En el cas de les espermàtides rodones, el fet que els centròmers s'agrupin per formar diferents cromocentres provoca que els cromosomes interaccionin més freqüentment entre aquells que tenen una mida similar; els cromosomes més petits quedaran situats en una zona més restringida i els grans s'estendran a zones més distals. També, es va observar una associació preferent dels cromosomes segons la densitat gènica en el cas dels espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè i a l'estadi de paquitè i a les espermàtides rodones. No obstant, no es va observar una associació preferent dels cromosomes segons el contingut de GC i el percentatge de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi. Per tant, en conjunt, no s'observa una clara associació dels cromosomes segons els paràmetres que es relacionen amb l'activitat gènica.

D'altra banda, la comparativa dels grups de cromosomes amb associacions preferents establerts per a cada tipus cel·lular estudiat va revelar una dinàmica entre les associacions de cromosomes al llarg del procés d'espermatogènesi. De fet, la concordança va ser *insignificant* en l'evolució d'espermatogoni-preleptotè inicial a preleptotè mitjà-zigotè, *baixa* de preleptotè mitjà-zigotè a paquitè i *moderada* de paquitè a espermatides rodones. Així doncs, els resultats ens indiquen una variació del posicionament relatiu cromosòmic al llarg del procés de l'espermatogènesi. Atès que l'associació preferent entre cromosomes està relacionada amb la regulació coordinada de gens o elements reguladors que resideixen en cromosomes diferents, les variacions de posicionament relatiu entre els diferents intervals analitzats podria ser un reflex de l'evolució de l'expressió gènica que es produeix durant el transcurs del procés de l'espermatogènesi. No obstant, per tal de corroborar aquesta afirmació caldria identificar aquells gens implicats en el procés d'espermatogènesi els quals la seva expressió requereix l'establiment d'un contacte intercromosòmic. En aquest sentit, tal i com s'ha suggerit anteriorment, la realització d'estudis que determinin la conformació de la cromatina generarien una informació rellevant i complementària amb els resultats obtinguts.

D'altra banda, cal remarcar que el nuclèol és considerat un altre element que condiciona el patró de posicionament relatiu dels cromosomes al nucli. La formació del nuclèol rau en l'associació de les NOR i, per tant implica l'assemblatge dels cromosomes que contenen aquests segments de rDNA repetits en tàndem (Pliss et al. 2015). La formació del nuclèol mostra una dinàmica concreta al llarg del procés de l'espermatogènesi: l'organització nucleolar a les cèl·lules germinals masculines es produeix als espermatogonis i durant els primers estadis de la profase meiótica. A finals de l'estadi de leptotè i inici de zigotè, diversos bivalents autosòmics – concretament, els cromosomes 11, 12, 15, 16, 18 i 19 en el cas del model murí– s'associen per tal de formar el nuclèol i realitzar la síntesi de l'RNA ribosòmic. Després, a l'estadi de paquitè, el nuclèol es desestructura i les masses nucleolars es repositionen a prop del parell cromosòmic XY. A l'estadi d'espermàtida rodona es produeix, altre cop, l'organització dels nuclèols (Biggiogera et al. 1991, Tanemura et al. 2005, Jamin et al. 2017). Finalment, aquests ja no s'observen al nucli de les espermatides allargades ni dels espermatozoides (Biggiogera et al. 1991). Amb la finalitat de determinar si el posicionament relatiu dels cromosomes amb NOR es relaciona amb la dinàmica d'organització nucleolar, es va testar si els cromosomes amb NOR mostraven una associació preferent en comparació amb la freqüència d'associacions dels cromosomes sense NOR. Els resultats no van mostrar associacions significatives en cap dels tipus cel·lulars estudiats per aquest paràmetre. Possiblement, el fet que els cromosomes amb NOR no mostrin una associació preferent podria ser degut a que aquests cromosomes no són els únics que interaccionen amb els nuclèols; s'han identificat regions de cromosomes sense NOR

associades al nuclèol (NAD, de l'anglès *nucleolar-associated domains*) (Koningsbruggen et al. 2014). Així doncs, els cromosomes amb NOR podrien encavalcar-se d'igual manera amb altres cromosomes sense NOR però amb la presència de NAD. Per tant, possiblement, la comparativa entre la freqüència d'encavalcament entre cromosomes amb NOR respecte amb cromosomes que no contenen NOR no és un mètode resolutiu per observar associacions preferents entre aquests cromosomes. De fet, la freqüència d'encavalcament entre cromosomes amb NOR disminueix considerablement a mida que s'avança en el procés de l'espermatogènesi coincidint amb la dinàmica de presència del nuclèol en aquest procés. A més a més, tant el número de nuclèols presents en cada cèl·lula com la quantitat de cromosomes implicats en la seva formació pot ser variable. Per tant, la no participació constant dels cromosomes amb NOR juntament amb les característiques del mètode d'anàlisi utilitzat per detectar les associacions preferents podrien emascarar un encavalcament preferent entre ells.

POSICIONAMENT LONGITUDINAL ALS ESPERMATOZOIDES

La mitjana de percentatge de volum cromosòmic present a cada zona del nucli – apical i basal – i per cada cromosoma va permetre conèixer el posicionament longitudinal de tots els cromosomes al nucli dels espermatozoides. Els resultats van revelar una clara tendència de posicionament no aleatori dels cromosomes respecte l'eix longitudinal del nucli dels espermatozoides.

De manera similar, altres autors han evidenciat l'existència d'un posicionament longitudinal no aleatori dels cromosomes al nucli dels espermatozoides humans (**Taula 1.1**). De fet, s'ha suggerit que aquest podria ser important per determinar l'ordre d'entrada dels cromosomes a l'ooplasma del gàmeta femení (Zalensky i Zalenskaya 2007). Després de la fecundació, la membrana nuclear es descompon i la cromatina espermàtica inicia la descondensació interaccionant amb l'ambient citoplasmàtic matern i avançant en la remodelació de la cromatina (Wright, 1999). Així doncs, el posicionament longitudinal dels cromosomes al nucli dels espermatozoides podria determinar el tempo en que els dominis de cromatina són descondensats i remodelats. En conseqüència, el posicionament longitudinal dels cromosomes esdevindria un control epigenètic addicional influent, també, en els patrons d'expressió gènica en els estadis primerencs de l'embrió (Greaves et al. 2003, Zalensky i Zalenskaya 2007a).

D'altra banda, en aquest estudi s'observa un posicionament longitudinal no aleatori dels cromosomes al nucli dels espermatozoides de ratolí relacionat amb el contingut de GC.

Concretament, la relació estableix que els cromosomes amb més contingut de GC mostren més proporció de volum cromosòmic a la part basal del nucli. Aquest fet és interessant ja que, tenint en compte que s'ha postulat que el posicionament longitudinal podria ser important per l'alliberament dels cromosomes a l'ambient de l'ooplasmata matern (Zalensky i Zalenskaya 2007), els cromosomes amb més GC serien els últims en entrar i experimentar la remodelació i descondensació de la cromatina. A més, el fet que els cromosomes amb més GC es situen a la zona basal del nucli, possiblement, esdevingui un mecanisme de protecció de la càrrega gènica del nucli de l'espermatozoide. No obstant, els altres paràmetres cromosòmics que, de la mateixa manera que el contingut de GC també es relacionen amb l'activitat gènica -la densitat gènica i el percentatge de gens implicats en l'espermatogènesi-, no mostren una correlació amb el posicionament longitudinal dels cromosomes al nucli dels espermatozoides. Per aquest motiu, tot i que s'ha observat l'existència d'un posicionament longitudinal dels cromosomes no aleatori, no es tenen evidències clares de quins són els factors que condicionen aquest posicionament.

PERSPECTIVES FUTURES

Els resultats d'aquest projecte de tesi doctoral evidencien que el posicionament cromosòmic durant el procés de l'espermatogènesi no és aleatori i que aquest està directament relacionat amb els esdeveniments meiótics i de diferenciació així com amb la regulació de l'expressió gènica. Ambdues característiques determinen el posicionament radial, relatiu i longitudinal dels cromosomes evidenciant, així, la implicació funcional de la territorialitat cromosòmica en el desenvolupament del procés de l'espermatogènesi.

Per tant, en coherència amb aquest raonament, una alteració del posicionament cromosòmic durant el procés de l'espermatogènesi esdevindria en una desregulació del procés de l'espermatogènesi. De fet, s'han descrit alteracions¹³ del posicionament dels cromosomes a les cèl·lules germinals masculines d'individus amb problemes de fertilitat. No obstant, fins al moment, les dades que es tenien de la territorialitat cromosòmica en les cèl·lules germinals masculines i els espermatozoides eren escasses. De fet, per tal de realitzar estudis comparatius entre la territorialitat cromosòmic d'individus fèrtils amb la territorialitat cromosòmica d'individus amb problemes de fertilitat, la gran majoria d'investigadors tan sols treballaven amb grups de cromosomes concrets, fixant-se en un sol tipus de posicionament (radial, relatiu o

¹³ Apartat 1. Introducció, secció "Alteracions del patró de distribució dels territoris cromosòmics en l'espermatogènesi i la seva relació amb la infertilitat"

longitudinal) i en estadis concrets del procés de l'espermatogènesi. En aquest sentit, el desenvolupament d'aquest estudi ha permès descriure un model de la territorialitat cromosòmica en el procés de l'espermatogènesi i comprendre la dinàmica dels cromosomes integrant els paràmetres que la determinen. D'aquesta manera, s'ha establert un sòlid punt de partida per desenvolupar estudis encarats a: esbrinar la relació que hi ha entre el posicionament cromosòmic i la seva regulació gènica durant el procés de l'espermatogènesi, determinar si les alteracions del posicionament cromosòmic són una causa o bé una conseqüència de mostrar un procés de l'espermatogènesi anòmal i establir les conseqüències d'un posicionament cromosòmic alterat en la progressió de l'espermatogènesi i el desenvolupament embrionari.

A large, abstract splash of red watercolor paint occupies the top half of the page, with various shades of red and pink blending together. Below the splash, a large, light pink triangle points downwards, framing the text.

6. CONCLUSIONS

Primera

La metodologia desenvolupada permet l'estudi tridimensional del posicionament cromosòmic en cèl·lules germinals i espermatozoides de *Mus musculus*.

Segona

Els esdeveniments cromosòmics que condueixen a la recombinació meiótica determinen la dinàmica de posicionament dels cromosomes homòlegs des de l'etapa d'espermatogoni fins a l'etapa de paquitè.

- Els cromosomes homòlegs comparteixen el mateix territori cromosòmic abans d'iniciar la meiosi.
- L'estructura en *bouquet* condiona l'organització territorial del nucli a l'etapa de paquitè en funció de la mida cromosòmica. Els cromosomes més petits es localitzen preferentment a la part perifèrica del nucli i presenten associacions preferents.

Tercera

Existeixen evidències que indiquen que l'activitat gènica és un paràmetre que condiona el posicionament radial dels cromosomes durant tot el procés de l'espermatogènesi.

- La part interna del nucli presenta una concentració de material genètic superior al valor esperat tenint en compte el model de partició del volum nuclear aplicat.
- Els cromosomes amb més quantitat de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi van mostrar més volum cromosòmic a la zona mitja-interna del nucli. En el cas particular de les espermàtides rodones, els cromosomes amb més quantitat de gens implicats en l'espermioogènesi també van mostrar més volum cromosòmic a la zona mitja-interna del nucli.
- Els cromosomes sexuals presenten un posicionament nuclear dinàmic durant l'espermatogènesi directament relacionat amb el procés de formació de la vesícula sexual a profase I, i a la inactivació dels cromosomes sexuals en espermàtides rodones.

Quarta

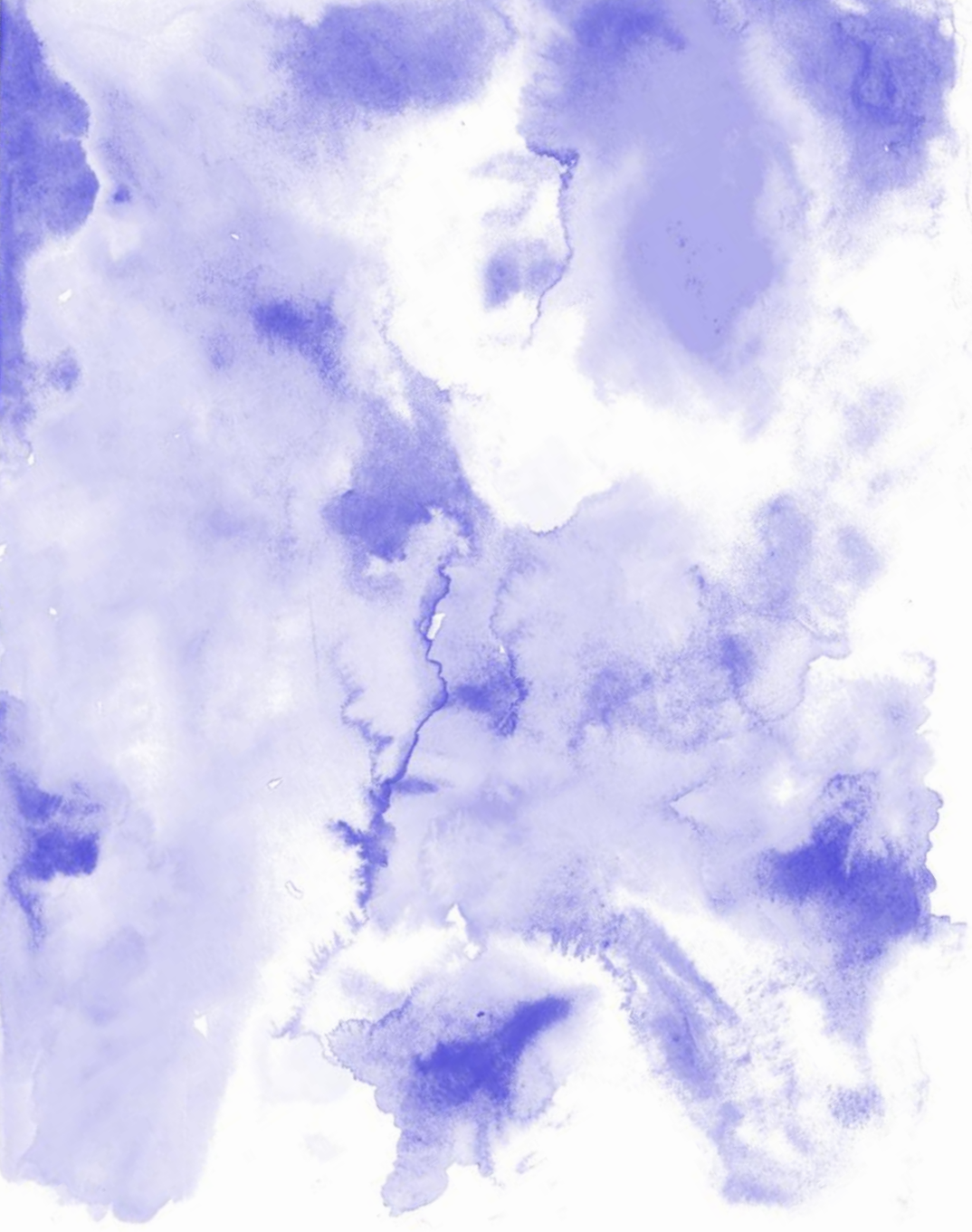
Les freqüències d'encavalcament entre parelles de cromosomes indiquen que les interaccions entre cromosomes al nucli de les cèl·lules germinals i dels espermatozoides no són aleatòries suggerint implicacions funcionals rellevants.

Cinquena

No s'han identificat factors que determinin la posició relativa dels cromosomes a excepció de l'efecte de la mida en espermàtides rodones. En aquest tipus cel·lular el cromocentre afavoreix les interaccions entre cromosomes de mida petita.

Sisena

El posicionament dels cromosomes respecte l'eix longitudinal del nucli dels espermatozoides no és aleatori.



BIBLIOGRAFIA

A

Albrechtová J, Albrecht T, Dureje L, Pallazola VA, Piálek J. **2014**. Sperm morphology in two house mouse subspecies: Do wild-derived strains and wild mice tell the same story? *PLoS ONE* 9: 1-15.

Alladin N, Moskovtsev SI, Russell H, Kenigsberg S, Lulat AGM, Librach CL. **2013**. The three-dimensional image analysis of the chromocenter in motile and immotile human sperm. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 59: 146-152.

Amann RP. **2008**. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: A need to revisit? *Journal of Andrology* 29: 469-487.

Anguera MC, Sun BK, Xu N, Lee JT. **2006**. X-chromosome kiss and tell: How the Xs go their separate ways. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 71: 429-437.

Apostolou E, Thanos D. **2008**. Virus Infection Induces NF- κ B-Dependent Interchromosomal Associations Mediating Monoallelic IFN- β Gene Expression. *Cell* 2: 85-96.

Atwood KC, Gluecksohn-Waelsch S, Yu MT, Henderson AS. **1976**. Does the t-locus in the mouse include ribosomal dna? *Cytogenetic and Genome Research* 17: 9-17.

B

Balhorn R. **1977**. Effects of aminophylline on the coronary vasodilation observed with adenosine, dipyridamole or following a brief coronary occlusion in the conscious dog. *Federation Proceedings* 16 (18): 4074-4080.

Balhorn R. **2007**. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology* 8:227

Bartholdi MF. **1991**. Nuclear distribution of centromeres during the cell cycle of human diploid fibroblasts. *Journal of cell science* 99 (Pt 2): 255-63.

Bauchau V. **1990**. Phylogenetic analysis of the distribution of chromosomal races of *Mus musculus domesticus* Ratty in Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* 41: 171-192.

Berrios S. **2017**. Nuclear Architecture of Mouse Spermatocytes: Chromosome Topology, Heterochromatin, and Nucleolus. *Cytogenetic and genome research* 151: 61-71.

Berrios S, Manterola M, Prieto Z, López-Fenner J, Page J, Fernández-Donoso R. **2010**. Model of chromosome associations in *Mus domesticus* spermatocytes. *Biological Research* 43: 275-285.

Biggiogera M, Kaufmann SH, Shaper JH, Gas N, Amalric F, Fakan S. **1991**. Distribution of nucleolar proteins B23 and nucleolin during mouse spermatogenesis. *Chromosoma* 100: 162-172.

Blackwood EM, Kadonaga JT. **1998**. Going the distance: A current view of enhancer action. *Science* 281: 60-63.

Boisvert FM, Van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. **2007**. The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 574-585.

Bolzer A, Craig JM, Cremer T, Speicher MR. **1999**. A complete set of repeat-depleted, PCR-amplifiable, human chromosome-specific painting probes. *Cytogenetics and cell genetics* 84: 233-240.

Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, Fauth C, Müller S, Eils R, Cremer C, Speicher MR, Cremer T. **2005**. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS biology* 3(5): e157.

Bornfleth H, Edelmann P, Zink D, Cremer T, Cremer C. **1999**. Quantitative motion analysis of subchromosomal foci in living cells using four-dimensional microscopy. *Biophysical journal* 77: 2871-86.

Boyle S, Gilchrist S, Bridger JM, Mahy NL, Ellis JA, Bickmore WA. **2001**. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerlin-mutant cells. *Human molecular genetics* 10: 211-9.

Boveri T. **1909**. Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalcephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. *Arch, für Zellf.* 3 (1-2): 184, 222-267

Branco MR, Pombo A. **2006**. Intermingling of Chromosome Territories in Interphase Suggests Role in Translocations and Transcription-Dependent Associations. *PLoS Biology* 4: e138.

Brianna Caddle L, Grant JL, Szatkiewicz J, Van Hase J, Shirley BJ, Bewersdorf J, Cremer C, Arneodo A, Khalil A, Mills KD. **2007**. Chromosome neighborhood composition determines translocation outcomes after exposure to high-dose radiation in primary cells. *Chromosome Research* 15: 1061-1073.

Bridger JM, Boyle S, Kill IR, Bickmore WA. **2000**. Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Current Biology* 10: 149-152.

Bridger JM, Kalla C, Wodrich H, Weitz S, King JA, Khazaie K, Kräusslich HG, Lichter P. **2005**. Nuclear RNAs confined to a reticular compartment between chromosome territories. *Experimental Cell Research* 302: 180-193.

Britton-Davidian J, Cazaux B, Catalan J. **2011**. Chromosomal dynamics of nucleolar organizer regions (NORs) in the house mouse: micro-evolutionary insights. *Heredity* 108: 68-74.

Burk RD, Szabo P, O'Brien S, Nash WG, Yu L, Smith KD. **1985**. Organization and chromosomal specificity of autosomal homologs of human Y chromosome repeated DNA. *Chromosoma* 92: 225-233.

C

Capanna E, Civitelli MV, Cristaldi M. **1977**. Chromosomal Rearrangement, Reproductive Isolation and Speciation in Mammals. The Case of *Mus Musculus*. *Bolletino di zoologia* 44: 213-246.

Capelson M, Liang Y, Schulte R, Mair W, Wagner U, Hetzer MW. **2010**. Chromatin-bound nuclear pore components regulate gene expression in higher eukaryotes. *Cell* 140: 372-83.

Cavalli G. **2007**. Chromosome kissing. *Current opinion in genetics & development* 17: 443-50.

- Chaly N, Munro SB. **1996**. Centromeres reposition to the nuclear periphery during L6E9 myogenesis in vitro. *Experimental Cell Research* 223: 274-278.
- Chepelev I, Wei G, Wangsa D, Tang Q, Zhao K. **2012**. Characterization of genome-wide enhancer-promoter interactions reveals co-expression of interacting genes and modes of higher order chromatin organization. *Cell Research* 22: 490-503.
- Chuang TCY, Moshir S, Garini Y, Chuang AYC, Young IT, Vermolen B, van den Doel R, Mougey V, Perrin M, Braun M, Kerr PD, Fest T, Boukamp P, Mai S. **2004**. The three-dimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells. *BMC biology* 2: 12.
- Codina-Pascual M, Navarro J, Oliver-Bonet M, Kraus J, Speicher MR, Arango O, Egozcue J, Benet J. **2006**. Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes. *Human reproduction (Oxford, England)* 21: 1490-7.
- Cortez D, Marin R, Toledo-Flores D, Froidevaux L, Liechti A, Waters PD, Grützner F, Kaessmann H. **2014**. Origins and functional evolution of Y chromosomes across mammals. *Nature* 508: 488-493.
- Crabbe L, Cesare AJ, Kasuboski JM, Fitzpatrick JAJ, Karlseder J. **2012**. Human telomeres are tethered to the nuclear envelope during postmitotic nuclear assembly. *Cell reports* 2: 1521-9.
- Cremer T, Cremer C, Baumann H, Luedtke EK, Sperling K, Teuber V, Zorn C. **1982**. Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Hum Genet* 60: 46–56.
- Cremer T, Cremer C, Schneider T, Baumann H, Hens L, Kirsch-Volders M. **1982**. Analysis of chromosome positions in the interphase nucleus of Chinese hamster cells by laser-UV-microirradiation experiments. *Hum Genet* 62: 201–209.
- Cremer T, Cremer C. **2006**. Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part I. The rise of chromosome territories. *European Journal Of Histochemistry* 50: 223-272.
- Cremer T, Cremer M. **2010**. Chromosome territories. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2: a003889.
- Cremer T, Cremer C, Baumann H, Luedtke EK, Sperling K, Teuber V, Zorn C. **1982**. Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Human Genetics* 60: 46-56.
- Cremer M, Grasser F, Lanctôt C, Müller S, Neusser M, Zinner R, Solovei I, Cremer T. **2012**. Multicolor 3D Fluorescence In Situ Hybridization for Imaging Interphase Chromosomes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*.205-239.
- Cremer M, Küpper K, Wagler B, Wizelman L, von Hase J, Weiland Y, Kreja L, Diebold J, Speicher MR, Cremer T. **2003**. Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *The Journal of cell biology* 162: 809-20.
- Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA. **1999**. Differences in the Localization and Morphology of Chromosomes in the Human Nucleus. *The Journal of Cell Biology* 145 (6): 1119-1131

Cullen K, MP K, Seyfred M. **1993**. Interaction between transcription regulatory regions of prol - ProQuest. Science 261: 203.

D

Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N. **2002**. Capturing chromosome conformation. Science 295: 1306-1311.

Dev VG, Tantravahi R, Miller DA, Miller OJ. **1977**. Nucleolus organizers in *Mus musculus* subspecies and in the rag mouse cell line. Genetics 86: 389-398.

Dietzel S, Zolghadr K, Hepperger C, Belmont AS. **2004**. Differential large-scale chromatin compaction and intranuclear positioning of transcribed versus non-transcribed transgene arrays containing β -globin regulatory sequences. Journal of Cell Science. 117: 4603-4614

Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu JS, Ren B. **2012**. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. Nature 485: 376-80.

DuPraw EJ, Bahr GF. **1969**. The arrangement of DNA in human chromosomes, as investigated by quantitative electron microscopy. Acta cytologica 13: 188-205.

Dyer KA, Canfield TK, Gartler SM. **1989**. Molecular cytological differentiation of active from inactive X domains in interphase: implications for X chromosome inactivation. Cytogenetics and cell genetics 50: 116-20.

E

Elliott B, Jasin M. **2002**. Human genome and diseases: Review double-strand breaks and translocations in cancer. Cellular and Molecular Life Sciences 59: 373-385.

Evans HJ, Buckland RA, Pardue ML. **1974**. Location of the genes coding for 18S and 28S ribosomal RNA in the human genome. Chromosoma 48: 405-426.

F

Federico C, Cantarella CD, Di Mare P, Tosi S, Saccone S. **2008**. The radial arrangement of the human chromosome 7 in the lymphocyte cell nucleus is associated with chromosomal band gene density. Chromosoma 117: 399-410.

Fedorova E, Zink D. **2009**. Nuclear genome organization: common themes and individual patterns. Current Opinion in Genetics & Development 19: 166-171.

Ferguson M, Ward DC. **1992**. Cell cycle dependent chromosomal movement in pre-mitotic human T-lymphocyte nuclei. Chromosoma 101: 557-65.

Filesi I, Gullotta F, Lattanzi G, D'Apice MR, Capanni C, Nardone AM, Columbaro M, Scarano G, Mattioli E, Sabatelli P, Maraldi NM, Biocca S, Novelli G. **2005**. Alterations of nuclear envelope and chromatin organization in mandibuloacral dysplasia, a rare form of laminopathy. *Physiological Genomics* 23: 150-158.

Finch KA, Fonseka KGL, Abogrein A, Ioannou D, Handyside AH, Thornhill AR, Hickson N, Griffin DK. **2008**. Nuclear organization in human sperm: preliminary evidence for altered sex chromosome centromere position in infertile males. *Human Reproduction* 23: 1263-1270.

Finlan LE, Sproul D, Thomson I, Boyle S, Kerr E, Perry P, Ylstra B, Chubb JR, Bickmore WA. **2008**. Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS genetics* 4: e1000039.

Foster HA, Abeydeera LR, Griffin DK, Bridger JM. **2005**. Non-random chromosome positioning in mammalian sperm nuclei, with migration of the sex chromosomes during late spermatogenesis. *Journal of cell science* 118: 1811-20.

Foster HA, Bridger JM. **2005**. The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. *Chromosoma* 114: 212-229.

Fraser P, Bickmore W. **2007**. Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* 447: 413-417.

G

Galiová G, Bártová E, Kozubek S. **2004**. Nuclear topography of β -like globin gene cluster in IL-3-stimulated human leukemic K-562 cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 33: 4-14.

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

Garagna S, Zuccotti M, Thornhill A, Fernandez-donoso R, Berríos S, Capanna E, Redi CA. **2001**. Alteration of nuclear architecture in male germ cells of chromosomally derived subfertile mice. *Journal of Cell Science* 114: 4429-4434.

Garcia-Quevedo L, Sarrate Z, Vidal F, Blanco J. **2012**. A sequential methodology that allows apoptotic cell sorting and FISH analysis in human testicular cells. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 58: 354-361.

Gazave E, Catalan J, Ramalhinho MG, Mathias ML, Nunes AC, Dumas D, Dritton-davidian J, Auffray JC. **2003**. The non-random occurrence of Robertsonian fusion in the house mouse. *Genetical Research* 81: 33-42.

Gillot I, Puel D, Lopez P. **2009**. Ret Finger Protein: An E3 Ubiquitin Ligase Juxtaposed to the XY Body in Meiosis. *International Journal of Cell Biology* Volume 2009, Article ID 524858, 9 pages.

Goetze S, Mateos-Langerak J, Gierman HJ, de Leeuw W, Giromus O, Indemans MHG, Koster J, Ondrej V, Versteeg R, van Driel R. **2007**. The Three-Dimensional Structure of Human Interphase Chromosomes Is Related to the Transcriptome Map. *Molecular and Cellular Biology* 27: 4475-4487.

Goldman RD, Goldman AE, Shumaker DK. **2005**. Nuclear lamins: building blocks of nuclear structure and function. *Novartis Foundation symposium* 264: 3-16; discussion 16-21, 227-30.

Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S. **2004**. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *European Journal of Biochemistry* 271: 3459-3469.

Grasser F, Neusser M, Fiegler H, Thormeyer T, Cremer M, Carter NP, Cremer T, Muller S. **2008**. Replication-timing-correlated spatial chromatin arrangements in cancer and in primate interphase nuclei. *Journal of Cell Science* 121: 1876-1886.

Greaves IK, Rens W, Ferguson-Smith MA, Griffin D, Marshall Graves JA. **2003**. Conservation of chromosome arrangement and position of the X in mammalian sperm suggests functional significance. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 11: 503-12.

Griffith J, Hochschild A, Ptashne M. **1986**. DNA loops induced by cooperative binding of lambda repressor. *Nature* 322: 750-2.

Griswold MD. **2016**. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological reviews* 96: 1-17.

Guelen L, Pagie L, Brasset E, Meuleman W, Faza MB, Talhout W, Eussen BH, de Klein A, Wessels L, de Laat W, van Steensel B. **2008**. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* 453: 948-51.

Guttenbach M, Martínez-Expósito MJ, Engel W, Schmid M. **1996**. Interphase chromosome arrangement in Sertoli cells of adult mice. *Biology of reproduction* 54: 980-6.

H

Haaf T, Ward DC. **1995**. Higher Order Nuclear Structure in Mammalian Sperm Revealed by in Situ Hybridization and Extended Chromatin Fibers. *Experimental Cell Research* 219: 604-611.

Handel MA. **2004**. The XY body: A specialized meiotic chromatin domain. *Experimental Cell Research* 296: 57-63.

Handel MA, Schimenti JC. **2010**. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nature Reviews Genetics* 11: 124-36.

Harper L, Golubovskaya I, Cande WZ, Bordoli SJ, Rines HW, Phillips RL, Sedat JW, Agard DA, Cande WZ. **2004**. A bouquet of chromosomes. *Journal of cell science* 117: 4025-32.

Harr JC, Luperchio TR, Wong X, Cohen E, Wheelan SJ, Reddy KL. **2015**. Directed targeting of chromatin to the nuclear lamina is mediated by chromatin state and A-type lamins. *Journal of Cell Biology* 208: 33-52.

Scherthan H, Bihler J, Kholi J. **1994**. Dynamics of Chromosome Organization and Pairing during Meiotic Prophase in Fission Yeast. *127: 273-285*.

Hazzouri M, Rousseaux S, Mongelard F, Usson Y, Pelletier R, Faure AK, Vourc'h C, Sèle B. **2000**. Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. *Molecular reproduction and development* 55: 307-15.

Henderson AS, Eicher EM, Yu MT, Atwood KC. **1974**. The chromosomal location of ribosomal DNA in the mouse. *Chromosoma* 49: 155-160.

Heride C, Ricoul M, Kiêu K, von Hase J, Guillemot V, Cremer C, Dubrana K, Sabatier L. **2010**. Distance between homologous chromosomes results from chromosome positioning constraints. *Journal of Cell Science* 123: 4063-4075.

Hernandez-Verdun D. **2006**. Nucleolus: From structure to dynamics. *Histochemistry and Cell Biology* 125: 127-137.

Hewitt SL, Yin B, Ji Y, Chaumeil J, Marszalek K, Tenthorey J, Salvagiotto G, Steinel N, Ramsey LB, Ghysdael J, Farrar MA, Sleckman BP, Schatz DG, Busslinger M, Bassing CH, Skok JA. **2010**. RAG-1 and ATM coordinate monoallelic recombination and nuclear positioning of immunoglobulin loci. *Nature Immunology* 10 (6): 655-666

Hiraoka Y, Dernburg AF. **2009**. The SUN Rises on Meiotic Chromosome Dynamics. *Developmental Cell* 17: 598-605.

Hiraoka Y, Dernburg AF, Parmelee SJ, Rykowski MC, Agard DA, Sedat JW, Sedat JW, Hiraoka Y, Dernburg AF, Parmelee SJ, Rykowski MC, Agard DA. **1993**. The Onset of Homologous Chromosome Pairing during *Drosophila melanogaster* Embryogenesis. *The Journal of Cell Biology* 120: 591-600.

Hübner MR, Eckersley-Maslin MA, Spector DL. 2013. Chromatin organization and transcriptional regulation. *Current opinion in genetics & development* 23: 89-95.

I

Iborra FJ, Pombo A, Jackson DA, Cook PR. **1996**. Active RNA polymerases are localized within discrete transcription factories in human nuclei. *Journal of cell science*: 1427-36.

Ioannou D, Griffin DK. **2011**. Male fertility, chromosome abnormalities, and nuclear organization. *Cytogenetic and Genome Research* 133: 269-279.

Ioannou D, Meershoek EJ, Christopikou D, Ellis M, Thornhill AR, Griffin DK. **2011**. Nuclear organisation of sperm remains remarkably unaffected in the presence of defective spermatogenesis. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 19: 741-53.

Ioannou D, Millan NM, Jordan E, Tempest HG. **2017**. A new model of sperm nuclear architecture following assessment of the organization of centromeres and telomeres in three-dimensions. *Scientific Reports* 7: 41585

Ioannou D, Tempest HG. **2018**. Does genome organization matter in spermatozoa? A refined hypothesis to awaken the silent vessel. *Systems Biology in Reproductive Medicine*: 1-17.

J

Jamin SP, Petit FG, Kervarrec C, Smagulova F, Illner D, Scherthan H, Primig M. **2017**. EXOSC10/Rrp6 is post-translationally regulated in Male germ cells and controls the onset of spermatogenesis. *Scientific Reports* 7: 1-15.

Jin F, Li Y, Dixon JR, Selvaraj S, Ye Z, Lee AY, Yen CA, Schmitt AD, Espinoza CA, Ren B. **2013**. A high-resolution map of the three-dimensional chromatin interactome in human cells. *Nature* 503: 290-4.

K

Kalverda B, Pickersgill H, Shloma V V., Fornerod M. **2010**. Nucleoporins Directly Stimulate Expression of Developmental and Cell-Cycle Genes Inside the Nucleoplasm. *Cell* 140: 360-371.

Kanaar R, Hoeijmakers JHJ, Van Gent DC. **1998**. Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends in Cell Biology* 8: 483-489.

Kemeny S, Tatout C, Salaun G, Pebrel-Richard C, Goumy C, Ollier N, Maurin E, Pereira B, Vago P, Gouas L. **2018**. Spatial organization of chromosome territories in the interphase nucleus of trisomy 21 cells. *Chromosoma* 127: 247-259.

Khalil A, Grant JL, Caddle LB, Atzema E, Mills KD, Arneodo A. **2007**. Chromosome territories have a highly nonspherical morphology and nonrandom positioning. *Chromosome Research* 15: 899-916.

Kierszenbaum AL, Tres LL, Hill C, Carolina N. **1975**. Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *The Journal Of Cell Biology* 65: 258-270.

Kind J, Pagie L, De Vries SS, Nahidiazar L, Dey SS, Bienko M, Zhan Y, Lajoie B, De Graaf CA, Amendola M, Fudenberg G, Imakaev M, Mirny LA, Jalink K, Dekker J, Van Oudenaarden A, Van Steensel B. **2015**. Genome-wide Maps of Nuclear Lamina Interactions in Single Human Cells. *Cell* 163: 134-147.

Kleinjan DA, van Heyningen V. **2005**. Long-Range Control of Gene Expression: Emerging Mechanisms and Disruption in Disease. *The American Journal of Human Genetics* 76: 8-32.

Koningsbruggen SV, Gierlinski M, Schofield P, Martin D, Barton GJ, Ariyurek Y, Dunnen JT, Lamond AI. **2014**. High-Resolution Whole-Genome Sequencing Reveals That Specific Chromatin Domains from Most Human Chromosomes Associate with Nucleoli. *Molecular Biology Of Cell* 21: 3735-3748.

Kosak ST, Skok JA, Medina KL, Riblet R. **2002**. Subnuclear compartmentalization of Ig Loci During Lymphocyte development. *296*: 158-163.

Krueger C, King MR, Krueger F, Branco MR, Osborne CS, Niakan KK, Higgins MJ, Reik W. **2012**. Pairing of homologous regions in the mouse genome is associated with transcription but not imprinting status. *PLoS ONE* 7.

Kurihara Y, Suh DS, Suzuki H, Moriwaki K. **1994**. Chromosomal locations of Ag-NORs and clusters of ribosomal DNA in laboratory strains of mice. *Mammalian Genome* 5: 225-228.

L

Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. **2007**. Dynamic genome architecture in the nuclear space: Regulation of gene expression in three dimensions. *Nature Reviews Genetics* 8: 104-115.

Larson EL, Vanderpool D, Keeble S, Zhou M, Sarver BAJ, Smith AD, Dean MD, Good JM. **2016**. Contrasting levels of molecular evolution on the mouse X chromosome. *Genetics* 203: 1841-1857.

Leitch AR, Brown JKM, Mosgöller W, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS. **1994**. The spatial localization of homologous chromosomes in human fibroblasts at mitosis. *Human Genetics* 93: 275-280.

Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC. **1988**. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ spression hybridization using recombinant DNA libraries. *Human Genetics* 80: 224-234.

Lomvardas S, Barnea G, Pisapia DJ, Mendelsohn M, Kirkland J, Axel R. **2006**. Interchromosomal Interactions and Olfactory Receptor Choice. *Cell* 126: 403-413.

Ludérus MEE, Van Steensel B, Chong L, Sibon OCM, Cremers FFM, De Lange T. **1996**. Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *Journal of Cell Biology* 135: 867-881.

Lukášová E, Kozubek S, Kozubek M, Falk M, Amrichová J. **2002**. The 3D structure of human chromosomes in cell nuclei. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 10: 535-48.

M

Maezawa S, Yukawa M, Alavattam KG, Barski A, Namekawa SH. **2017**. Dynamic reorganization of open chromatin underlies diverse transcriptomes during spermatogenesis. *Nucleic Acids Research* 46: 593-608.

Maharana S, Iyer KV, Jain N, Nagarajan M, Wang Y, Shivashankar GV. **2016**. Chromosome intermingling - the physical basis of chromosome organization in differentiated cells. *Nucleic Acids Research* 44: 5148-5160.

Mahy NL, Perry PE, Bickmore WA. **2002**. Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH. *Journal of Cell Biology* 159: 753-763.

Manuelidis L. 1985. Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization. *Human genetics* 71: 288-93.

Manvelyan M, Hunstig F, Bhatt S, Mrasek K, Pellestor F, Weise A, Simonyan I, Aroutiounian R, Liehr T. **2008**. Chromosome distribution in human sperm - a 3D multicolor banding-study. *Molecular cytogenetics* 1: 25.

Marchetti F, Aardema M, Beevers C, van Benthem J, Douglas GR, Godschalk R, Yauk CL, Young R, Williams A. **2018**. Simulation of mouse and rat spermatogenesis to inform genotoxicity testing using OECD test guideline 488. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 832-833: 19-28.

Marshall WF. **2003**. Gene expression and nuclear architecture during development and differentiation. *Mechanisms of Development* 120: 1217-1230.

Mayans C, Blanco J, Valero O, Vidal F, Sarrate Z. **2018**. Unpaired sex chromosomes in metaphase I human spermatocytes locally modify autosomal bivalents positioning. *Asian Journal of Andrology* 0: 0.

Meaburn KJ. **2016**. Spatial Genome Organization and Its Emerging Role as a Potential Diagnosis Tool. *Frontiers in genetics* 7: 134.

Meaburn KJ, Cabuy E, Bonne G, Levy N, Morris GE, Novelli G, Kill IR, Bridger JM. **2007**. Primary laminopathy fibroblasts display altered genome organization and apoptosis. *Aging cell* 6: 139-53.

Meaburn KJ, Misteli T. **2007**. Cell biology: Chromosome territories. *Nature* 445: 379-781.

Meistrich ML, Brock WA, Grimes SR, Platz RD, Hnilica LS. **1978**. Nuclear protein transitions during spermatogenesis. *Federation proceedings* 37: 2522-5.

Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M. **2003**. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111: 483-488.

Metz CW. Chromosome studies on the diptera II. The paired association of chromosomes in the diptera, and its significance. **1916**. *The Journal Of Experimental Zoology* 21 (2): 213-279

Metzler-Guillemain C, Mignon C, Depetris D, Guichaoua MR, Mattei MG. **1999**. Bivalent 15 regularly associates with the sex vesicle in normal male meiosis. *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 7: 369-78.

Meuleman W, Peric-hupkes D, Kind J, Beaudry J, Bernard, Pagie L, Kellis M, Reinders M, Wessels L, Steensel B Van. **2013**. Constitutive nuclear lamina – genome interactions are highly conserved and associated with A / T-rich sequence. *Genome research* 23: 270-280.

Meyer-Ficca M, Müller-Navia J, Scherthan H. **1998**. Clustering of pericentromeres initiates in step 9 of spermiogenesis of the rat (*Rattus norvegicus*) and contributes to a well defined genome architecture in the sperm nucleus. *Journal of cell science* 111: 1363-1370.

Miller D, Brinkworth M, Iles D. **2010**. Paternal DNA packaging in spermatozoa: More than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139: 287-301.

Mosgöller W, Leitch AR, Brown JKM, Heslop-Harrison JS. **1991**. Chromosome arrangements in human fibroblasts at mitosis. *Human Genetics* 88: 27-33.

Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JBM. **2010**. Disruption of telomere-telomere interactions associated with DNA damage in human spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 56: 407-412.

Mudrak OS, Nazarov IB, Jones EL, Zalensky AO. **2012**. Positioning of Chromosomes in Human Spermatozoa Is Determined by Ordered Centromere Arrangement. *PLoS ONE* 7.

Mudrak OS, Solovjeva L V., Chagin VO. **2013**. Organization of Chromosomes in Human Sperm Nucleus. *Human Interphase Chromosomes*. New York, NY: Springer New York, 139-159.

Mueller JL, Mahadevaiah SK, Park PJ, Warburton PE, Page DC, Turner JMA. **2008**. The mouse X chromosome is enriched for multicopy testis genes showing postmeiotic expression. *Nature Genetics* 40: 794-799.

Myllys M, Barnea G, Larabell CA. **2013**. NIH Public Access. 151: 724-737.

N

Nachman MW, Searle JB. **1995**. Why is the house mouse karyotype so variable? *Trends in Ecology & Evolution* 10: 397-402.

Namekawa SH, Park PJ, Zhang LF, Shima JE, McCarrey JR, Griswold MD, Lee JT. **2006**. Postmeiotic Sex Chromatin in the Male Germline of Mice. *Current Biology* 16: 660-667.

Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. **2016**. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 59: 10-26.

Nguyen HQ, Bosco G. **2015**. Gene Positioning Effects on Expression in Eukaryotes. *Annual review of genetics* 49: 627-46.

O

Oakberg EF. **1956**. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *American Journal of Anatomy* 99: 391-413.

Olszewska M, Wiland E, Kurpisz M. **2008**. Positioning of chromosome 15, 18, X and Y centromeres in sperm cells of fertile individuals and infertile patients with increased level of aneuploidy. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 16: 875-90.

P

Page SL, Hawley RS. **2004**. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annual review of cell and developmental biology* 20: 525-58.

Parada LA, McQueen PG, Misteli T. **2004**. Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome biology* 5: R44.

Parada LA, McQueen PG, Munson PJ, Misteli T. **2002**. Conservation of relative chromosome positioning in normal and cancer cells. *Current Biology* 12: 1692-1697.

Parada LA, Sotiriou S, Misteli T. **2004**. Spatial genome organization. *Experimental Cell Research* 296: 64-70.

Peric-Hupkes D, Meuleman W, Pagie L, Bruggeman SWM, Solovei I, Brugman W, Gräf S, Flicek P, Kerkhoven RM, van Lohuizen M, Reinders M, Wessels L, van Steensel B. **2010**. Molecular Maps of the Reorganization of Genome-Nuclear Lamina Interactions during Differentiation. *Molecular Cell* 38: 603-613.

Piálek J, Hauffe HC, Searle JB. **2005**. Chromosomal variation in the house mouse. *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 535-563.

Pickersgill H, Kalverda B, de Wit E, Talhout W, Fornerod M, van Steensel B. **2006**. Characterization of the *Drosophila melanogaster* genome at the nuclear lamina. *Nature Genetics* 38: 1005-1014.

Pliss A, Fritz AJ, Stojkovic B, Ding H, Mukherjee L, Bhattacharya S, Xu J, Berezney R. **2015**. Non-random patterns in the distribution of NOR-bearing chromosome territories in human fibroblasts: A network model of interactions. *Journal of Cellular Physiology* 230: 427-439.

R

Rabl C. **1885**. Über Zelltheilung. *Morph Jb* 10: 214–330.

Ramírez MJ, Surrallés J. **2009**. Laser confocal microscopy analysis of human interphase nuclei by three-dimensional FISH reveals dynamic perinucleolar clustering of telomeres. *Cytogenetic and Genome Research* 122: 237-242.

Rao SSP, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, Sanborn AL, Machol I, Omer AD, Lander ES, Aiden EL. **2014**. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* 159: 1665-80.

Reddy KL, Zullo JM, Bertolino E, Singh H. **2008**. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* 452: 243-247.

Roix JJ, McQueen PG, Munson PJ, Parada LA, Misteli T. **2003**. Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nature Genetics* 34: 287-291.

Roy SS, Mukherjee AK, Chowdhury S. **2018**. Insights about genome function from spatial organization of the genome. *Human Genomics* 12: 8.

S

Sarrate Z, Blanco J, Vidal F. **2012**. Acrocentric bivalents positioned preferentially nearby to the XY pair in metaphase I human spermatocytes. *Fertility and Sterility* 98: 1241-1245.

Schardin M, Cremer T, Hager HD, Lang M. **1985**. Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. *Human Genetics* 71: 281-287.

Scherthan H. **2001**. A bouquet makes ends meet. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 621-627.

Scherthan H. **2009**. Analysis of Telomere Dynamics in Mouse Spermatogenesis. *Meiosis, Volume 2, Cytological Methods* 558: 383-399.

- Scherthan Weich, S. Schwegler, H. Heyting, C., Harle, M. H, Cremer T. **1996**. Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of pairing. *J.Cell.Biol* 134: 1109-1125.
- Scherthan H, Weich S, Schwegler H, Heyting C, Härle M, Cremer T. **1996**. Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *Journal of Cell Biology* 134: 1109-1125.
- Schones DE, Cui K, Cuddapah S. **2011**. Genome-wide approaches to studying yeast chromatin modifications. *Methods in Molecular Biology* 759: 61-71.
- Selvaraj S, R Dixon J, Bansal V, Ren B. **2013**. Whole-genome haplotype reconstruction using proximity-ligation and shotgun sequencing. *Nature biotechnology* 31: 1111-1118.
- Shibuya H, Watanabe Y. **2014**. The meiosis-specific modification of mammalian telomeres. *Cell Cycle* 13: 2024-2028.
- Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D. **2008**. Nucleolus: The fascinating nuclear body. *Histochemistry and Cell Biology* 129: 13-31.
- Sklyar I, Iarovaia O V., Gavrilov AA, Pichugin A, Germini D, Tsfasman T, Caron G, Fest T, Lipinski M, Razin S V., Vassetzky YS. **2016**. Distinct Patterns of Colocalization of the CCND1 and CMYC Genes with Their Potential Translocation Partner IGH at Successive Stages of B-Cell Differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 117: 1506–1510.
- Smith A, Fraser IS, Elliott G. **1979**. An infertile male with balanced Y;19 translocation. Review of Y; autosome translocations. *Annales de genetique* 22: 189-194.
- Solari AJ. **1974**. The behavior of the XY pair in mammals. *IntRev Cytol* 38:273-317.
- Solé M, Blanco J, Valero O, Vergés L, Vidal F, Sarrate Z. **2017**. Altered bivalent positioning in metaphase I human spermatocytes from Robertsonian translocation carriers. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*: 1-8.
- Solovei I, Cavallo A, Schermelleh L, Jaunin F, Scasselati C, Cmarko D, Cremer C, Fakan S, Cremer T. **2002**. Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH). *Experimental Cell Research* 276: 10-23.
- Soutoglou E, Misteli T. **2008**. On the contribution of spatial genome organization to cancerous chromosome translocations. *Journal of the National Cancer Institute - Monographs* 20892: 16-19.
- Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T, Lee GR, Flavell RA. **2005**. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* 435: 637-645.
- Stack SM, Brown DB, Dewey WC. **1977**. Visualization of interphase chromosomes. *Journal of cell science* 26: 281-99.
- Sun H Bin, Shen J, Yokota H. **2000**. Size-Dependent Positioning of Human Chromosomes in Interphase Nuclei. *Biophysical Journal* 79: 184-190.

T

Tagawa Y, Nanashima a, Yasutake T, Hatano K, Nishizawa-Takano JE, Ayabe H. **1997**. Differences in spatial localization and chromatin pattern during different phases of cell cycle between normal and cancer cells. *Cytometry* 27: 327-35.

Takizawa T, Gudla PR, Guo L, Lockett S, Misteli T. **2008**. Allele-specific nuclear positioning of the monoallelically expressed astrocyte marker GFAP. *Genes & Development* 22: 489-498.

Tanabe H, Habermann FA, Solovei I, Cremer M, Cremer T. **2002**. Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mutation research* 504: 37-45.

Tanemura K, Ogura A, Cheong C, Gotoh H, Matsumoto K, Sato E, Hayashi Y, Lee HW, Kondo T. **2005**. Dynamic rearrangement of telomeres during spermatogenesis in mice. *Developmental Biology* 281: 196-207.

Tempest HG. **2011**. Meiotic recombination errors, the origin of sperm aneuploidy and clinical recommendations. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 57: 93-101.

Therizols P, Illingworth RS, Courilleau C, Boyle S, Wood AJ, Bickmore WA. **2014**. Chromatin decondensation is sufficient to alter nuclear organization in embryonic stem cells. *Science* 346: 1238-1242.

Towbin BD, Meister P, Pike BL, Gasser SM. **2010**. Repetitive transgenes in *C. elegans* accumulate heterochromatic marks and are sequestered at the nuclear envelope in a copy-number and lamin-dependent manner. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 75: 555-565.

V

Vergés L, Blanco J, Valero O, Vidal F, Sarrate Z. **2014**. Chromosome size, morphology, and gene density determine bivalent positioning in metaphase I human spermatocytes. *Fertility and Sterility* 101 (3): 818-824

Vermolen BJ, Garini Y, Mai S, Mougey V, Fest T, Chuang TCY, Chuang AYC, Wark L, Young IT. **2005**. Characterizing the three-dimensional organization of telomeres. *Cytometry Part A* 67: 144-150.

Verschure PJ, van der Kraan I, Enserink JM, Moné MJ, Manders EMM, van Driel R. **2002**. Large-scale Chromatin Organization and the Localization of Proteins Involved in Gene Expression in Human Cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50: 1303-1312.

Verschure PJ, van Der Kraan I, Manders EM, van Driel R. **1999**. Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories. *The Journal of cell biology* 147: 13-24.

Vietri Rudan M, Barrington C, Henderson S, Ernst C, Odom DT, Tanay A, Hadjur S. **2015**. Comparative Hi-C Reveals that CTCF Underlies Evolution of Chromosomal Domain Architecture. *Cell Reports* 10: 1297-1309.

Volpi E V, Chevret E, Jones T, Vatcheva R, Williamson J, Beck S, Campbell RD, Goldsworthy M, Powis SH, Ragoussis J, Trowsdale J, Sheer D. **2000**. Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and

other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *Journal of cell science* 113: 1565-1576.

Vourc'h C, Taruscio D, Boyle AL, Ward DC. **1993**. Cell Cycle-Dependent Distribution of Telomeres, Centromeres, and Chromosome-Specific Subsatellite Domains in the Interphase Nucleus of Mouse Lymphocytes. *Experimental Cell Research* 205: 142-151.

W

Wandall A, Svendsen A. **1985**. Transition from somatic to meiotic pairing and progression changes of the synaptonemal complex in spermatocytes of *Aedes aegypti*. 199: 254-264.

Ward WS, Coffey DS. 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of reproduction* 44: 569-74.

Weierich C, Brero A, Stein S, Von Hase J, Cremer C, Cremer T, Solovei I. **2003**. Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes. *Chromosome Research* 11: 485-502.

Wen B, Wu H, Shinkai Y. **2009**. Large organized chromatin K9-modifications (LOCKs) distinguish differentiated from embryonic stem cells. *Nature genetics* 41: 246-250.

Wiland E, Zegała M, Kurpisz M. **2008**. Interindividual differences and alterations in the topology of chromosomes in human sperm nuclei of fertile donors and carriers of reciprocal translocations. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 16: 291-305.

Williams RRE, Broad S, Sheer D, Ragoussis J. **2002**. Subchromosomal Positioning of the Epidermal Differentiation Complex (EDC) in Keratinocyte and Lymphoblast Interphase Nuclei. *Experimental Cell Research* 272: 163-175.

Williams A, Spilianakis CG, Flavell RA. **2010**. Interchromosomal association and gene regulation in trans. *Trends in Genetics* 26: 188-197.

Wischnitzer S. 1973. The Submicroscopic Morphology of the Interphase Nucleus. *International Review of Cytology* 34: 1-48.

Wollenberg C, Kiefaber MP, Zang KD. **1982**. Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes. IX. Arrangement of chromosomes with and without spindle apparatus. *Human genetics* 62: 310-5.

Y

Yoshida K, Muratani M, Araki H, Miura F, Suzuki T, Dohmae N, Katou Y, Shirahige K, Ito T, Ishii S. **2018**. Mapping of histone-binding sites in histone replacement-completed spermatozoa. *Nature Communications*: 1-11.

Z

Zalenskaya IA, Zalensky AO. **2004**. Non-random positioning of chromosomes in human sperm nuclei. *Chromosome Research* 12: 163-173.

Zalensky AO, Allen MJ, Kobayashi A, Zalenskaya IA, Balhorn R, Bradbury EM. **1995**. Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. *Chromosoma* 103: 577-590.

Zalensky AO, Breneman JW, Zalenskaya IA, Brinkley BR, Bradbury EM. **1993**. Organization of centromeres in the decondensed nuclei of mature human sperm. *Chromosoma* 102: 509-518.

Zeitzi MJ, Mukherjee L, Bhattacharya S, Xu J, Berezney R. **2009**. A probabilistic model for the arrangement of a subset of human chromosome territories in WI38 Human fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology* 221: 120-129.

Zickler D, Kleckner N. **2016**. A Few of Our Favorite Things: Pairing, the Bouquet, Crossover Interference and Evolution of Meiosis. *Semin Cell Dev* 54: 135–148

Zickler D, Kleckner N. **1998**. The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annual review of genetics* 32: 619-697.

Zickler D, Kleckner N. **2015**. Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7: a016626.

Zirbel RM, Mathieu UR, Kurz A, Cremer T, Lichter P. **1993**. Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries. *Chromosome Research* 1: 93-106.



ANNEX

ANNEX 1

Protocol 1: Disgregació del teixit testicular

Medi 1

Complementar el medi de cultiu RPMI 1640 + L-Glutamina (GibCo, Invitrogen. Paisley, Regne Unit) amb:

1 mg/ml col·lagenasa tipus I (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Alemanya)

Medi 2

Complementar el medi de cultiu RPMI 1640 + L-Glutamina amb:

6 µg/ml de tripsina 1X (0,3 µl/ml) (GibCo, Invitrogen)

2 mM de EDTA disòdic dihidratat (Fluka Chemie GmbH, Suïssa)

16 µg/ml d'hialorunidasa tipus IV (Sigma-Aldrich GmbH)

0,4 µg/ml de DNAsa I recombinant (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanya)

0,2 mM de piruvat sòdic (Sigma-Aldrich GmbH)

Medi 3

Complementar el medi de cultiu RPMI 1640 + L-Glutamina amb:

Sèrum boví fetal al 10 % (PAA Laboratories GmbH. Pasching, Àustria)

ANNEX 2

```

run("Split Channels");
run("Set Scale...", "distance=1 known=1 pixel=1 unit=pixel global");
run("Duplicate...", "duplicate");

//run("Threshold...");
setAutoThreshold("RenyiEntropy dark");

setSlice(30);
waitForUser("TH");
//run("Threshold...");
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask", "method=Default background=Default");
run("Options...", "iterations=1 count=1 do=Close stack");
run("Options...", "iterations=1 count=1 do=Erode stack");
run("Options...", "iterations=3 count=1 do=Close stack");
run("Options...", "iterations=3 count=1 do=[Fill Holes] stack");
doCommand("Start Animation [\\]");
waitForUser("TH");
run("Stop Animation");
run("Put Behind [tab]");

setSlice(30);
waitForUser("TH");
//run("Threshold...");
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask", "method=Default background=Default");
run("Options...", "iterations=1 count=1 do=Close stack");
run("Options...", "iterations=1 count=1 do=Erode stack");
doCommand("Start Animation [\\]");
waitForUser("TH");
run("Stop Animation");
run("Put Behind [tab]");

setSlice(30);
waitForUser("TH");
//run("Threshold...");
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask", "method=Default background=Default");
run("Options...", "iterations=1 count=1 do=Close stack");
run("Options...", "iterations=1 count=1 do=Erode stack");
doCommand("Start Animation [\\]");
waitForUser("TH");
run("Stop Animation");
run("Put Behind [tab]");

```

```
setSlice(30);
waitForUser("TH");
//run("Threshold...");
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask", "method=Default background=Default");
run("Options...", "iterations=1 count=1 do=Close stack");
run("Options...", "iterations=1 count=1 do=Erode stack");
doCommand("Start Animation [\\]");
waitForUser("TH");
run("Stop Animation");
run("Put Behind [tab]");

run("Options...", "iterations=2 count=1 do=Close stack");
run("Put Behind [tab]");

run("Options...", "iterations=2 count=1 do=Close stack");
run("Put Behind [tab]");

run("Options...", "iterations=2 count=1 do=Close stack");
run("Put Behind [tab]");

run("Options...", "iterations=2 count=1 do=Close stack");
run("Put Behind [tab]");

run("AVI... ", "frame=30");
run("Put Behind [tab]");

run("AVI... ", "frame=30");
run("Put Behind [tab]");

run("AVI... ", "frame=30");
run("Put Behind [tab]");

run("AVI... ", "frame=30");
run("Put Behind [tab]");

run("Close All");
```

