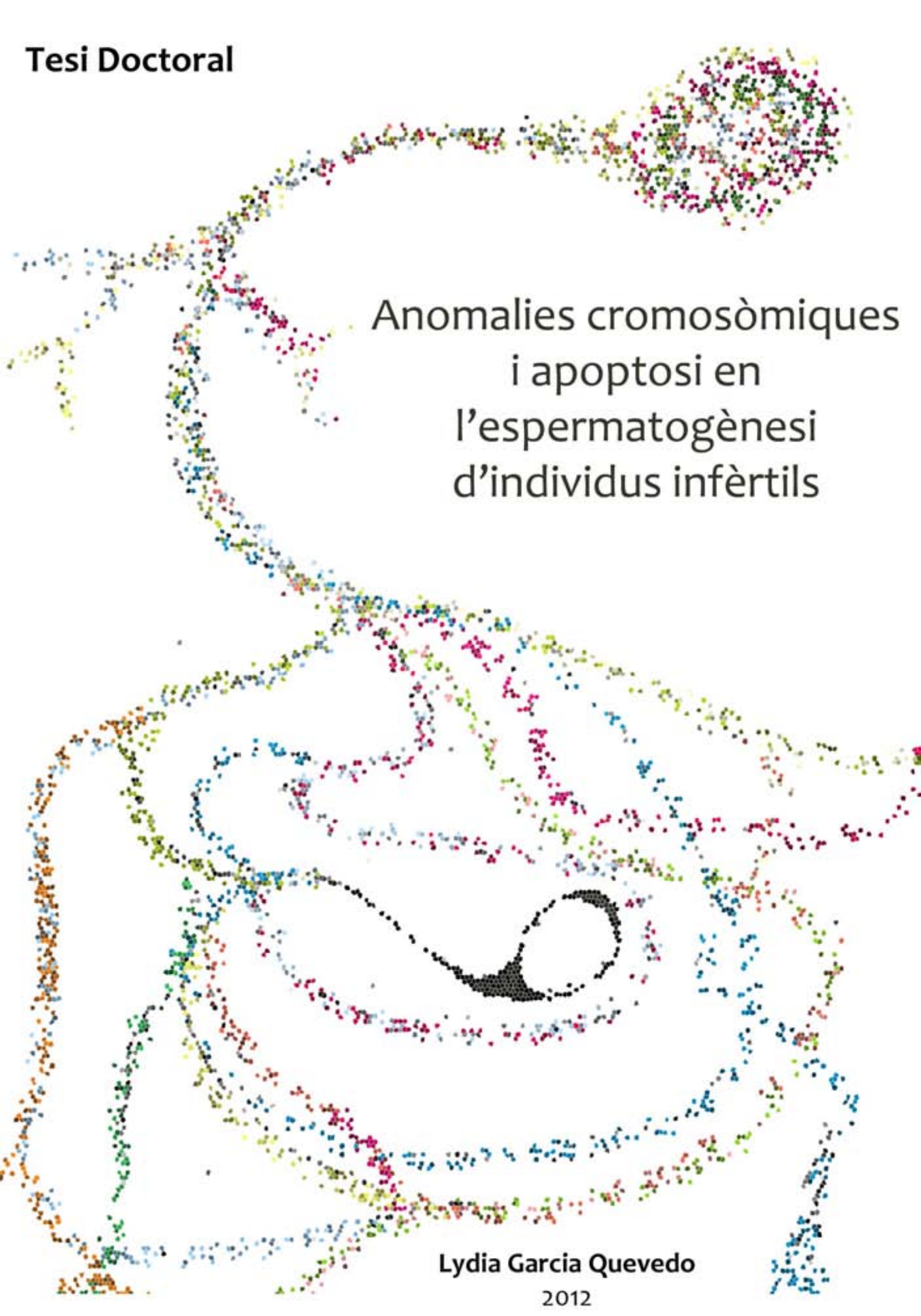


Tesi Doctoral



**Anomalies cromosòmiques
i apoptosi en
l'espermatogènesi
d'individus infèrtils**

Lydia Garcia Quevedo

2012

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Facultat de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona

Anomalies cromosòmiques i apoptosi en l'espermatogènesi d'individus infèrtils

Memòria presentada per

Lydia Garcia Quevedo

Per optar al **Grau de Doctor**

per la **Universitat Autònoma de Barcelona**

Bellaterra, 2012

Directors:

Dra. Francesca Vidal Domínguez i Dr. Joan Blanco Rodríguez

La **Dra. Francesca Vidal Domínguez**, catedràtica del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona i el **Dr. Joan Blanco Rodríguez**, professor agregat del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFIQUEN:

Que **Lydia Garcia Quevedo** ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació que s'exposa en la memòria titulada "**Anomalies cromosòmiques i apoptosi en l'espermatogènesi d'individus infèrtils**" per optar al grau de Doctor 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 per que consti signem el present certificat

Dra. Francesca Vidal Domínguez

Dr. Joan Blanco Rodríguez

Bellaterra, 21 de maig de 2012

Aquest treball s'ha realitzat amb el finançament dels projectes:

- SGR2009-0282, Generalitat de Catalunya.
- Projecte 180034, Universitat Autònoma de Barcelona.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1 CARACTERÍSTIQUES GENERALS DE L'ESPERMATOGÈNESI.....	3
1.1.1 Etapes de l'espermatogènesi	4
1.1.1.1 Proliferació mitòtica	4
1.1.1.2 Meiosi	5
1.1.1.3 Espermiogènesi	9
1.2 CONTROL DE L'ESPERMATOGÈNESI.....	9
1.2.1 Proliferació mitòtica	9
1.2.2 Meiosi	13
1.2.2.1 Punt de control de sinapsi i recombinació.....	14
1.2.2.2 Punt de control d'assemblatge del fus meiótic (SAC meiótic).....	15
1.2.3 Expressió postmeiótica.....	16
1.3 CONCEPTES GENERALS DE LA MORT CEL·LULAR PROGRAMADA.....	17
1.3.1 Canvis Morfològics.....	17
1.3.2 Mecanismes moleculars	18
1.3.3 Detecció d'apoptosi	20
1.4 APOPTOSI EN TEXIT TESTICULAR	21
1.5 INFERTILITAT MASCULINA, ANOMALIES CROMOSÒMIQUES I APOPTOSI	24
2. OBJECTIUS.....	27
3. MATERIAL I MÈTODES	31
3.1 MOSTRES BIOLÒGIQUES	33
3.2 METODOLOGIA	35
3.2.1 Disgregació enzimàtica	35
3.2.2 Marcatge específic d'apoptosi i necrosi	37
3.2.2.1 Criteris d'anàlisi	38

3.2.3	Selecció mitjançant citometria de flux	40
3.2.4	Fixació cel·lular	44
3.2.5	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH)	45
3.2.5.1	<i>3.2.5.1 Criteris d'anàlisi</i>	48
3.3	ANÀLISI DELS RESULTATS	50
3.3.1	Anàlisi estadística poblacional.....	51
3.3.1.1	<i>3.3.1.1 Estudi bivariant</i>	51
3.3.1.2	<i>3.3.1.2 Estudi longitudinal</i>	51
3.3.2	Anàlisi estadística individual.....	52
4.	RESULTATS	53
4.1	OPTIMITZACIÓ DE LA METODOLOGIA	55
4.2	ANÀLISI DE LA POBLACIÓ D'ESTUDI	57
4.2.1	Disgregació enzimàtica	57
4.2.2	Marcatge específic d'apoptosi i necrosi	58
4.2.3	Selecció mitjançant citometria de flux	59
4.2.4	Fixació cel·lular i Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH).....	60
4.3	ANÀLISI DELS RESULTATS	63
4.3.1	Anàlisi estadística poblacional.....	63
4.3.1.1	<i>4.3.1.1 Estudi bivariant</i>	63
4.3.1.2	<i>4.3.1.2 Estudi longitudinal</i>	65
4.3.2	Anàlisi estadística individual.....	67
4.3.3	Relació entre l'anàlisi de clústers i les dades clíniques	69
5.	DISCUSSIÓ	71
5.1	CONSIDERACIONS METODOLÒGIQUES	73
5.1.1	Disgregació enzimàtica	73
5.1.2	Marcatge específic d'apoptosi i necrosi	74
5.1.3	Selecció mitjançant citometria de flux	74
5.1.4	Fixació cel·lular	76

5.1.5	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH)	77
5.2	ANÀLISI DE LA POBLACIÓ D'ESTUDI	78
5.2.1	Cèl·lules germinals prereduccionals	78
5.2.2	Cèl·lules de Sertoli	80
5.2.3	Cèl·lules en profase I.....	80
5.2.4	Cèl·lules germinals postreduccionals	82
5.2.5	Espermatozoides	83
5.3	RELACIÓ ENTRE L'ANÀLISI DE CLÚSTERS I LES DADES CLÍNIQUES	84
6.	CONCLUSIONS	85
7.	BIBLIOGRAFIA.....	89
ANNEXES	105
	Annex I: medis i solucions de treball.....	107
	Annex II: informe del servei d'estadística aplicada.....	113



INTRODUCCIÓ

1.1 CARACTERÍSTIQUES GENERALS DE L'ESPERMATOGÈNESI

L'espermatogènesi és el procés pel qual les cèl·lules germinals diploides masculines es diferencien per donar lloc als espermatozoides. És un procés continu que té lloc als túbuls seminífers i s'inicia en assolir la pubertat.

Els túbuls seminífers tenen una estructura cilíndrica i inclouen les cèl·lules germinals i les cèl·lules de Sertoli. A l'espai intersticial que envolta els túbuls es localitzen les cèl·lules de Leydig tot formant grups que envolten els capil·lars sanguinis. Les cèl·lules de Sertoli i les de Leydig són les cèl·lules somàtiques de suport que arriben a la maduració a l'inici de la pubertat. Les cèl·lules de Sertoli són les responsables de la nutrició, l'adhesió i el transport de les cèl·lules germinals en el túbul seminífer. Les cèl·lules de Leydig subministren els andrògens necessaris per al desenvolupament de les cèl·lules germinals durant les diferents etapes de l'espermatogènesi (Holstein *et al.* 2003).

El control endocrí de l'espermatogènesi (**figura 1.1**) s'inicia a l'hipotàlem, on se segrega l'hormona alliberadora de les gonadotrofines (GnRH). Aquesta és responsable d'induir a la pituitària anterior l'alliberament de l'hormona luteïnitzant (LH) i l'hormona fol·liculostimulant (FSH) que tenen com a diana les cèl·lules de Leydig i les cèl·lules de Sertoli, respectivament. Les cèl·lules de Leydig sintetitzen testosterona, que actua principalment sobre les cèl·lules de Sertoli. L'FSH, juntament amb la testosterona, estimula la producció de senyals de suport des de les cèl·lules de Sertoli cap a les cèl·lules germinals. Per a la correcta regulació de la producció de les gonadotrofines cal una retroalimentació negativa sobre la secreció d'LH, FSH i GnRH exercida mitjançant la inhibina, que és produïda per les cèl·lules de Sertoli, i la testosterona (**figura 1.1**).

L'espermatogènesi es pot dividir en tres etapes: la proliferació mitòtica, la meiosi i l'espermioènesi. En finalitzar l'espermatogènesi els espermatozoides són alliberats al lumen dels túbuls seminífers (procés d'espermioènesi) i s'acumulen a l'epidídim. La regulació de l'espermioènesi depèn de senyals provinents de les cèl·lules de Sertoli, de les cèl·lules de Leydig i de les cèl·lules peritubulars, i provoca el trencament de les estructures i les unions d'ancoratge de l'espermatozoide amb les cèl·lules de Sertoli. (revisat per Amann 2008; revisat per Sofikitis *et al.* 2008).

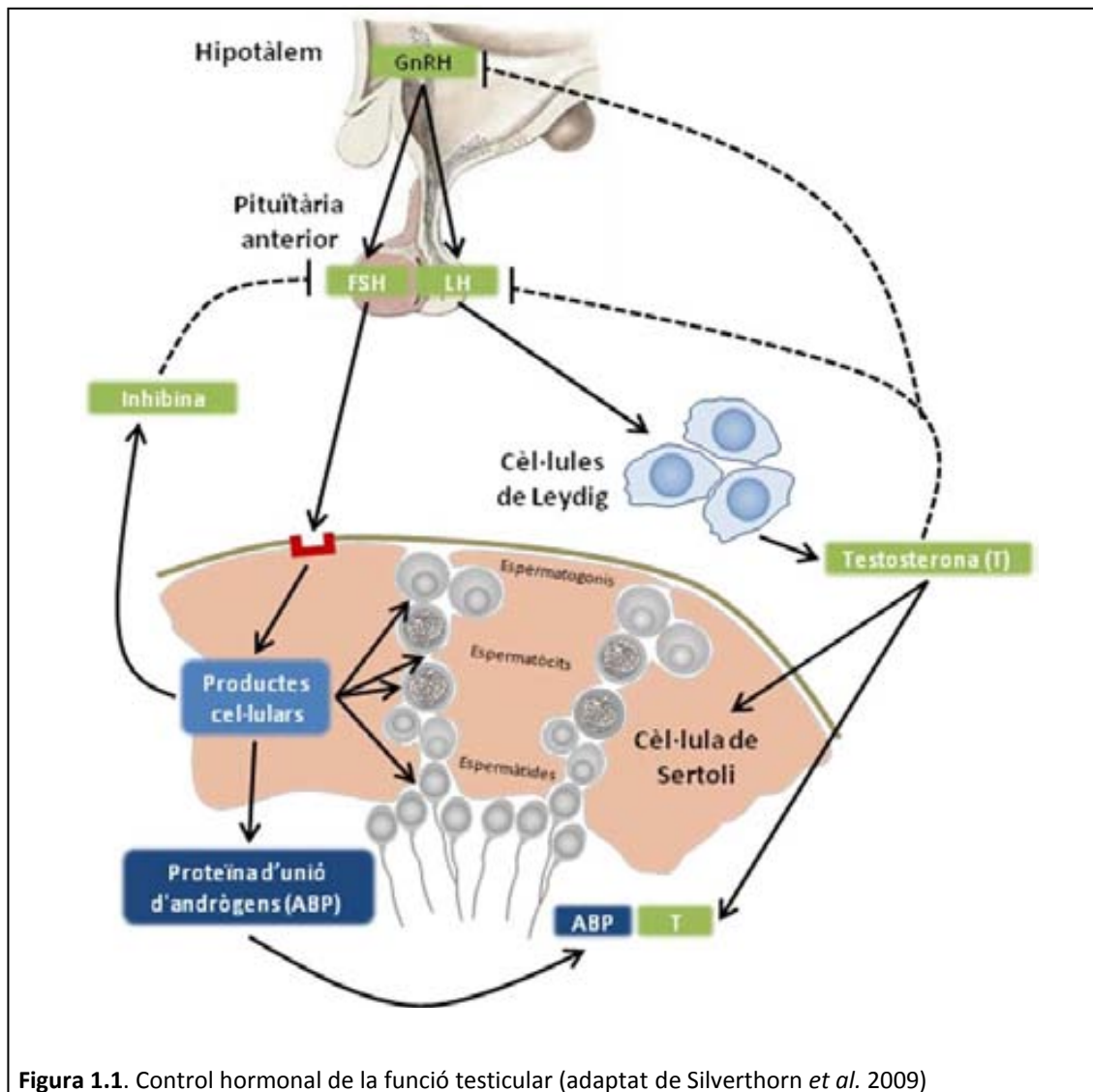


Figura 1.1. Control hormonal de la funció testicular (adaptat de Silverthorn *et al.* 2009)

1.1.1 Etapes de l'espermatogènesi

1.1.1.1 Proliferació mitòtica

La proliferació mitòtica fa referència a les divisions dels espermatogonis en els túbuls seminífers. Durant la vida fèrtil de l'individu, els espermatogonis A_{foscos} , també anomenats cèl·lules mare d'espermatogonis, s'autorenoven per mantenir la reserva de cèl·lules mare germinals. Algunes divisions dels espermatogonis A_{foscos} originaran els espermatogonis $A_{\text{pàl·lids}}$. En el testicle adult la fase de proliferació mitòtica la duen a terme els espermatogonis $A_{\text{pàl·lids}}$, que proliferen per mantenir una reserva constant d'aquest tipus cel·lular. Alguns espermatogonis $A_{\text{pàl·lids}}$ són dirigits per donar lloc als

espermatogonis B (**figura 1.2**) els quals es diferenciarien en espermatòcits primaris i iniciaran la meiosi.

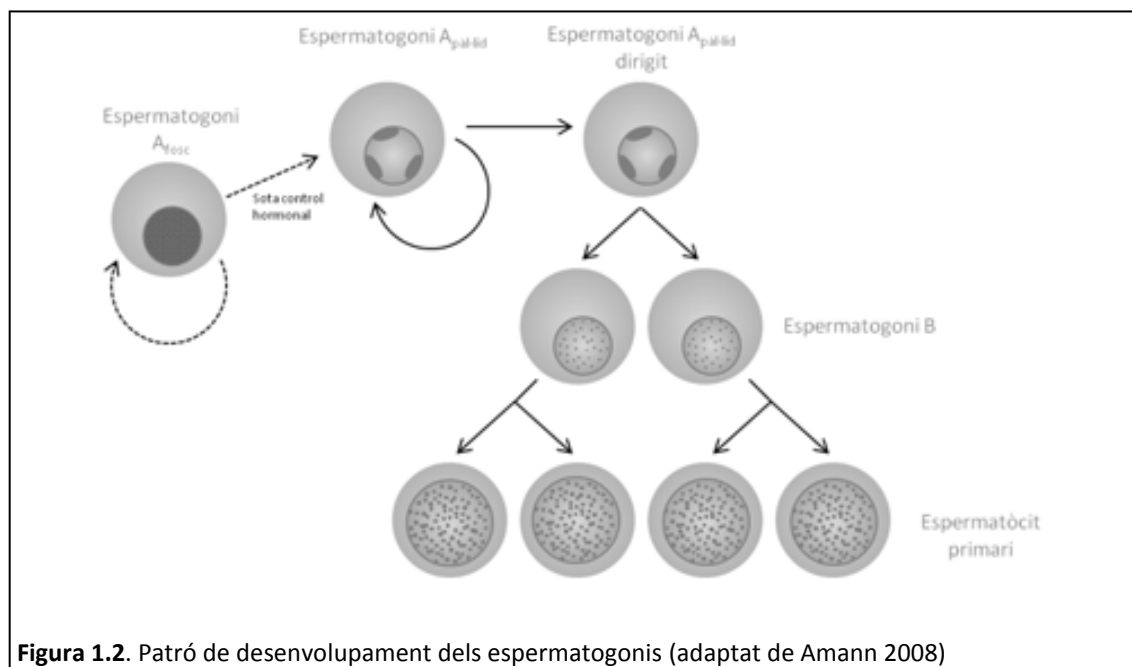


Figura 1.2. Patró de desenvolupament dels espermatogonis (adaptat de Amann 2008)

Les cèl·lules que provenen d'un espermatogoni $A_{pàlid}$ dirigit es mantenen connectades mitjançant canals citoplasmàtics i donen lloc a un sincici d'espermatòcits primaris. Actualment no es coneix exactament mitjançant quins senyals els espermatogonis $A_{pàlids}$ són dirigits cap a la proliferació, ni el nombre de divisions necessàries per donar lloc als espermatogonis B (revisat per Amann 2008).

1.1.1.2 Meiosi

La meiosi consisteix en dues divisions cel·lulars consecutives després d'un cicle de replicació del DNA. La primera divisió és reduccional i implica la segregació sintètica dels cromosomes homòlegs de manera que les cèl·lules diploides ($2n$) passen a ser haploides (n). La segona divisió és equacional i consisteix en una segregació amfitètica de les cromàtides germanes, que dóna lloc a cèl·lules haploides amb una sola cromàtide per

cromosoma. Durant la primera divisió meiótica es produeix la recombinació i la segregació independent dels cromosomes, dos esdeveniments que exploten al màxim la variabilitat genètica de les cèl·lules resultants.

L'entrada en meiosi implica la sortida del programa mitòtic i una extensa fase S premeiótica. Tot i que els mecanismes que regulen aquest esdeveniment són força desconeguts en humans, en models animals s'ha observat que cal l'expressió del gen *Stra8* (*Stimulated Retinoic Acid*) per iniciar el procés i que és imprescindible la presència d'àcid retinoic (AR) per a la transcripció d'*Stra8* (Koubova *et al.* 2006; revisat per Handel i Schimenti 2010).

A l'inici de la profase I, durant l'estadi de leptotè, comencen a condensar-se els cromosomes i s'inicia l'alineament i el reconeixement dels cromosomes homòlegs (Ding *et al.* 2010). Per facilitar la recerca d'homologia s'estructuren els complexos sinaptonemals (CSs). Aquestes estructures s'organitzen per l'associació de les proteïnes SYCP2 (*Synaptonemal Complex Protein 2*) i SYCP3 (*Synaptonemal Complex Protein 3*) i donen lloc als elements laterals dels CSs. Durant aquest estadi també s'inicia la recombinació amb la inducció de trencaments de cadena doble (DSB, *Double Strand Break*) a la molècula de DNA. La responsable d'aquests trencaments és l'endonucleasa Spo11 específica de meiosi i es desencadena la maquinària de resposta al dany del DNA (Keeney i Neale 2006). Com a part de la reparació del DSB, el complex multiproteic MRN exposa extrems 3'-OH de cadenes senzilles de DNA (ssDNA, *single strand DNA*). Seguidament les proteïnes RAD51 i DMC1 s'uneixen als extrems d'ssDNA i promouen la recerca de cadenes de DNA homòlogues (San Filippo *et al.* 2008).

En l'estadi de zigotè s'incorpora la proteïna filamentosa transversal SYCP1 (*Synaptonemal Complex Protein 1*) la qual connecta els elements laterals dels CSs i facilita l'aparellament dels cromosomes homòlegs (Handel i Schimenti 2010; revisat per Ollinger *et al.* 2010). Per reparar els trencaments, durant aquest estadi, es formen els nòduls de recombinació primerencs quan les cadenes d'ssDNA lliures envaeixen la doble hèlix del cromosoma homòleg. Aquesta interacció implica la síntesi i la unió de les cadenes senzilles, que formen un estadi intermedi de la recombinació meiótica conegut com doble unió de Holliday (dHJ). Al final d'aquest estadi s'inicia la inactivació dels

cromosomes sexuals (MSCI, *Meiotic Sex Chromosome Inactivation*) com a part d'un fenomen generalitzat d'inactivació de regions asinàptiques (MSUC; *Meiotic Silencing of Unpaired Chromosome*) (revisat per Turner 2007). El resultat final és l'heterocromatinització dels cromosomes sexuals, que provoca l'aparició d'un domini electrodens anomenat vesícula sexual (revisat per Burgoyne *et al.* 2009).

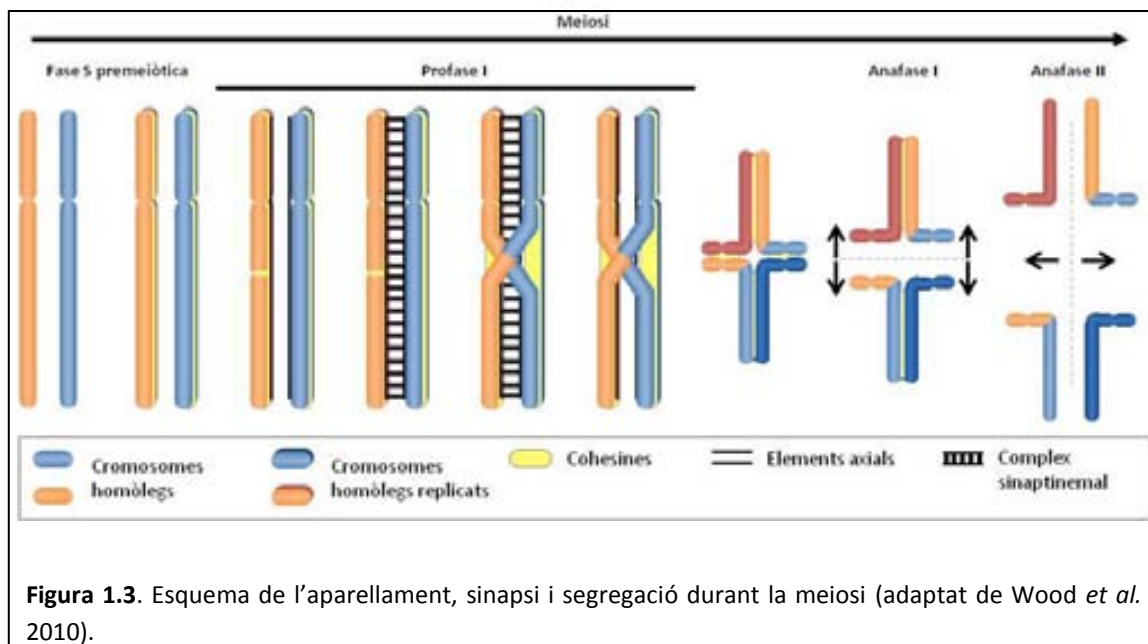
L'estadi de paquitè és el més llarg de la profase I. El seu inici està marcat per l'observació dels cromosomes homòlegs condensats i completament aparellats, amb els CSs completament estructurats. Durant aquest estadi es resolen les dobles unions de Holliday en tallar i relligar les cadenes implicades, i així finalitza el procés de reparació dels trencaments del DNA. La majoria dels punts de recombinació inicials són reparats sense que això impliqui l'intercanvi de material genètic entre les cromàtides dels cromosomes homòlegs, i s'originen molècules no recombinats. En alguns casos el sistema de reparació provoca l'intercanvi recíproc entre dues cromàtides homòlogues la qual cosa dóna lloc a molècules recombinants (Szekvolgyi i Nicolas 2010).

Finalment, al diplotè, els CSs es desestructuren i els cromosomes homòlegs queden units únicament per les regions distals dels llocs en què s'han produït els entrecreuaments mitjançant les cohesines. Aquestes regions són la manifestació citològica de la recombinació i s'anomenen quiasmes. A l'estadi de diacinesi la majoria de les estructures dels CSs s'han desmantellat i només queden alguns romanents d'elements axials (**figura 1.3**).

Un cop finalitzada la profase I les cèl·lules entren en metafase I. En aquesta fase els bivalents totalment condensats se situen a la regió equatorial de la cèl·lula, es desorganitza l'embolcall nuclear i s'estructura el fus meiòtic. La presència de quiasmes entre els cromosomes homòlegs manté la tensió entre ells (a través de les cohesines distals als llocs de recombinació) i això ajuda a la correcta orientació dels bivalents a la placa metafàsica (Page i Hawley 2003).

Durant l'anafase I es produeix la segregació sintèlica dels cromosomes homòlegs mitjançant la unió dels cinetocors germans a microtúbuls del mateix pol i a l'eliminació dels complexos de cohesines periquiasmàtiques (Ishiguro i Watanabe 2007). Per contra,

les cohesines centromèriques són protegides per evitar la separació de les cromàtides germanes (Vogt *et al.* 2008). Seguidament té lloc la telofase I, en la qual s'agrupen els cromosomes a cadascun dels pols i s'inicia la citocinesi. El resultat final de la meiosi I són dues cèl·lules anomenades espermatòcits secundaris.



El pas de la meiosi I a la meiosi II es caracteritza per l'absència de replicació del DNA. Els cromosomes condensats novament es situen a la placa metafàsica i es produeix la segregació amfitèlica de cromàtides germanes (**figura 1.3**). Les cromàtides s'uneixen als microtúbuls dels pols oposats i són eliminades les cohesines centromèriques, la qual cosa permet la segregació de les cromàtides (revisat per Handel i Schimenti 2010; Shintomi i Hirano 2010). La segona divisió meiòtica origina dues cèl·lules haploides anomenades espermàtides a partir de cada espermatòcit secundari.

1.1.1.3 Espermiogènesi

L'espermiogènesi es caracteritza per una morfogènesi complexa per la qual les espermatides rodones es diferencien en espermatozoides. Els canvis inclouen la formació del flagel i de la vesícula acrosòmica, el reposicionament de receptors i canals d'ions a la membrana, la condensació de la cromatina nuclear i l'eliminació del citoplasma. En humans, aquest procés consta de dotze fases; durant les set primeres es bàsicament produeixen canvis en la morfologia acrosòmica, mantenint la forma esfèrica del nucli (revisat per Amann 2008). Hi ha transcripció que produeix l'acumulació d'intermediaris i gens necessaris per tot el procés (revisat per Yan 2009). Entre els estadis 8-12 es produeixen canvis que impliquen la remodelació de la morfologia nuclear i de la cua, i continuen els canvis per a la formació de l'acrosoma. Un cop finalitzada l'espermiogènesi els espermatozoides són alliberats al lumen dels túbuls seminífers (espermiació) (revisat per Amann 2008).

1.2 CONTROL DE L'ESPERMATOGÈNESI

L'espermatogènesi és un procés molt complex on cada etapa té una funció concreta que requereix d'un control específic i acurat. Els diferents mecanismes de control depenen de l'activació dels complexos ciclina/Cdk per passar d'una fase a la següent. A continuació es descriuen els mecanismes principals implicats en cada etapa.

1.2.1 Proliferació mitòtica

Durant la proliferació mitòtica hi ha tres sistemes de control regulats per diferents complexos ciclina/Cdk: el control de creixement a G1, el control del dany al DNA, que opera en diferents fases, i el control d'assemblatge i posició de fus o SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*) (**figura 1.4**). Per a una revisió exhaustiva del cicle cel·lular es poden consultar diverses publicacions (Kastan i Bartek 2004; Jackson i Bartek 2009; Wolgemuth i Roberts 2010).

Durant la fase G1 es controla la integritat del DNA i el creixement cel·lular. Abans de sortir de la fase G1 les cèl·lules necessiten créixer i/o un ambient extracel·lular favorable. Un cop s'han assolit les condicions adequades els factors anomenats mitògens estimulen l'acumulació de Ciclina D per activar el complex ciclina/Cdk que donarà pas a la fase S. Si l'aturada s'allarga, la cèl·lula abandona el cicle cel·lular i entra en un estat no proliferatiu anomenat G0 en el qual pot romandre durant dies, setmanes i fins i tot durant tota la vida de l'organisme. Aquest és el cas de les cèl·lules de Sertoli, que pateixen una diferenciació i especialització de la seva funció i entren en un estadi G0 irreversible. En aquests casos el sistema de control del cicle cel·lular està desmantellat i desapareixen els complexos ciclina/Cdk o romanen inhibits.

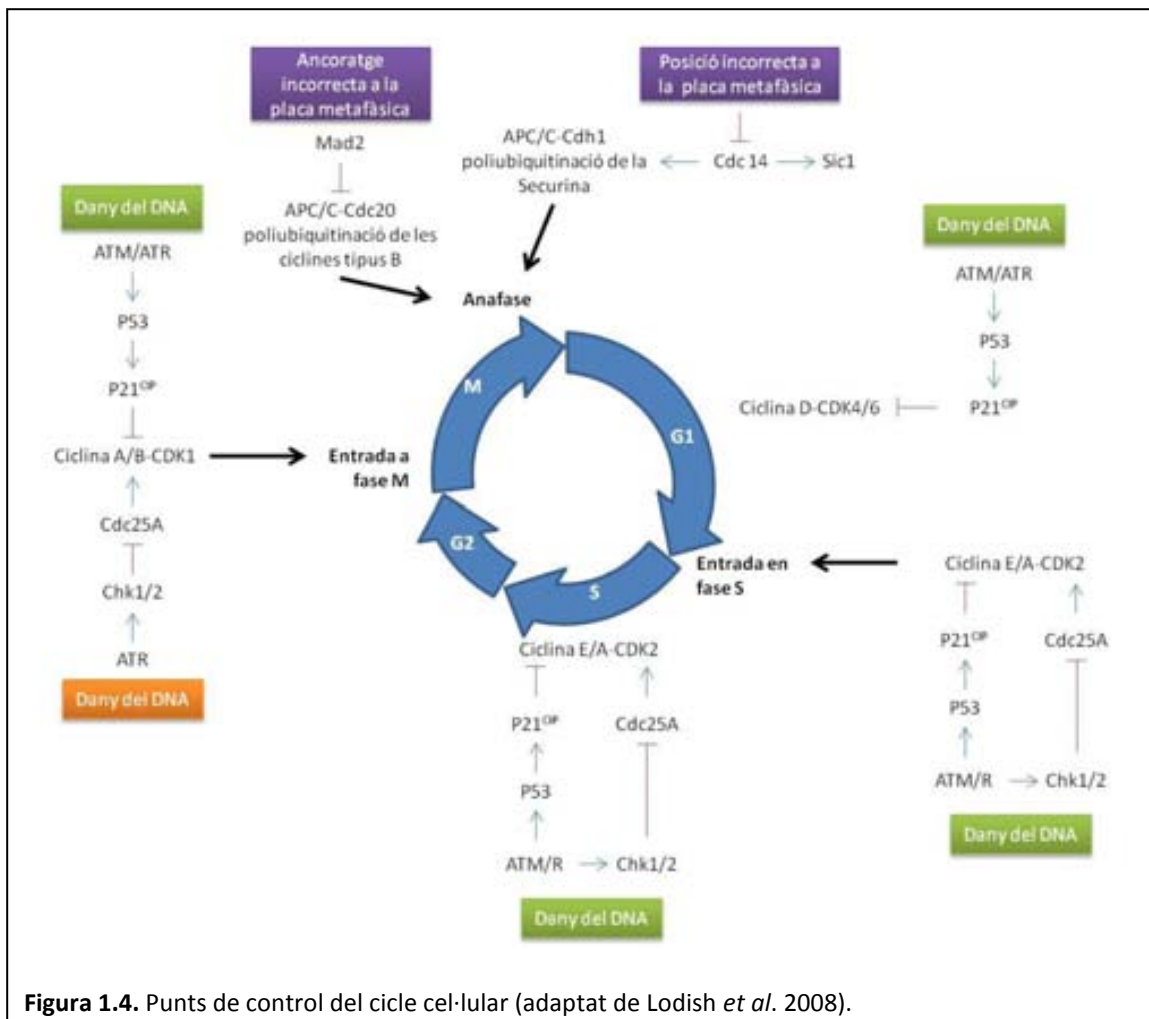


Figura 1.4. Punts de control del cicle cel·lular (adaptat de Lodish *et al.* 2008).

El control del dany del DNA és operatiu a les fases G1, S i G2 en les quals es detecten trencaments de cadena doble o DSB (**figura 1.4**). Els trencaments són reconeguts pel complex MRN, format per les proteïnes Mre11 (*Meiotic recombination 11*), Rad50 (*DNA repair protein 50*) i NBS1 (*Nibrin*). La unió d'aquest complex desencadena una cascada de senyalització que finalitza en l'activació dels punts de control que asseguren que la cèl·lula no completi la fase ni comenci la següent si presenta dany al DNA. Les proteïnes ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) i ATR (*ATM- and RAD3-related*), efectores de la cascada de senyalització davant el dany, provoquen un augment de la concentració de P53 (**figura 1.5**). Aquest regula la transcripció de P21, que s'encarrega de bloquejar l'activitat catalítica de les Cdk. Així, la cèl·lula disposa de temps per reparar el DNA. No obstant això, si l'anomalia no es pot reparar, P53 s'acumula i desencadena la ruta intrínseca d'apoptosi a través de BAX (*BCL2-Associated X protein*), que és un representant proapoptòtic de la família Bcl-2 (*B-cell lymphoma / leukemia 2*) (vegeu l'apartat **1.3.2**) (Zilfou i Lowe 2009; revisat per Shaha *et al.* 2010).

Al final de la fase G2 el control és doble (**figura 1.4**). A part de l'aturada per part de ATM/ATR a través de P53 i P21, existeix un altre sistema de control que està condicionat des de la fase S. En aquest cas es manté bloquejada l'activitat del complex ciclina A/Cdk1 mitjançant un fosfat inhibitori a la Cdk1 per mantenir el complex bloquejat fins que es compleixin els requisits per entrar en la fase M. Si hi ha dany al DNA la cinasa ATR activarà les Chk 1/2 (*Checkpoint kinase 1/2*) responsables d'inhibir la proteïna fosfatasa específica Cdc25A (*Cell division cycle 25 homolog A*). Un cop activa, Cdc25A retira el fosfat inhibitori de la Cdk1 la qual cosa permet l'activació del complex Ciclina A/Cdk1 que dona pas a la fase M (**figura 1.4**). Aquest complex, a banda de controlar el pas de G2 a M, també indueix la condensació dels cromosomes i l'acoblament del fus mitòtic (Lobrich i Jeggo 2007).

El punt de control del SAC se situa en la transició metafase-anafase controlant la unió dels microtúbuls als cinetocors i la correcta posició dels cromosomes a la placa metafàsica (**figura 1.4**). L'objectiu d'aquest punt de control és la protecció de les cohesines, per evitar la segregació precoç de cromàtides germanes, i el manteniment de l'activitat del complex ciclina B/Cdk1, per impedir la sortida de metafase abans que els

les proteïnes del punt de control i, per tant, Cdc20 i Cdh1 activen APC/C tot desencadenant una activitat diferencial de la ligasa (**figura 1.5**). APC/C^{Cdc20} ubiquitinitza la ciclina B inactivant el complex ciclina B/Cdk1, mentre que APC/C^{Cdh1} ubiquitinitza la securina i deixa lliure la separasa per trencar les cohesines. Així doncs, es produeix la separació de les cromàtides germanes i la inactivació del complex ciclina B/Cdk1 que permetrà la progressió cap a anafase. El punt de control del SAC mantindrà la cèl·lula aturada fins que no s'assoleixi l'orientació adequada. Avui dia no s'ha relacionat aquest punt de control amb una degeneració de la cèl·lula afectada. Diversos estudis demostren que la reducció o la deficiència de les proteïnes del punt de control del SAC és un dels factors responsables de l'aparició d'aneuploidies (revisat per Vogt *et al.* 2008; Sun i Kim 2012).

1.2.2 Meiosi

Els mecanismes de control de la meiosi són bàsicament els mateixos que actuen durant la proliferació mitòtica: el control del dany al DNA i el control de formació del fus o SAC (**figura 1.6**). No obstant això, les maquinàries de control incorporen la detecció d'asinapsi i d'anomalies de recombinació i asseguren la segregació correcta dels cromosomes homòlegs durant la transició de metafase I a anafase I.

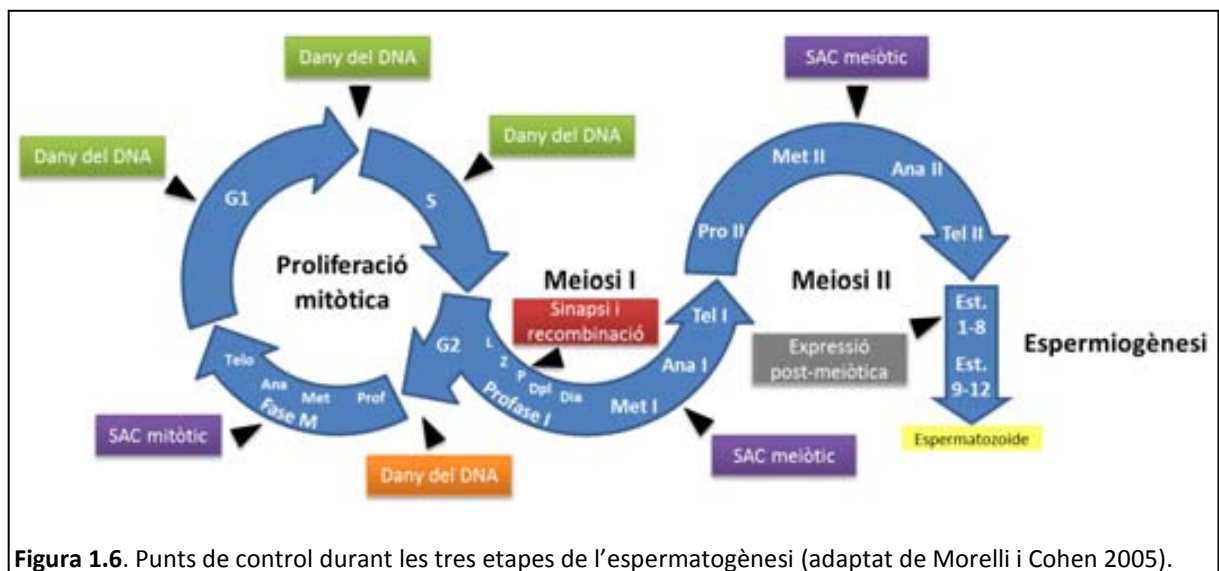


Figura 1.6. Punts de control durant les tres etapes de l'espermatogènesi (adaptat de Morelli i Cohen 2005).

1.2.2.1 Punt de control de sinapsi i recombinació

Aquest punt de control detecta regions asinàptiques aturant la cèl·lula mitjançant el procés de silenciament meiòtic de la cromatina asinàptica (MSUC, *Meiotic Silencing of Unsynapsed Chromatin*). Els trencaments de cadena doble produïts per l'Spo11 produeixen la fosforilació de diverses histones per part de ATM, entre les quals hi ha l'H2AX, que provoca l'aparició de focus de BRCA1 (*Breast Cancer 1*) i ATR en els elements axials. La fosforilació de les histones en els focus asinàptics provoca l'adquisició de modificacions repressives de la cromatina que fan que la zona adopti una estructura d'heterocromatina que desencadena el silenciament gènic de la regió afectada. Si els gens clau per a la meiosi es veuen implicats en aquest silenciament es desencadenarà el bloqueig del procés meiòtic (revisat per Burgoyne *et al.* 2009). En les regions aparellades les proteïnes BRCA1, ATR i γ H2AX s'alliberen dels elements axials evitant el mecanisme de silenciament cel·lular (Turner 2007).

Dins d'aquest procés generalitzat de silenciament de la cromatina asinàptica o MSUC es troba específicament la inactivació dels cromosomes sexuals (MSCI, *Meiotic Sex Chromosome Inactivation*). Els cromosomes sexuals són heteromòrfics, per tant, presenten una seqüència limitada d'homologia (regió pseudoautosòmica). L'exposició de regions asinàptiques durant l'estadi de paquitè activen els mecanismes descrits al paràgraf anterior tot produint l'heterocromatització dels cromosomes sexuals, que es manifesta amb la formació de la vesícula sexual. En aquest cas la cinasa ATM es transloca cap als *loops* de DNA on adquireix una distribució lineal i provoca la fosforilació de la histona H2AX i el manteniment de la MSCI (Turner 2007). La inactivació dels cromosomes sexuals també inhibeix la transcripció dels gens continguts als cromosomes X i Y, un esdeveniment essencial per al procés de l'espermatogènesi (Royo *et al.* 2010).

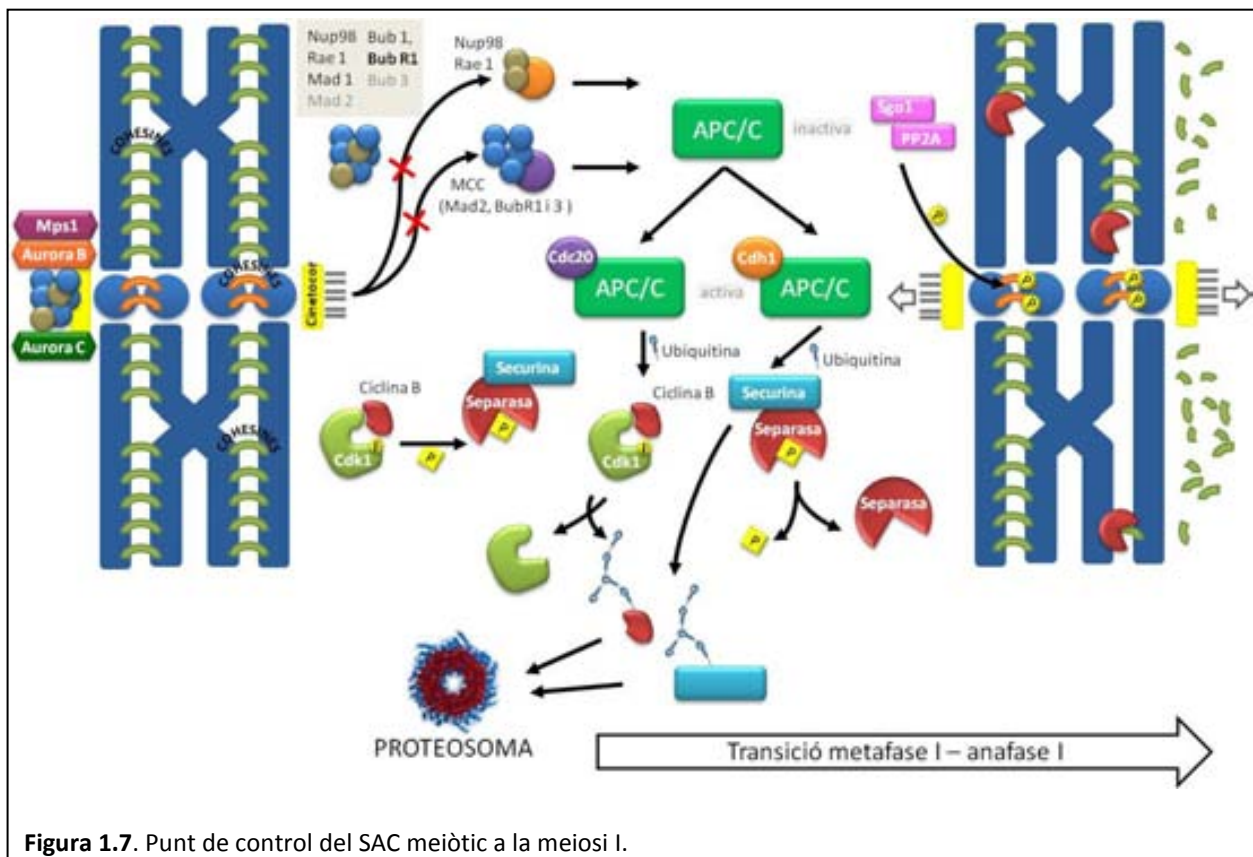
Així doncs, aquest mecanisme de control identifica regions asinàptiques i atura les cèl·lules amb la finalitat de reparar l'anomalia. Si no es pot reparar, la cèl·lula s'elimina durant l'estadi de paquitè (revisat per Burgoyne *et al.* 2009). S'ha observat que la mutació de gens implicats en els processos clau durant la profase I (cohesió, recombinació, formació del complex sinaptnemal, entre altres) desencadena l'activació de l'apoptosi i mostra una característica recurrent que és la presència d'asinapsi i de

trencaments de doble cadena derivats de punts de recombinació no resolts (revisat per Ollinger *et al.* 2010). L'eliminació cel·lular durant l'estadi de paquitè es produeix via apoptosi independent de P53 (revisat per Cohen *et al.* 2006). S'ha proposat que el mecanisme d'eliminació és comú tant per a cèl·lules aturades per problemes de recombinació com per problemes d'aparellament i sinapsi. L'eliminació respondria a un llindar que faria acumular cèl·lules aturades fins a la recepció d'un senyal extracel·lular paracrí que provocaria la inducció de la mort cel·lular de les cèl·lules aturades dissociant el punt en què es veuen aturades les cèl·lules i la seva eliminació (Hamer *et al.* 2008).

1.2.2.2 Punt de control d'assemblatge del fus meiótic (SAC meiótic)

Molts dels components de la maquinària del punt de control de fus mitòtic (Mad2, ciclina B, securina, Bub 1 i APC/C), també participen en el punt de control del fus meiótic (revisat per Morelli i Cohen 2005; Jeganathan i van Deursen 2006) (**figura 1.7**). A la primera divisió meiótica la separasa fosforila Rec 8, que forma part del complex de cohesines meiótiques, i això provoca la separació del complex. Tanmateix, les cohesines centromèriques estan protegides per la proteïna shugoshina (Sgo1 i Sgo2) associada a la fosfatasa de serines PP2A (*Protein Phosphatasa 2A*), que evita la separació dels centròmers i la segregació de les cromàtides durant la primera divisió mitòtica. La PP2A fa que les cohesines quedin fosforilades en llocs crítics que eviten el seu reconeixement per la separasa durant la primera divisió meiótica (Kitajima *et al.* 2006; Riedel *et al.* 2006; Tang *et al.* 2006; revisat per Vogt *et al.* 2008; revisat per Kateneva i Higgins 2009).

Les proteïnes Mad i les Bub també participen en el SAC meiótic, juntament amb les cinases aurora C (específica de meiosi) i aurora B, responsables de regular la dinàmica del fus i el punt de control (**figura 1.7**). Totes aquestes proteïnes són reclutades cap a la part externa del cinetocor durant la profase I, en què persisteixen i s'acumulen tot produint un senyal d'aturada (complex MCC) fins que s'assoleixi l'orientació sintèlica. El punt de control, juntament amb l'activitat que té sobre la integritat de les cohesines centromèriques, també regula el manteniment del complex ciclina B/Cdk1 actiu per evitar la sortida prematura de meiosi (revisat per Vogt *et al.* 2008; Sun i Kim 2012).



Durant la segona divisió meiótica la segregació és amfitèlica i el punt de control del SAC és similar al mitòtic (**figura 1.7**). Les cohesines centromèriques no són marcades pel complex Sgo1-PP2A i, per tant, la separasa pot degradar-les mentre s'allibera la unió entre cromàtides germanes (Vogt *et al.* 2008).

1.2.3 Expressió postmeiótica

S'ha descrit que dels aproximadament 600 gens que codifiquen per a proteïnes específiques per a l'espermatogènesi, 350 s'expressen exclusivament durant l'espermioogènesi. Tot i això hi ha poques dades sobre els gens, la seva expressió i la regulació. Recentment, Yan (2009) ha fet una revisió exhaustiva de gens implicats en l'espermioogènesi en model murí, en la qual proposen la presència d'un punt de control que controla la correcta expressió gènica durant estadis inicials de l'espermioogènesi. Aquest punt detectaria nivells d'expressió insuficient o erronis d'una sèrie de gens (per

exemple: *Crem*, *Tbpl1*, *Papalb* o *Piwil1*) que determinen el desenvolupament de l'espermioogènesi durant estadis inicials (fins a l'estadi 8, corresponent a espermatida rodona en model murí). Aquestes anomalies d'expressió provocarien l'eliminació de les cèl·lules afectades (revisat per Yan 2009). L'eliminació d'aquest tipus cel·lular s'esdevé per processos apoptòtics, per la formació de cèl·lules multinucleades gegants, o per la separació de les Sertoli prematurament i el seu alliberament al lumen dels túbuls seminífers (revisat per Yan 2009; Aitken i Koppers 2011).

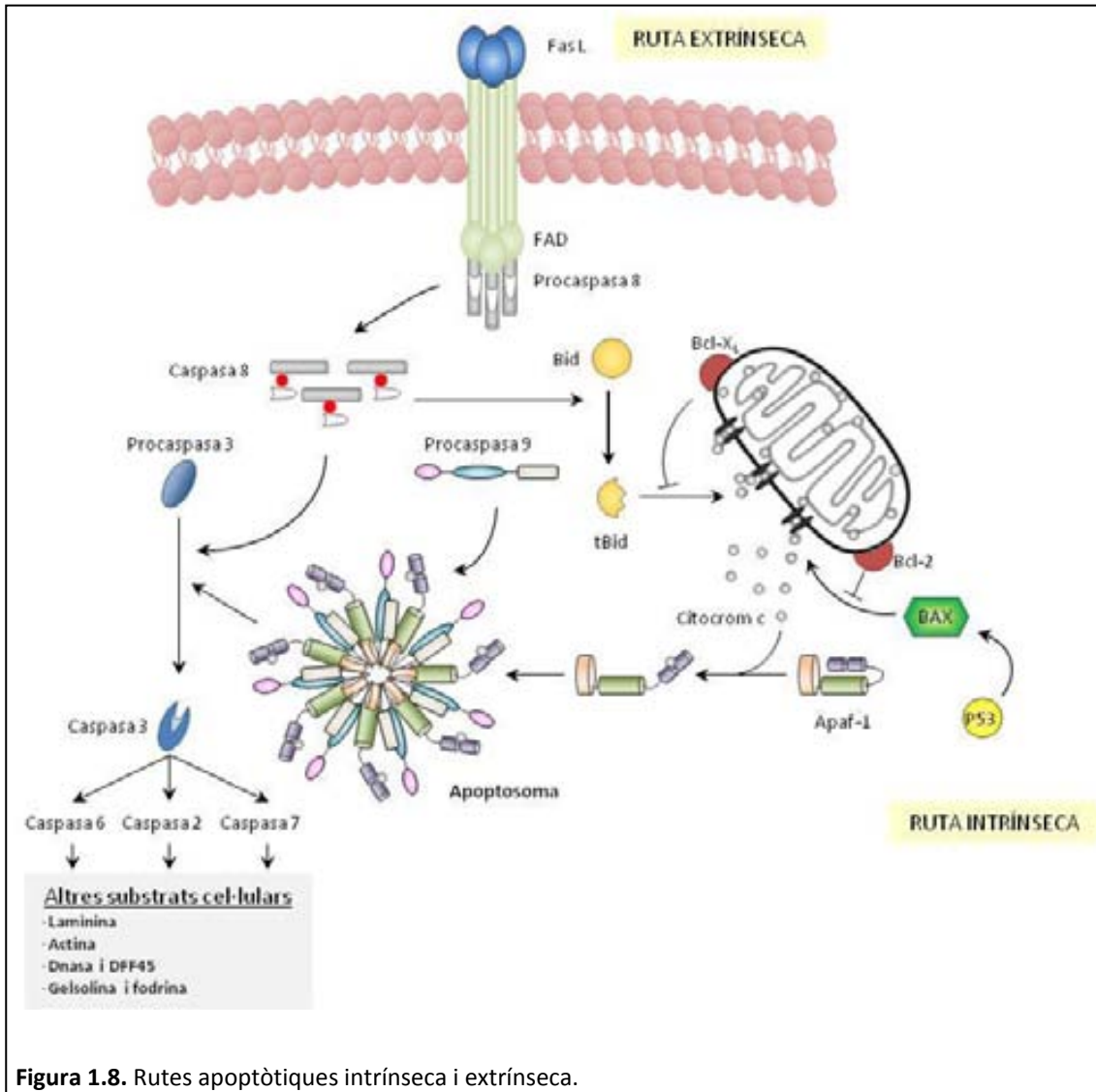
1.3 CONCEPTES GENERALS DE LA MORT CEL·LULAR PROGRAMADA

Des d'estadis inicials del desenvolupament embrionari, la mort cel·lular programada està implicada en l'homeòstasi tissular. La regulació de la mort cel·lular programada i la supervivència cel·lular depenen de factors de creixement i de contacte amb les cèl·lules veïnes i/o amb la matriu extracel·lular que desencadenen les diferents vies de senyalització. L'objectiu principal d'aquest procés és l'eliminació i reabsorció dels components cel·lulars sense malmetre les cèl·lules veïnes. Els processos controlats de degradació que porten a l'eliminació de la cèl·lula reben el nom d'apoptosi.

1.3.1 Canvis morfològics

Els canvis cel·lulars més importants tenen lloc al citoplasma, al nucli, als mitocondris i a la membrana plasmàtica. Les cèl·lules es retrauen, perden el contacte amb les cèl·lules veïnes i comencen a formar protuberàncies que se separaran per formar unes vesícules anomenades cossos apoptòtics. Paral·lelament aquestes cèl·lules exposen a la part externa de la membrana plasmàtica la fosfatidilserina (PS); un fosfolípid que és reconegut pels fagòcits. L'exposició de la PS forma part de la desestructuració del citosquelet el qual també és responsable de la formació de les protuberàncies (revisat per Shaha *et al.* 2010). D'altra banda, es produeix la condensació de la cromatina i la fragmentació del DNA. També es desestructura la xarxa de connexió de l'aparell de Golgi amb el reticle endoplasmàtic i amb els mitocondris, mentre s'alliberen nombroses

proteïnes al citoplasma. Una de les més importants és el citocrom C, emmagatzemat a l'espai intermembrana dels mitocondris. La presència del citocrom C al citoplasma desencadena l'assemblatge del complex activador de caspases (apoptosoma) i l'activació de la cascada de caspases (**figura 1.8**) (revisat per Taylor *et al.* 2008).



1.3.2 Mecanismes moleculars

La inducció dels processos apoptòtics es pot originar per senyals extracel·lulars (ruta extrínseca) o intracel·lulars (ruta intrínseca) tot i que ambdues vies convergeixen en un procés comú (**figura 1.8**). Les molècules efectores principals són les caspases i els

representants proapoptòtics de la família Bcl-2. Les caspases són una família de dotze proteases que tenen residus de cisteïna en el centre actiu i trenquen els residus d'àcid aspàrtic a la proteïna diana. Se sintetitzen com a precursors inactius (procaspases) que es converteixen en la forma activa mitjançant el trencament proteolític per altres caspases, la qual cosa desencadena una reacció irreversible. Són els efectors últims de la mort cel·lular programada en produir la majoria dels canvis morfològics mitjançant el trencament de més de quaranta proteïnes cel·lulars diferents. En la regulació de l'apoptosi és molt important la família Bcl-2, ja que els seus representants (tant proapoptòtics com antiapoptòtics) regulen la permeabilitat de la membrana del mitocondri i l'alliberament del citocrom C situat a l'espai intermembrana (Hengartner 2000; revisat per Taylor *et al.* 2008).

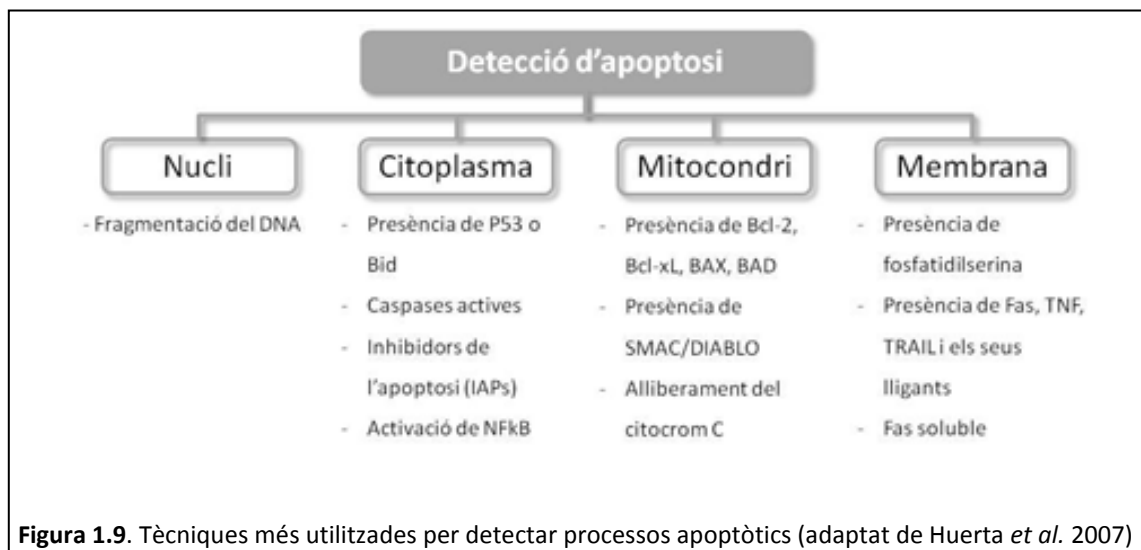
La ruta intrínseca s'activa per dany al DNA i, per tant, majoritàriament s'indueix via P53. Aquesta activa BAX, representat proapoptòtic de la família Bcl-2, que es transloca a la membrana mitocondrial i allibera el citocrom C (**figura 1.8**). Un cop al citoplasma, el citocrom C provoca el canvi de conformació d'Apaf-1 que s'associa amb la procaspasa 9. Això fa que s'activin mútuament i formin el complex activador de caspases anomenat apoptosoma. Les caspases activen indirectament la DNAsa responsable de la fragmentació del DNA. A més, també degraden les làmines nuclears i les proteïnes del citosquelet, que donen lloc a la fragmentació del nucli i la desestructuració de la membrana plasmàtica.

La ruta extrínseca es desencadena en resposta a senyals extracel·lulars. Aquests senyals normalment van associats a receptors específics que activen directament la procaspasa 8, la qual un cop activa desencadena tant la cascada de caspases com l'activació de Bid (*Bcl interacting domain*), representant proapoptòtics de la família Bcl-2 (**figura 1.8**). Així doncs, ambdues rutes d'inducció d'apoptosi (intrínseca o extrínseca) convergeixen a través dels membres de la família Bcl-2 i les caspases en resposta a les diferents vies de senyalització que controlen la supervivència o la mort cel·lular (revisat per Huerta *et al.* 2007).

1.3.3 Detecció d'apoptosi

Hi ha diferents tècniques que permeten identificar processos apoptòtics i que incideixen sobre les diferents estructures cel·lulars implicades (**figura 1.9**).

Al nucli es pot detectar la fragmentació del DNA. La tècnica més utilitzada és el marcatge terminal in situ mediat per la transferasa de desoxinucleòtids a l'extrem terminal (TUNEL, *TdT-mediated dUTPbiotin Nick End Labeling*) (Gavrieli *et al.* 1992). Es basa en la detecció de nucleòtids marcats incorporats als extrems lliures 3' produïts per la DNAsa específica CAD (*Caspase-Activated DNase*). També es pot detectar la fragmentació del DNA mitjançant el marcatge de cadenes senzilles de DNA (ssDNA staining: Frankfurt *et al.* 1996).



Al citoplasma es detecten les proteïnes implicades en el procés apoptòtic. Es pot valorar la presència d'efectors com P53, IAPs (*Inhibitor of Apoptosis*), o d'intermediaris com Bid, o components de vies de senyalització (NFkB activa) (**figura 1.9**). Una de les tècniques més utilitzades es la detecció de les caspases actives és mitjançant immunocitoquímica (revisat per Said *et al.* 2004).

Al mitocondri s'analitza la presència de les proteïnes que regulen l'alliberament del citocrom C al citoplasma, ja siguin proapoptòtiques o antiapoptòtiques. També es pot

avaluar la presència de SMAC/DIABLO (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP-binding Protein with Low pI*) o del citocrom C que se situen a l'espai intermembrana del mitocondri i són alliberats al citosol per fer la seva activitat proapoptòtica.

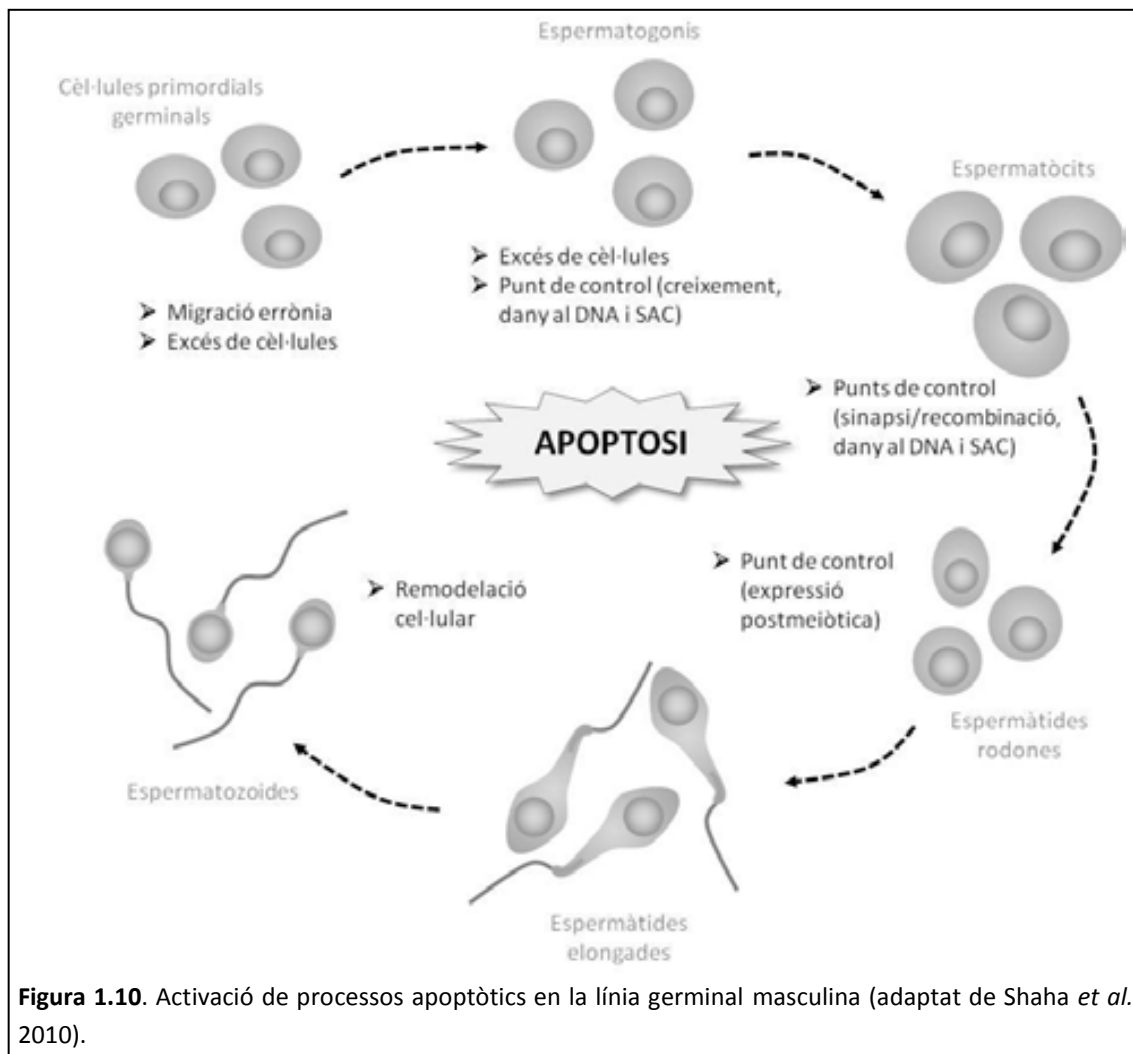
Els canvis morfològics que afecten la membrana plasmàtica també permeten detectar la presència d'apoptosi. Una de les tècniques més utilitzades és la immunofluorescència amb annexina V (AV), una molècula que s'uneix específicament a la fosfatidilserina translocada a la monocapa externa de la bicapa lipídica (Vermes *et al.* 1995; Van Engeland *et al.* 1997; Schutters i Reutelingsperger 2010). Altres tècniques detecten receptors actius de senyalització de mort cel·lular i els seus lligants (TNF L/TNFR, TRAIL L/TRAIL-R, Fas L/Fas-R) (**figura 1.9**).

1.4 APOPTOSI EN TEIXIT TESTICULAR

El nombre de cèl·lules en els túbuls seminífers es determina per un balanç dinàmic entre proliferació i degeneració. En ratolins, la pèrdua s'ha estimat que suposa fins a un 75 % de les cèl·lules germinals (revisat per Shaha *et al.* 2010). La majoria dels estudis demostren que en humans la degeneració espontània de cèl·lules germinals, com la induïda per agents externs, alteracions hormonals o anomalies durant el procés espermatogènic es produeixen via apoptosi (Sinha Hikim *et al.* 2003). Tot i això els mecanismes moleculars que controlen aquest procés no estan totalment elucidats. A la **figura 1.10** es resumeixen els punts principals d'activació d'apoptosi en les cèl·lules germinals.

Durant el desenvolupament embrionari les cèl·lules de Sertoli expressen el factor de cèl·lules mare (SCF, *Stem Cell Factor*) que té el seu receptor tirosina-cinasa C-kit en les cèl·lules germinals. La interacció SCF/C-kit és necessària per a la migració i l'adhesió a la cresta genital, i per afavorir la proliferació de les cèl·lules primordials germinals (revisat per Shaha *et al.* 2010). Les cèl·lules germinals que no migren correctament cap a la cresta s'eliminen via apoptosi (**figura 1.10**). La unió amb SCF provoca la fosforilació de C-

kit que desencadena una via de senyalització antiapoptòtica a través de Bad. El C-kit fosforilat provoca que Bad sigui retingut al citoplasma i, per tant, que no pugui translocar-se cap a l'espai intermembrana del mitocondri, on provocaria l'alliberament del citocrom C.



En etapes prepuberals i coincidint amb una primera diferenciació de les cèl·lules mare cap a espermatogonis, es produeix una onada massiva d'apoptosi sobre espermatogonis i espermatòcits primaris (Rodríguez *et al.* 1997). En ratolí s'ha observat que l'apoptosi està relacionada amb les caspases 2, 3, 8 i 9; la qual cosa mostra la implicació de les vies intrínseca i extrínseca. S'ha observat que aquesta onada d'apoptosi respondria a l'aparició de l'expressió de BAX i Bad (efectors proapoptòtics de la via dependent de

P53) al testicle que no va acompanyada de la de representats antiapoptòtics de la família Bcl-2 per compensar-ho. Es creu que aquest procés té la finalitat de controlar la ràtio entre cèl·lules de Sertoli i cèl·lules germinals per tal d'assegurar el desenvolupament de les cèl·lules germinals (**figura 1.10**). També s'ha descrit la implicació del control hormonal, ja que aquesta primera ronda d'espermatogènesi, tot i que forma part del procés normal de l'espermatogènesi, es produeix en un moment en què el suport hormonal no és suficient per continuar el procés (Rodriguez *et al.* 1997; Shaha *et al.* 2010). En aquest sentit, s'ha descrit que qualsevol alteració hormonal (FSH, LH, testosterona, HCG), tant si forma part del procés normal com si s'esdevé per alguna patologia, provoca apoptosi en el teixit testicular (revisat per Shaha *et al.* 2010). La via responsable d'aquesta inducció és la del Fas/FasL en estar estretament regulada per les gonadotrofines (Francavilla *et al.* 2002; Tesarik *et al.* 2002; revisat per Sofikitis *et al.* 2008). La severitat dels símptomes i les possibles conseqüències sobre la fertilitat són directament proporcionals al moment i a la magnitud en què es produeixi l'alteració (Huynh *et al.* 2002).

L'apoptosi al testicle també forma part de la resolució dels punts de control que regulen esdeveniments clau de l'espermatogènesi (proliferació, sinapsi i recombinació, expressió gènica). Els punts de control, com hem descrit en apartats anteriors, actuen sobre espermatogonis que estan proliferant, sobre espermatòcits primaris en fase de paquità i en la transició de metafase a anafase (tant en la primera com en la segona divisió meiótica), i sobre espermatides rodones durant els primers estadis de l'espermioogènesi (**figura 1.10**). La funció dels punts de control és la d'aturar les cèl·lules amb errors per donar temps a les diferents maquinàries de reparació per solucionar l'anomalia. En el cas que les anomalies no poguessin ser reparades es desencadenaria l'eliminació de les cèl·lules via apoptosi.

Finalment, durant l'espermioogènesi es produeix la remodelació de la membrana plasmàtica i de la cromatina, que impliquen processos semblants a l'apoptosi (**figura 1.10**). Un exemple és la substitució d'histones per protamines la qual provoca l'exposició temporal de trencament de doble cadena (Leduc *et al.* 2008). A més, al final de la diferenciació de l'espermatozoide el citoplasma s'acumula en cossos residuals. Aquest

cossos presenten característiques morfològiques apoptòtiques com són l'externalització de la fosfatidilserina i l'activació de la caspasa 3 (revisat per Shaha *et al.* 2010; Aitken i Koppers 2011). Així doncs, cal tenir en compte que la presència de marcadors d'apoptosi en espermatozoides, la fragmentació del DNA, l'activitat de la caspasa 3 i l'externalització de la PS no sempre impliquen un procés apoptòtic real.

1.5 INFERTILITAT MASCULINA, ANOMALIES CROMOSÒMIQUES I APOPTOSI

Estudis meiòtics en biòpsies testiculars de pacients infèrtils han posat de manifest que un percentatge significatiu dels individus presenten errors en processos clau de la meiosi com són ara la sinapsi, la recombinació i/o la segregació dels cromosomes homòlegs (Egozcue *et al.* 2005). L'alteració d'aquests processos sovint va lligada a bloquejos parcials (Guichaoua *et al.* 2005; Ferguson *et al.* 2007; Sun *et al.* 2007; Sun *et al.* 2008) o totals de l'espermatogènesi (Gonsalves *et al.* 2004; Topping *et al.* 2006) i es manifesten en azoospermies o oligozoospermies severes (Vendrell *et al.* 1999; Egozcue *et al.* 2000).

Com s'ha descrit a l'apartat **1.2**, els processos clau de l'espermatogènesi estan regulats per punts de control adreçats a detectar la presència d'anomalies en les cèl·lules germinals i activar les diferents maquinàries de reparació (**figura 1.11**). Malgrat l'eficiència dels sistemes de reparació, es presenten situacions en què les cèl·lules no poden resoldre les anomalies detectades. En aquests casos, i davant la incapacitat de reparació, els sistemes de control desencadenen l'activació dels mecanismes d'eliminació cel·lular, majoritàriament via apoptosi (Braun 1998; Hamer *et al.* 2008; Li *et al.* 2009; Yan 2009). Aquest fet es posa en evidència en els treballs que descriuen increments significatius de processos apoptòtics en cèl·lules germinals (Lin *et al.* 1997; Tesarik *et al.* 1998) i en espermatozoides de pacients infèrtils (Sun *et al.* 1997; Sakkas *et al.* 1999; Sinha Hikim i Swerdloff 1999; Paasch *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003; Chen *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2008).

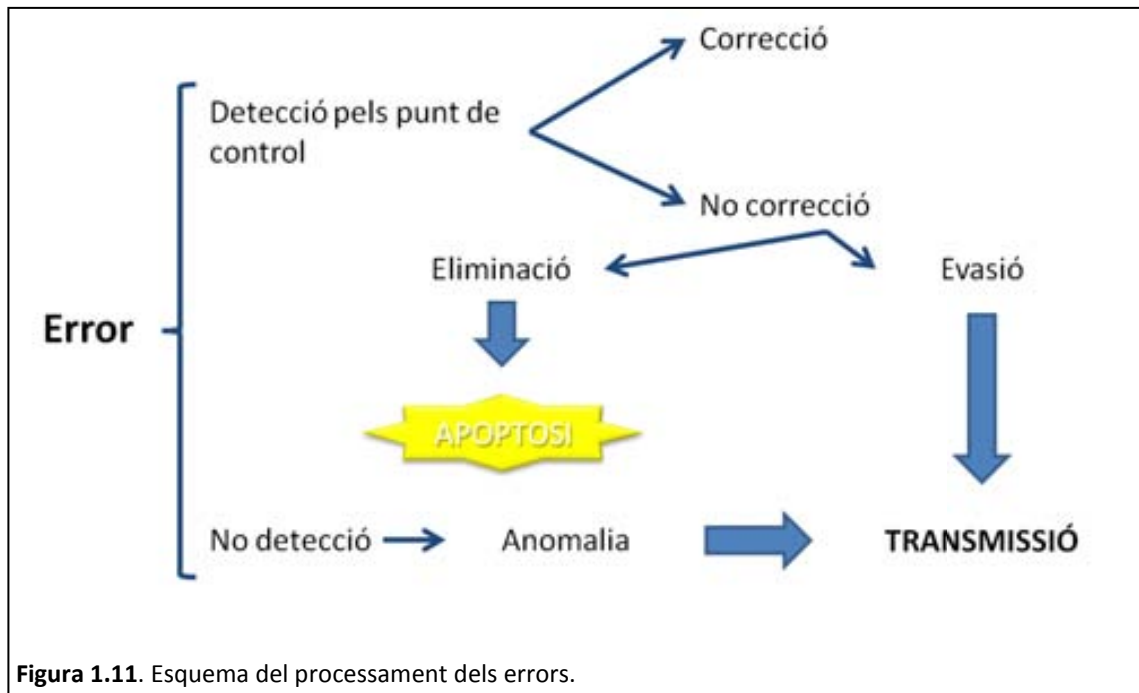


Figura 1.11. Esquema del processament dels errors.

En altres situacions els punts de control no actuen correctament, ja sigui per la manca d'activació dels processos d'eliminació cel·lular, o per una eliminació no eficient de les cèl·lules (Eaker *et al.* 2001). En aquests casos, l'evasió dels punts de control causaria la transmissió d'anomalies cromosòmiques a la generació següent (**figura 1.11**).

Les implicacions de les aneuploidies en la viabilitat cel·lular no estan clarament establertes. En cèl·lules somàtiques s'ha observat un efecte negatiu sobre la proliferació durant el desenvolupament embrionari i en l'etapa adulta (revisat per Hernando, 2008). Aquests efectes estarien determinats per alteracions en el metabolisme i en l'expressió gènica (Torres *et al.* 2007; revisat per Gordon *et al.* 2012) que activarien l'eliminació via apoptosi dependent de P53-ATM (Li *et al.* 2010; revisat per Fang i Zhang 2011). No obstant això, s'han observat diferències clares en funció del cromosoma afectat i del tipus cel·lular (Williams *et al.* 2008). Un exemple és el teixit neuronal que presenta una alta freqüència de neurones i neuroblasts aneuploides (Rehen *et al.* 2001; Rehen *et al.* 2005) que contribueixen en les xarxes de senyalització neuronal (Kingsbury *et al.* 2005; revisat per Compton 2011).

En les cèl·lules germinals no s'ha identificat cap mecanisme responsable de detectar i d'eliminar les aneuploïdies. Tot i això, dades experimentals recolzarien una relació entre ambdós esdeveniments. En primer lloc, diversos autors han observat un increment d'anomalies cromosòmiques numèriques en espermatozoides de pacients infèrtils (Hassold i Hunt 2001; Egozcue *et al.* 2005; Ferguson *et al.* 2007; Martin 2008; Sun *et al.* 2008). D'altra banda, s'ha descrit en pacients infèrtils la presència d'increments de processos apoptòtics en les cèl·lules germinals en les diferents etapes de l'espermatogènesi (Paasch *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003; Chen *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2008; Aitken *et al.* 2011). Altres estudis han posat de manifest una correlació positiva entre la presència d'aneuploïdies i la de processos apoptòtics en espermatozoides (Carrell *et al.* 2003; Schmid *et al.* 2003; Liu *et al.* 2004; Brahem *et al.* 2011; Perrin *et al.* 2011). Finalment, cal destacar el treball de Muriel *et al.* (2007) en els quals es demostra que un percentatge significatiu dels espermatozoides aneuploides són apoptòtics, la qual cosa suggereix la presència d'un mecanisme dissenyat per inactivar genèticament els espermatozoides amb una constitució cromosòmica anòmala.

OBJECTIUS

HIPOTESI INICIAL

Les cèl·lules germinals i les cèl·lules de Sertoli aneuploides activen mecanismes de control cel·lular que desencadenen processos de mort cel·lular programada.

OBJECTIUS

- 1.** Desenvolupar una metodologia seqüencial que permeti la detecció, l'aïllament i l'anàlisi citogenètica de cèl·lules testiculars apoptòtiques.
- 2.** Avaluar la relació entre la presència d'anomalies cromosòmiques i la inducció de processos apoptòtics en cèl·lules germinals prereducionals, postreducionals, fases meiòtiques, espermatozoides i cèl·lules de Sertoli procedents de biòpsies testiculars d'individus infèrtils.
- 3.** Analitzar la freqüència d'anomalies cromosòmiques observades en les diferents etapes de l'espermatogènesi i contrastar aquesta informació amb les característiques seminals, l'estudi meiòtic i l'anàlisi de FISH en espermatozoides a fi d'identificar pacients amb un comportament similar.

MATERIAL I
MÈTODES

3.1 MOSTRES BIOLÒGIQUES

Es van obtenir fragments de biòpsies testiculars diagnòstiques de 31 pacients que van consultar per problemes de fertilitat (*Instituto de Fertilidad CEFER*, Barcelona). Totes les mostres es van obtenir sota anestèsia local seguint el protocol quirúrgic del centre. Posteriorment es van enviar al nostre laboratori en PBS (*Phosphate Buffer Saline*) a 4 °C.

Amb la finalitat de posar a punt la metodologia es van utilitzar 17 de les 31 biòpsies testiculars. El protocol optimitzat es va aplicar sobre les 14 mostres restants, que en endavant anomenarem població d'estudi. Les dades clíniques dels pacients participants en l'estudi es mostren a les **taules 3.1 i 3.2**.

Taula 3.1. Dades clíniques dels pacients utilitzats per a la posada a punt de la tècnica.

	Edat	Motiu de la consulta	Cariotip	Seminograma	Estudi meiòtic	FISH en espermatozoides
446	44	Esterilitat 1a	46,XY	Azoospèrmia	Alterat	-
452	-	-	-	-	-	-
453	-	-	-	-	-	-
454	44	Esterilitat 1a	46,XY	Azoospèrmia	-	-
455	-	-	-	-	-	-
479	-	-	-	-	-	-
480	38	Esterilitat 1a	46,XY	Normozoospèrmia	Alterat	Alterat
486	38	Esterilitat 1a	46,XY	Oligozoospèrmia	Normal	-
487	40	Esterilitat 1a	46,XY	Oligoastenoteratozoospèrmia	Alterat	Alterat
492	34	Infèrtilitat	46,XY	Teratozoospèrmia	Alterat	Normal
498	36	Esterilitat 1a	46,XY	Oligoastenoteratozoospèrmia	Alterat	Alterat
501	28	Esterilitat 1a	46,XY	Astenozoospèrmia	Normal	Alterat
526	32	Esterilitat 1a	46,XY	Teratozoospèrmia	Normal	Normal

Taula 3.1 (continuació). Dades clíniques dels pacients utilitzats per a la posada a punt de la tècnica

	Edat	Motiu de la consulta	Cariotip	Seminograma	Estudi meiòtic	FISH en espermatozoides
527	42	Esterilitat 1a	46,XY	Azoospermia	Normal	-
537	35	Esterilitat 1a	46,XY	Teratozoospermia	Alterat	Alterat
538	34	Esterilitat 1a	46,XY	Normozoospermia	Alterat	Normal
554	33	Esterilitat 1a	46,XY	Oligoteratozoospermia	Normal	Normal

Taula 3.2. Dades clíniques dels pacients que conformen la població d'estudi.

	Edat	Motiu de la consulta	Cariotip	Seminograma	Estudi meiòtic	FISH en espermatozoides
555	52	Vasectomia	46,XY	Azoospermia	-	-
560	-	-	-	-	-	-
567	-	-	-	-	-	-
576	37	Esterilitat 1a	46,XY	Normozoospermia	Alterat	Normal
577	-	-	-	-	-	-
578	36	Esterilitat 1a	46,XY	Azoospermia	Alterat	-
579	36	Esterilitat 1a	-	-	Alterat	-
585	50	Vasectomia	46,XY	Azoospermia	-	-
586	38	Esterilitat 1a	46,XY	Astenoteratozoospermia	Normal	Normal
597	35	Esterilitat 1a	46,XY	Normozoospermia	Normal	Normal
598	35	Esterilitat 1a	-	Astenozoospermia	Normal	-
599	-	Esterilitat 1a	46,XY	Normozoospermia	Alterat	Normal
600	38	Esterilitat 1a	46,XY	Oligozoospermia	Normal	Normal
602	40	-	46,XY	Oligosatenozoospermia	Alterat	Normal

Els individus participants van ser informats del projecte de recerca mitjançant el corresponent consentiment informat. Els protocols utilitzats van ser aprovats pel comitè d'ètica del centre col·laborador.

3.2 METODOLOGIA

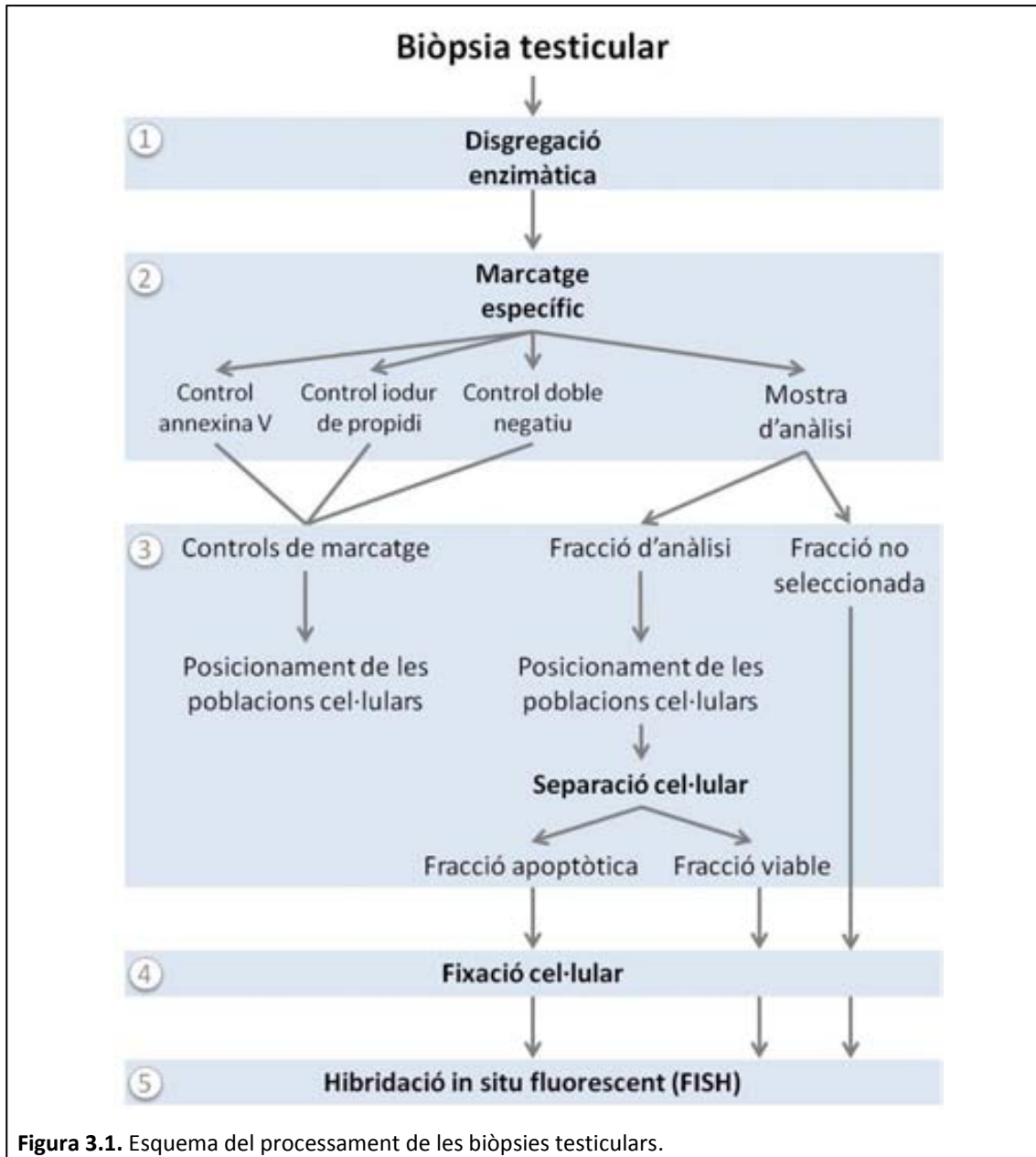
La metodologia aplicada consta de cinc etapes: 1) Disgregació enzimàtica, 2) Marcatge específic d'apoptosi i necrosi, 3) Selecció mitjançant citometria de flux, 4) Fixació cel·lular, 5) Hibridació in situ fluorescent (FISH).

Les biòpsies testiculars es van processar de manera individual seguint l'esquema de la **figura 3.1**.

3.2.1 Disgregació enzimàtica

El protocol de disgregació enzimàtica es basa en el descrit per Brook *et al.* (2001) adaptat al processat de teixit testicular humà. El protocol complet es detalla a continuació:

- Trossejar la biòpsia en 3-4 fragments de 3 mm³ per facilitar-ne la disgregació.
- Posar els fragments en 4 ml de medi RPMI complementat amb col·lagenasa I (medi 1, **annex I**) i incubar en agitació (60 rpm) durant 30 minuts a 35 °C.
- Aspirar i deixar anar el material diverses vegades amb una pipeta Pasteur per separar els túbuls seminífers del teixit intersticial i deixar sedimentar durant 5 minuts.
- Guardar el sobrenedant a 4 °C i continuar treballant amb el sediment.
- Resuspendre el pèl·let amb 3 ml de medi amb tripsina, piruvat sòdic, EDTA, hialuronidasa i DNAsa (medi 2, **annex I**) i incubar durant 20 minuts a 35 °C en agitació.
- Aspirar i deixar anar amb una pipeta Pasteur per resuspendre agregats i alliberar les cèl·lules.



- Neutralitzar l'activitat de la tripsina afegint 3 ml de medi RPMI amb sèrum boví fetal al 10 % (medi 3, **annex I**) 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 que s'havia 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 en 3 ml de medi 3.
- Deixar sedimentar 5 minuts i obtenir el sobrenedant (~ 2,5 ml) on es troba la suspensió cel·lular d'estudi. Descartar el sediment amb les restes de teixit.

- Avaluar la viabilitat mitjançant la tinció vital de blau tripan (solució aquosa, 1:1).

3.2.2 Marcatge específic d'apoptosi i necrosi

La identificació de les cèl·lules apoptòtiques, necròtiques i viables es va fer mitjançant la combinació d'annexina V conjugada amb fluoresceïna (AV-FITC) i iodur de propidi (IP) (Annexin-V-FLUOS Staining Kit. Roche Diagnostics GmbH, Alemanya). El protocol de marcatge utilitzat és el següent:

- Centrifugar la suspensió cel·lular a 200 g durant 5 minuts i posteriorment resuspendre el pèl·let amb 2,5 ml de PBS.
- Separar les suspensions cel·lulars en quatre fraccions: tres fraccions de 300 µl per fer els controls de marcatge del citòmetre (control doble negatiu, control annexina V i control iodur de propidi); el volum restant s'utilitzarà com a mostra d'anàlisi (**figura 3.1**).
- Afegir a cadascuna de les fraccions el volum de tampó, IP, i/o solució AV-FITC que s'indica a continuació per cada $1 \cdot 10^6$ cèl·lules:
 - Control doble negatiu: 100 µl de tampó.
 - Control annexina V: 2 µl de la solució d'AV-FITC i 100 µl de tampó.
 - Control iodur de propidi: 2 µl de la solució de IP i 100 µl de tampó.
 - Mostra d'anàlisi: 2 µl de la solució d'AV-FITC, 2 µl de la solució de IP i 100 µl de tampó.
- Incubar tots els tubs a les fosques com a mínim durant 15 minuts.
- Estendre 5 µl de la mostra d'anàlisi sobre un portaobjectes i avaluar el percentatge de les poblacions apoptòtica, necròtica i viable per cada pacient.

La mostra d'anàlisi es va separar en dues fraccions (**figura 3.1**): la primera (~ 1,6 ml) correspon a la fracció d'anàlisi i es va utilitzar per la separació de les poblacions apoptòtica i viable. La segona (~ 300 µl), que és la fracció no seleccionada, es va reservar i no es va processar al citòmetre per ser utilitzada com a control de la selecció. Les cinc

fraccions (els tres controls de marcatge, la fracció d'anàlisi i la fracció no seleccionada) es van transportar en gel picat al servei de citometria de flux per descartar diferències induïdes pel temps i la temperatura de transport respecte a la fracció no seleccionada.

3.2.2.1 Criteris d'anàlisi

La valoració de les poblacions cel·lulars seleccionades es van fer mitjançant un microscopi de fluorescència Olympus BX-60 (Olympus Barcelona) equipat amb un filtre multibanda (DAPI/FITC/Texas Red) i filtres específics per a FITC i Cy3. Per detectar les cèl·lules apoptòtiques es va utilitzar annexina V conjugada amb FITC (AV-FITC). L'annexina estableix unions específiques en presència de Ca^{2+} amb la fosfatidilserina (PS). Per detectar la necrosi es va utilitzar iodur de propidi; un agent intercalant del DNA no permeable a la membrana plasmàtica (**figura 3.2**).

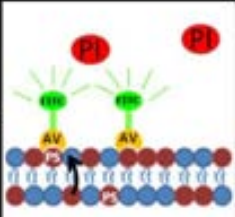
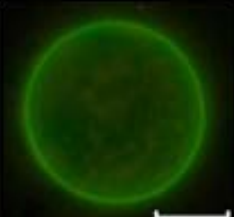
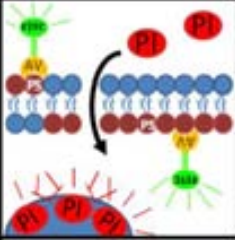
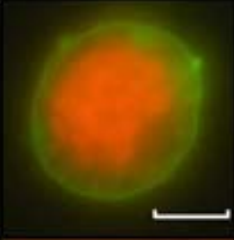
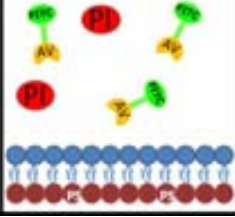
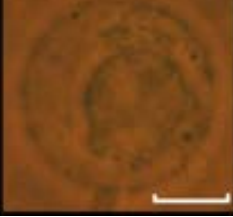
Poblacions cel·lulars	Esquema	Marcatge AV-FITC	Marcatge IP	Imatges
Apoptòtica		+	-	
Necròtica		+	+	
Viable		-	-	

Figura 3.2. Esquema per identificar les poblacions apoptòtica, necròtica i viable. La barra d'escala representa 10 μm .

Durant els estadis inicials de l'apoptosi, la PS es transloca de la monocapa interna a l'externa de la membrana plasmàtica i això possibilita la unió d'AV-FITC. La integritat de la membrana plasmàtica evita l'entrada de l'IP i, per tant, el marcatge nuclear. Per contra, les cèl·lules necròtiques presenten la membrana alterada i, per tant, permeable a l'IP. En aquest cas podem observar la fluorescència provinent de l'IP i la fluorescència del FITC provinent de la unió de l'AV-FITC a la PS d'ambdues monocapes (**figura 3.2**). Les cèl·lules viables no presenten cap marcatge ja que són impermeables a l'IP i no presenten la PS translocada. Per identificar aquestes últimes es va fer una valoració amb camp clar combinada amb fluorescència que permet identificar tots tres tipus cel·lulars (**figura 3.3**).

Es van analitzar 100 cèl·lules de la mostra d'estudi de cada pacient per corroborar la selecció de les poblacions al citòmetre de flux.

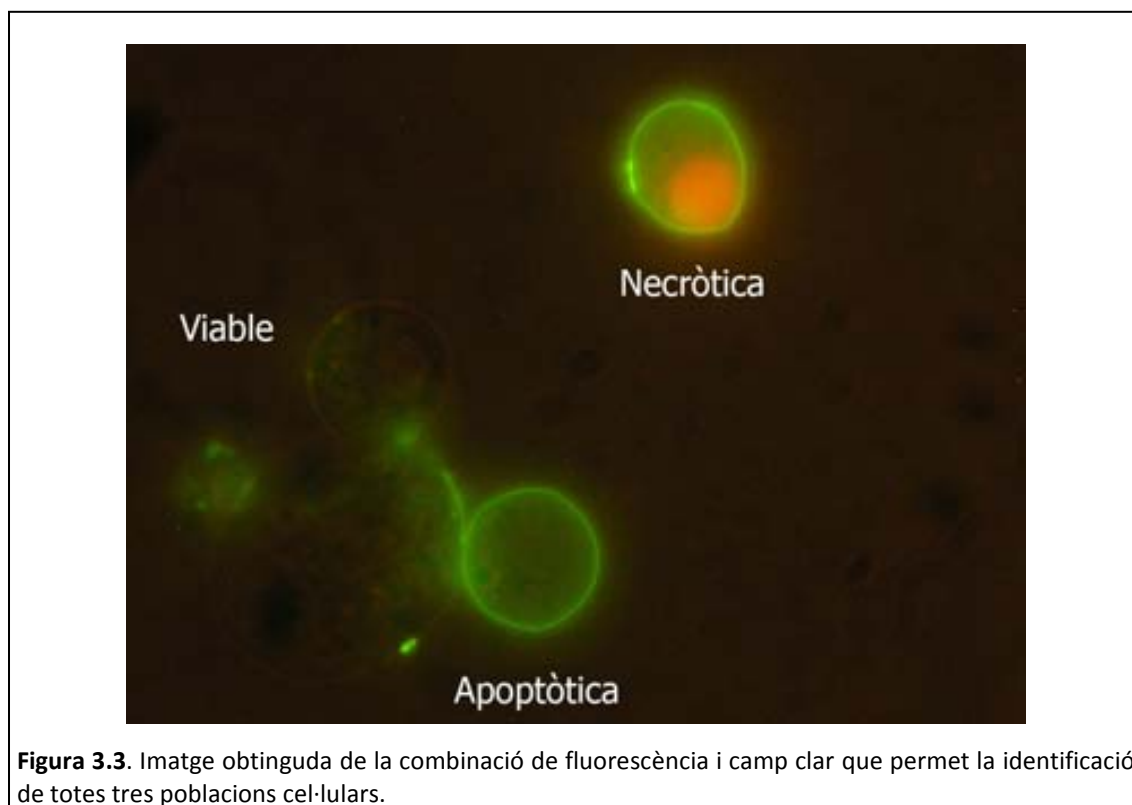


Figura 3.3. Imatge obtinguda de la combinació de fluorescència i camp clar que permet la identificació de totes tres poblacions cel·lulars.

3.2.3 Selecció mitjançant citometria de flux

Els experiments es van fer a la Unitat de Citometria de Flux (Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona; Barcelona). La identificació i la selecció de les poblacions es van dur a terme mitjançant un citòmetre de flux Moflo (DakoCytomation, Fort Collins, Colorado, EUA). L'excitació de la mostra es va fer amb un làser d'argó *Coherent Enterprise II*.

El funcionament de citòmetre es basa en la dispersió dels fotons de làser que incideix sobre les estructures cel·lulars i en la variació de la longitud d'ona en incidir sobre els fluorocroms (**figura 3.4**). L'emissió de fluorescència es captada per una sèrie de detectors associats a un programari que tradueix la longitud d'ona i el grau de dispersió en paràmetres d'intensitat de fluorescència, mida i complexitat cel·lulars.

Quan els fotons del làser incideixen en les cèl·lules es dispersen en diferents direccions i amb diferents longituds d'ona (**figura 3.4**, A i B). Els receptors frontals i laterals capten els fotons corresponents a la llum d'excitació (488 nm) que aporten informació relacionada amb la mida (dispersió frontal o *Forward Scatter*; FS) i a la complexitat cel·lular (dispersió lateral o *Side Scatter*; SS) (**figura 3.4**, C). Al mateix temps els detectors de fluorescència capten els fotons emesos en verd (FITC; 530nm) i vermell (IP; 630 nm) (**figura 3.4**, A i B). L'alineació òptica es va basar en el senyal optimitzat proporcionat per esferes de làtex fluorescents de 10 µm de diàmetre (Flowcheck, Coulter Corporation, Miami, Florida, EUA).

Abans de fer els processaments de les mostres i amb l'objectiu d'evitar la presència d'agregats, les suspensions cel·lulars es van filtrar amb una malla de nital de 70 micròmetres de diàmetre (Sefar Mayssa; Cardedeu, Barcelona). La purificació de les cèl·lules es va basar en un sistema de formació de gotes i separació per càrrega electrostàtica. Es va utilitzar un TIP de 70 micròmetres i una pressió de la coberta i de la mostra de 10 PSI (*Pounds per Square Inch*). Els agregats cel·lulars es van descartar utilitzant l'amplada del pic del senyal d'inici.

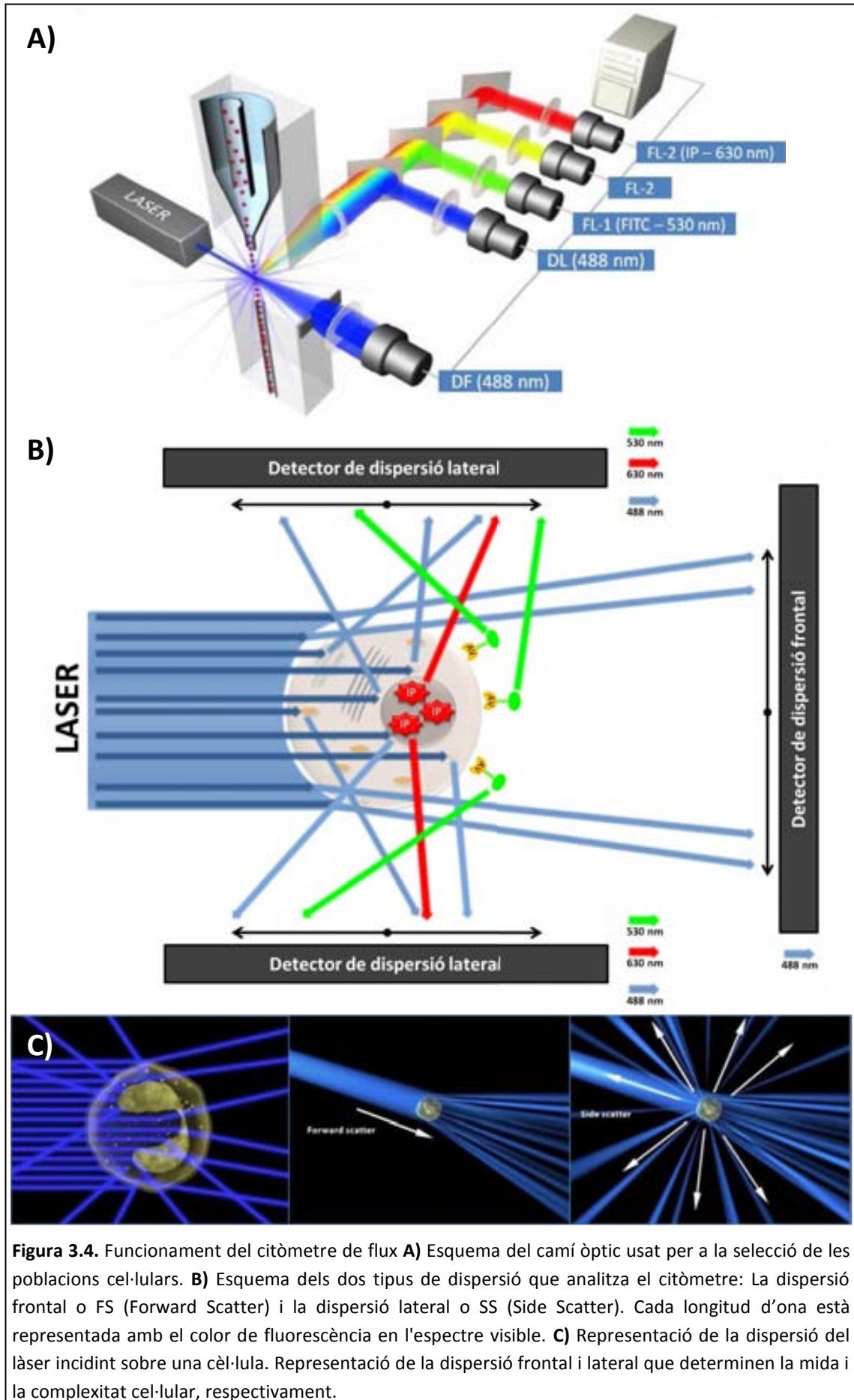


Figura 3.4. Funcionament del citòmetre de flux **A)** Esquema del camí òptic usat per a la selecció de les poblacions cel·lulars. **B)** Esquema dels dos tipus de dispersió que analitza el citòmetre: La dispersió frontal o FS (Forward Scatter) i la dispersió lateral o SS (Side Scatter). Cada longitud d'ona està representada amb el color de fluorescència en l'espectre visible. **C)** Representació de la dispersió del làser incidint sobre una cèl·lula. Representació de la dispersió frontal i lateral que determinen la mida i la complexitat cel·lular, respectivament.

Per establir els paràmetres de selecció i les posicions de les poblacions cel·lulars en cada pacient es va analitzar les poblacions detectades amb el citòmetre. El protocol aplicat és següent:

- Determinar la població corresponent a cèl·lules informatives (polígon R1) a partir dels valors de dispersió lateral (SS lineal) i frontal (FS log) (**figura 5, A**). Aquesta regió permet descartar agregats (dreta) i fragments cel·lulars (esquerra).
- Posicionar les poblacions apoptòtica, necròtica i viable mitjançant els controls de marcatge específics doble negatiu, el control d'annexina V i el d'iodur de propidi (**figura 3.5, B₁₋₃ / figura 3.1**). Aquesta operació es va fer a partir de les cèl·lules informatives situades dins el polígon R1.

Un cop determinat el polígon R1 i establerts els perfils de fluorescència dels fluorocroms, es fa la selecció de les poblacions cel·lulars:

- Seleccionar les poblacions apoptòtiques (R2; AV positiu, IP negatiu) i viables (R3; doble negatiu) de la fracció d'anàlisi (**figura 3.5, C**).
- Recollir les cèl·lules apoptòtiques i viables en dos tubs amb 500 µl de medi 3 (**annex I**) a temperatura ambient.

En el decurs del procediment de selecció, la fracció no seleccionada es va emmagatzemar a les fosques i a temperatura ambient per emular les condicions de la fracció processada a través del citòmetre (**figura 1.1**).

Finalment, les dues fraccions seleccionades (apoptòtica i viable) i la fracció no seleccionada es van transportar al nostre laboratori a 4 °C en gel picat.

La puresa de la selecció es va avaluar al microscopi de fluorescència remarcant una alíquota de les fraccions seleccionades amb annexina V-FITC / iodur de propidi (vegeu l'apartat **3.2.2**). Les fraccions es van emmagatzemar a 4 °C.

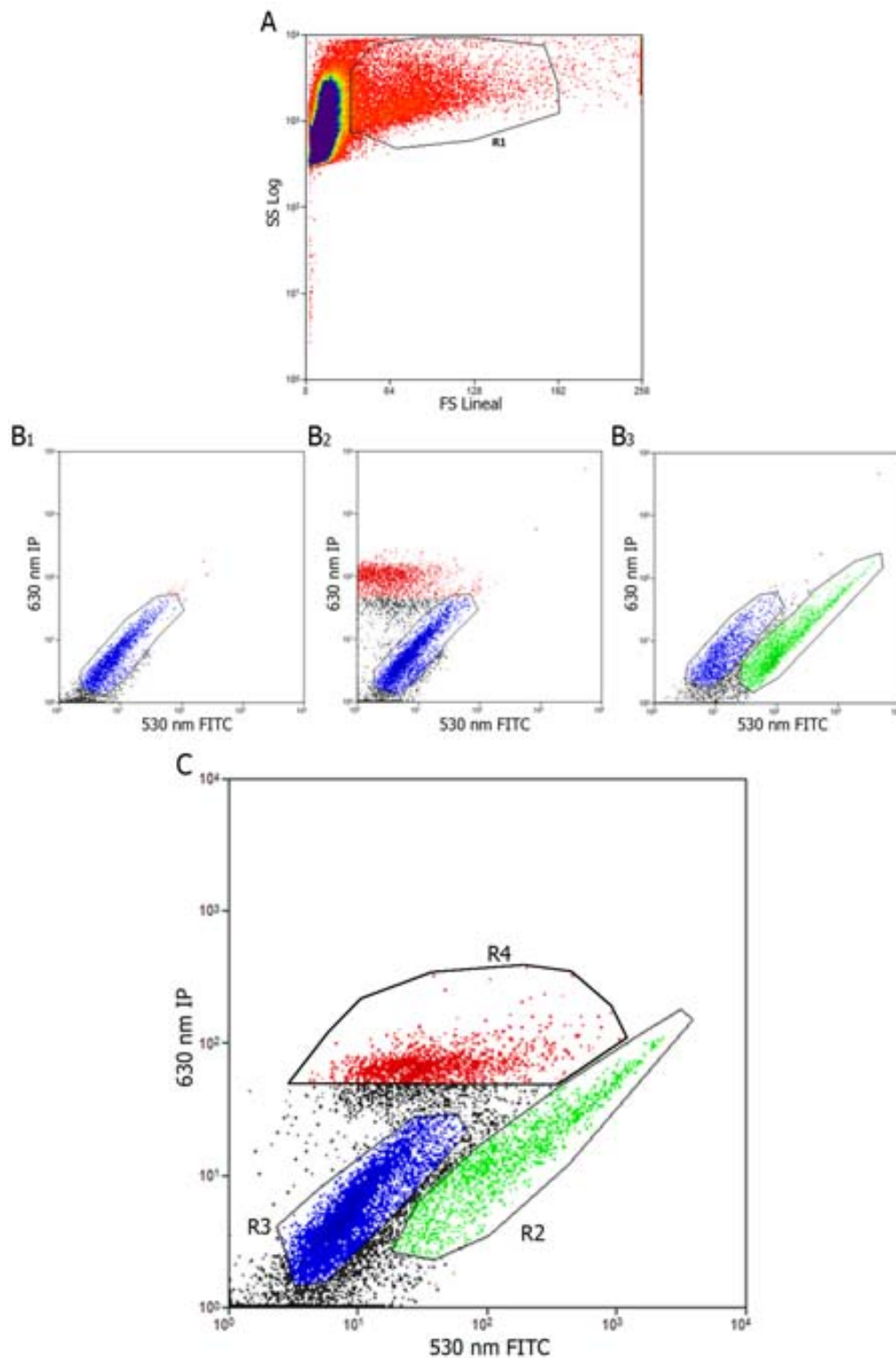


Figura 3.5. Gràfics de citometria de flux. **A)** Finestra on es representa dispersió lateral (SS-Side Scatter) i frontal (FS-Forward Scatter). El polígon R1 selecciona la població d'estudi sense fragments cel·lulars (esquerra) ni agregats (dreta). Els gràfics següents mostren únicament la fluorescència de les cèl·lules incloses al polígon R1. **B.1)** Control doble negatiu: població cel·lular sense marcatge (en blau). **B.2)** Control d'iodur de propidi: població necròtica (en vermell), població sense marcatge (en blau). **B.3)** Control annexina V: població apoptòtica (en verd) i població sense marcatge (en blau). **C)** Fracció d'anàlisi (annexina V-FITC combinat amb iodur de propidi): s'hi distingeixen les poblacions apoptòtica (R2; verd), viable (R3; en blau) i necròtica (R4; en vermell). Les poblacions seleccionades corresponen als polígons R2 i R3 de la finestra **C**.

3.2.4 Fixació cel·lular

El protocol de fixació es va aplicar sobre mostres esteses amb una citocentrífuga (Cytospin 3. Shandon Scientific Limited, Anglaterra) de velocitat baixa que permet dipositar suspensions cel·lulars sobre portaobjectes tot mantenint la integritat cel·lular. Quan la citocentrífuga és en repòs (és inactiva) la inclinació que adopta el conjunt ABCD (figura 3.6) no permet la sortida de la suspensió cel·lular. Quan s'inicia la rotació (és activa) la força centrífuga fa que el conjunt canviï a posició vertical. Aquest moviment permet la sortida de la suspensió cel·lular a través del conducte situat sota el pouet de la columna de càrrega que impacta sobre el portaobjectes, la qual cosa produeix l'extensió del material en una àrea de 28 mm² de diàmetre.

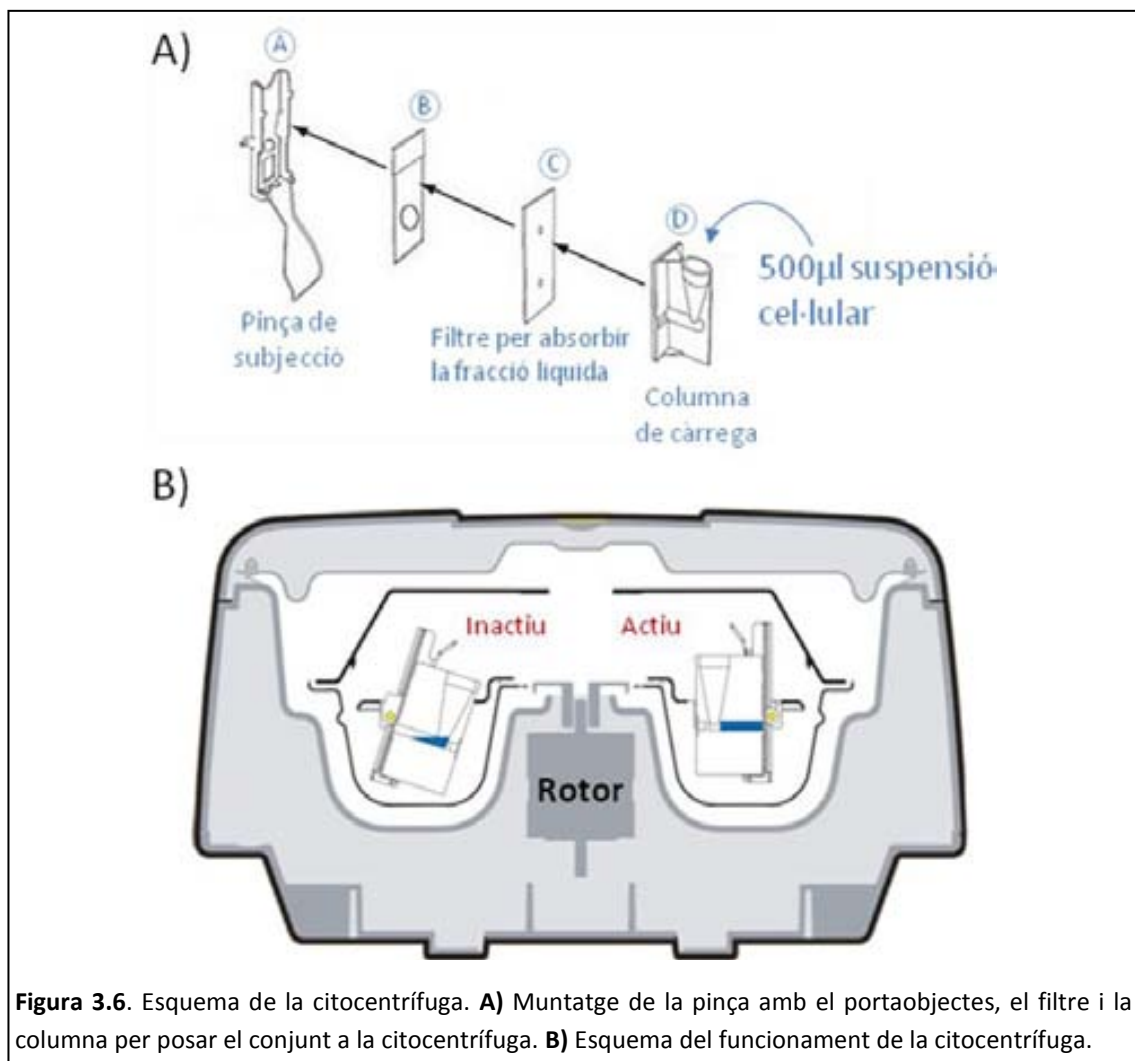


Figura 3.6. Esquema de la citocentrífuga. **A)** Muntatge de la pinça amb el portaobjectes, el filtre i la columna per posar el conjunt a la citocentrífuga. **B)** Esquema del funcionament de la citocentrífuga.

Les etapes del protocol es detallen a continuació:

- Centrifugar les suspensions cel·lulars (fraccions seleccionades i no seleccionades) a 500 g durant 5 minuts.
- Resuspendre el pèl·let amb solució hipotònica (KCl 0.075 M) fins a assolir una concentració d' $1,25 \cdot 10^5$ cèl·lules/ml i incubar durant 25 minuts a 37 °C.
- Afegir-hi fixador de Carnoy gota a gota i en agitació per assolir una concentració d' $1 \cdot 10^5$ cèl·lules/ml.
- Muntar els portaobjectes sobre les pinces de subjecció de la citocentrífuga amb els filtres i les columnes de càrrega (**figura 3.6, A**).
- Carregar 500 µl al pouet de les columnes de la citocentrífuga i centrifugar 5 min a 1.000 rpm.
- Desmuntar el conjunt, enretirar el portaobjectes i deixar-lo assecar en posició horitzontal.
- Fixar la mostra submergint el portaobjectes en una solució de paraformaldehid 4 % (**annex I**) durant 10 minuts.
- Rentar dues vegades amb una solució de 2xSSC (*Sodium Saline Citrate*) durant 3 minuts.
- Deshidratar amb una bateria de solucions d'etanol amb aigua destil·lada (al 70 %, 90 % i 100 %) durant 2 minuts cadascun i deixar assecar en posició vertical.
- Emmagatzemar els portaobjectes a -20 °C durant almenys 48 h abans d'aplicar el protocol de FISH.

3.2.5 Hibridació *in situ* fluorescent (FISH)

La fixació de les mostres amb paraformaldehid requereix l'aplicació dels tractaments següents previs al procediment de FISH amb la finalitat d'obtenir una bona eficiència d'hibridació de les sondes:

- 1) Permeabilització de la membrana cel·lular:

- Rentar amb la solució de 2xSSC durant 5 minuts.
- Permeabilitzar amb la solució de 2xSSC amb 0,5 % de Triton X-100 durant 10 minuts.
- Rentar amb la solució de 2xSSC durant 5 minuts.
- Deshidratar la mostra amb una bateria de solucions d'etanol amb aigua destil·lada al 70 %, 85 % i 100 % durant 1 minut cadascuna.
- Deixar assecar en posició vertical.

2) Eliminació de les restes citoplasmàtiques:

- Aplicar 20 µl d'una solució d'RNasa A (**annex I**) damunt la mostra, cobrir amb un cobreobjectes i incubar durant 30 minuts en una cambra humida a 37 °C.
- Treure els cobreobjectes i rentar dues vegades consecutives amb la solució de 2xSSC durant 5 minuts.
- Incubar els portaobjectes en una solució de pepsina (**annex I**) preescalfada a 37 °C durant 5 minuts.
- Rentar dues vegades consecutives amb la solució de 2xSSC durant 5 minuts i deixar assecar en posició vertical.

3) Refixació de la mostra:

- Submergir els portaobjectes en una solució de formaldehid 1 % (**annex I**) durant 2 minuts.
- Rentar amb la solució de 2xSSC i deixar assecar en posició vertical.

Les hibridacions es van fer amb sondes de DNA específiques de les regions pericentromèriques dels cromosomes X, Y i 18 (CEP Y, *Spectrum Orange*; CEP X, *Spectrum Green*; CEP 18, *Spectrum Aqua*. AneuVysion multicolor DNA Probe kit, Vysis; Abbot molecular, Abbot Park, IL. EUA).

El protocol d'hibridació utilitzat és el següent:

- Desnaturalitzar la mostra amb una solució de formamida 70 % (**annex I**) durant 2 minuts a 73 °C.

- Deshidratar amb una bateria de solucions d'etanol al 70 %, 85 % i 100 % durant 1 minut cadascun i deixar assecar en posició vertical.
- Afegir al cobreobjectes 2–5 µl de la sonda (depenent de l'àrea que calgui cobrir).
- Col·locar el cobreobjectes sobre la zona a hibridar i segellar amb cola d'enquadernar.
- Incubar a 37 °C en cambra humida durant un mínim de 12 hores.
- Retirar la cola i el cobreobjectes amb cura, desplaçant-lo lateralment.
- Rentar el portaobjectes amb una solució de 0,4xSSC amb 0,3 % NP-40 durant 2 minuts a 73 °C.
- Rentar amb una solució de 2xSSC amb 1 % NP-40 durant 1 minut a temperatura ambient.
- Deixar assecar en posició vertical.
- Afegir 2–5 µl de DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) i segellar el cobreobjectes amb esmalt d'ungles.
- Emmagatzemar a –20 °C.

Per a la hibridació dels espermatozoides, es va practicar un tractament de descondensació de la cromatina espermàtica. La hibridació es va fer amb la combinació de sondes descrita anteriorment. Es va aplicar el protocol següent:

- Rentar els portaobjectes dues vegades consecutives amb la solució de 2xSSC durant 3 minuts.
- Deshidratar amb una bateria de solucions d'etanol amb aigua destil·lada al 70 %, 85 % i 100 % durant 2 minuts.
- Incubar el portaobjectes durant 1 hora a 37 °C en una solució de DTT 5 Mm (**annex I**).
- Rentar dues vegades amb la solució de 2xSSC durant 3 minuts i deshidratar amb una bateria de solucions d'etanol en aigua destil·lada al 70 %, 85 % i 100 % durant 1 minut.
- Deixar assecar en posició vertical i afegir 2–5µl de sonda damunt el cobreobjectes.
- Col·locar el cobreobjectes damunt la zona que cal hibridar i segellar amb cola d'enquadernar.
- Codesnaturalitzar el portaobjectes amb les sondes a 72 °C durant 2 minuts (Hybrite. Vysis, Inc. Drowners Grove, IL. EUA).

- Incubar a 37 °C en cambra humida durant un mínim de 12 h.
- Enretirar la cola i el cobreobjectes amb cura, desplaçant-lo lateralment.
- Rentar el portaobjectes amb una solució de 0,4xSSC amb 0,3 % NP-40 durant 2 minuts a 73 °C.
- Rentar amb una solució de 2 x SSC amb 1 % NP-40 durant 1 minut a temperatura ambient.
- Deixar assecar el portaobjectes en posició vertical i afegir 2–5 µl de DAPI sobre el cobreobjectes.
- Col·locar el cobreobjectes sobre la zona hibridada i segellar amb esmalt d'ungles.
- Emmagatzemar a –20 °C.

L'avaluació de la dotació cromosòmica es va fer amb el microscopi de fluorescència, Olympus BX-60, equipat amb un filtre de triple banda (DAPI/FITC/Texas Red) i filtres específics per a FITC, Cy3 i Aqua. Per a cada fracció (apoptòtica, viable i no seleccionada) es va valorar el nombre de cèl·lules euploides i aneuploides per als cinc tipus cel·lulars analitzats: cèl·lules germinals prereducionals, cèl·lules germinals postreducionals, fases meiòtiques, espermatozoides i cèl·lules de Sertoli. Es va avaluar un portaobjectes de cada pacient per a cadascuna de les tres fraccions.

3.2.5.1 Criteris d'anàlisi

L'anàlisi citogenètica es va practicar segons criteris de valoració que combinen l'anàlisi de la morfologia nuclear i cromosòmica amb la valoració dels senyals obtinguts de la FISH.

1) Identificació cel·lular segons la morfologia nuclear i cromosòmica:

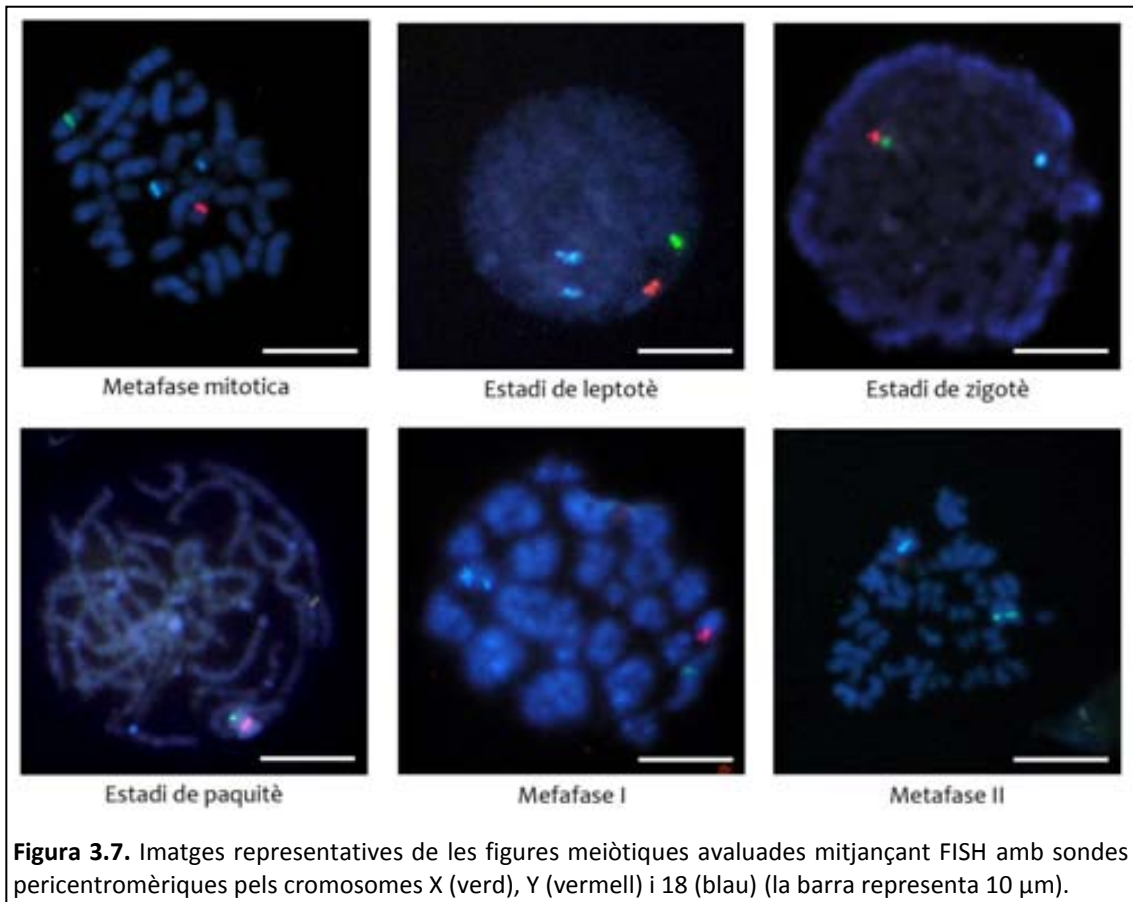
- *Cèl·lules germinals en interfase*: nuclis de morfologia arrodonida, cromatina descondensada i mida variable.
- *Cèl·lules de Sertoli*: nuclis de morfologia ovalada i cromatina descondensada. Es caracteritzen per la presència de nuclèols prominents.

- *Figures meiòtiques*: cèl·lules amb les característiques pròpies dels estadis de profase I, metafase I i metafase II.
- *Espermatozoides*: nuclis amb morfologia ovalada, cromatina condensada. Presència de cua.
- *Metafases somàtiques*: cèl·lules amb morfologia metafàsica característica.

2) Valoració dels senyals d'hibridació.

- *Cèl·lules germinals interfàsiques, espermatozoides i cèl·lules de Sertoli*: la valoració dels senyals d'hibridació es va fer utilitzant els criteris de mida, distància i intensitat descrits prèviament al nostre grup (Blanco *et al.* 1996). Així doncs, en el cas de cèl·lules portadores de més d'un senyal d'hibridació pel mateix cromosoma, per ser considerats senyals independents, aquest havien de tenir la mateixa mida i mateixa intensitat, i estar separats entre ells per una distància superior al diàmetre de cada senyal.
- *Figures meiòtiques*: la valoració dels senyals d'hibridació es va fer basant-se en la dinàmica i la morfologia cromosòmica per a cadascuna de les etapes analitzades (**figura 3.7**):
 - *Leptotè/zigotè*: presència de senyals d'hibridació independents indicatius de l'absència d'aparellament.
 - *Paquitè*: colocalització dels senyals pels cromosomes sexuals, indicatius de presència de la vesícula sexual. Senyals d'hibridació solapats per l'autosoma que es visualitzen amb una intensitat i mida superiors a la d'un sol senyal d'hibridació.
 - *Metafase I*: presència d'un senyal d'hibridació per a cadascun dels cromosomes sexuals, que estan formant un bivalent. Dos senyals d'hibridació solapats per l'autosoma que es visualitzen amb una intensitat i mida superiors a la d'un sol senyal d'hibridació.
 - *Metafase II*: presència d'un senyal d'hibridació per un dels cromosomes sexuals i un senyal d'hibridació per l'autosoma.

- *Metafase mitòtica*: presència de senyals independents pels cromosomes sexuals i per l'autosoma.



3.3 ANÀLISI DELS RESULTATS

L'anàlisi estadística es va fer amb el suport especialitzat del Servei d'Estadística Aplicada de la Universitat Autònoma de Barcelona (**annex II**). El programari utilitzat va ser el SAS v9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) i es va establir el nivell de significació en 0,05. Es van agrupar el nombre de cèl·lules euploides i aneuploides observades a totes tres fraccions (apoptòtica, viable i no seleccionada) en els cinc tipus cel·lular analitzats (cèl·lules germinals prereduccionals, figures meiòtiques, cèl·lules germinals postreduccionals, espermatozoides i cèl·lules de Sertoli) per a cadascun dels pacients ($n = 14$). Aquesta agrupació va permetre obtenir el nombre total de cèl·lules, el nombre total d'anomalies i el percentatge d'anomalies de cadascuna de les mostres d'anàlisi.

3.3.1 Anàlisi estadística poblacional

3.3.1.1 *Estudi bivariant*

Per a cada tipus cel·lular es va comparar el percentatge d'anomalies entre les tres fraccions utilitzant un model no paramètric (test de Kruskal-Wallis). En cas que s'obtingués un resultat significatiu, es van fer els contrastos 2 a 2 a posteriori. Aquesta acció va permetre determinar quines fraccions presentaven diferències i en quin grau de significació.

L'anàlisi dels percentatges no té en compte el nombre total de cèl·lules observades a cada pacient ni les mesures repetides entre individus. Per superar aquesta limitació es va considerar un model lineal generalitzat amb mesures repetides per modelar el nombre de cèl·lules anòmales en funció del grup tenint en compte el total de cèl·lules de cada individu (aquesta informació s'ha considerat com a *offset*). Es va corregir el problema de sobredispersió en la variable resposta.

Per a cadascuna de les fraccions es van obtenir els percentatges de cèl·lules anòmales estimats pel model amb un interval de confiança del 95 %.

3.3.1.2 *Estudi longitudinal*

Es va considerar un model lineal generalitzat amb mesures repetides per analitzar el nombre de cèl·lules amb anomalies segons el tipus cel·lular i la fracció, conjuntament. Es va descartar de l'anàlisi les cèl·lules de Sertoli (cèl·lules en G0 i, per tant, sense possibilitat d'acumulació d'anomalies). Com a variables explicatives es van fer servir els tipus, la fracció i la interacció entre totes dues variables. Es va analitzar la distribució lineal de les anomalies i l'acumulació en els diferents tipus i fraccions per determinar si la selecció va ser uniforme en els diferents tipus.

Per a cadascun dels grups es van obtenir els percentatges de cèl·lules anòmales estimats pel model amb un interval de confiança del 95 % i es van fer comparacions 2 a 2 per determinar el grau de significació de les diferències.

3.3.2 Anàlisi estadística individual

Amb la finalitat de detectar grups d'individus amb percentatges similars de cèl·lules anòmales es va fer una anàlisi de clústers mitjançant un algoritme de classificació. La unitat de comparació són els percentatges de cèl·lules germinals amb anomalies, ordenats cronològicament com a conjunt de variables, que anomenem perfils d'anomalies. L'algoritme ens agrupa els individus amb percentatges similars per a totes les variables del perfil.

Es van fer perfils amb les dotze dades de cada pacient (percentatges de cèl·lules amb anomalies en els quatre tipus cel·lulars per cadascuna de les tres fraccions). Es van agrupar els perfils en clústers per determinar agrupacions de pacients segons els percentatges d'anomalies que presenten conjuntament a les tres fraccions.

R ESULTATS

4.1 OPTIMITZACIÓ DE LA METODOLOGIA

La disgregació enzimàtica del teixit testicular va permetre obtenir concentracions cel·lulars entre $1,7 \cdot 10^5$ i $9,1 \cdot 10^6$ cèl·lules (**taula 4.1**). La viabilitat de les cèl·lules disgregades es va avaluar amb blau tripan donat valors mitjans de $80,2 \% \pm 9,1 \%$.

Taula 4.1. Resultats de la disgregació i el marcatge específic d'apoptosi i necrosi en les disset biòpsies testiculars utilitzades per a l'optimització de la metodologia.

	Cèl·lules disgregades	Cèl·lules viables ¹	Cèl·lules apoptòtiques	Cèl·lules necròtiques	Cèl·lules viables ²
446BT	$1,8 \cdot 10^5$	-	11 %	40,2 %	48,9 %
452BT	$1,5 \cdot 10^6$	-	-	-	-
453BT	$5,7 \cdot 10^6$	-	-	-	-
454BT	$4,6 \cdot 10^6$	-	16 %	42,2 %	39,8 %
455BT	$8,2 \cdot 10^5$	-	-	-	-
478BT	$9,1 \cdot 10^6$	-	-	-	-
480BT	$1 \cdot 10^6$	-	16 %	30 %	54 %
486BT	$4,4 \cdot 10^6$	-	15 %	27 %	58 %
487BT	$5 \cdot 10^6$	-	14 %	46 %	39 %
492BT	$1,1 \cdot 10^6$	-	3 %	46 %	51 %
498BT	$1,7 \cdot 10^5$	-	14 %	7 %	79 %
501BT	$4,7 \cdot 10^6$	87 %	48 %	13 %	39 %
526BT	$1,1 \cdot 10^6$	81,4 %	21,1 %	0 %	78,9 %
527BT	$2,8 \cdot 10^5$	65,6 %	16 %	18 %	66 %
537BT	$6,2 \cdot 10^5$	88,3 %	26,2 %	0 %	73,8 %
538BT	$8,9 \cdot 10^5$	-	39,3 %	4,5 %	56,2 %
554BT	$1,3 \cdot 10^6$	78,6 %	12 %	12 %	75 %
Mitjana	$2,5 \cdot 10^6$	80,2 %	19,4 %	22 %	58,4 %
SD	$2,6 \cdot 10^6$	9,1 %	12,1 %	17,5 %	14,9 %

(1)Viabilitat analitzada amb blau tripan; (2)Viabilitat analitzada amb annexina V i iodur de propidi.

El marcatge específic amb AV i IP va permetre identificar al microscopi totes tres poblacions, amb valors (mitjana \pm SD) del 19,4 % \pm 12,1 % per a la població apoptòtica, del 22 % \pm 17,5 % per a la població necròtica i del 58,4 % \pm 14,9 % per a la viable (**taula 4.1**).

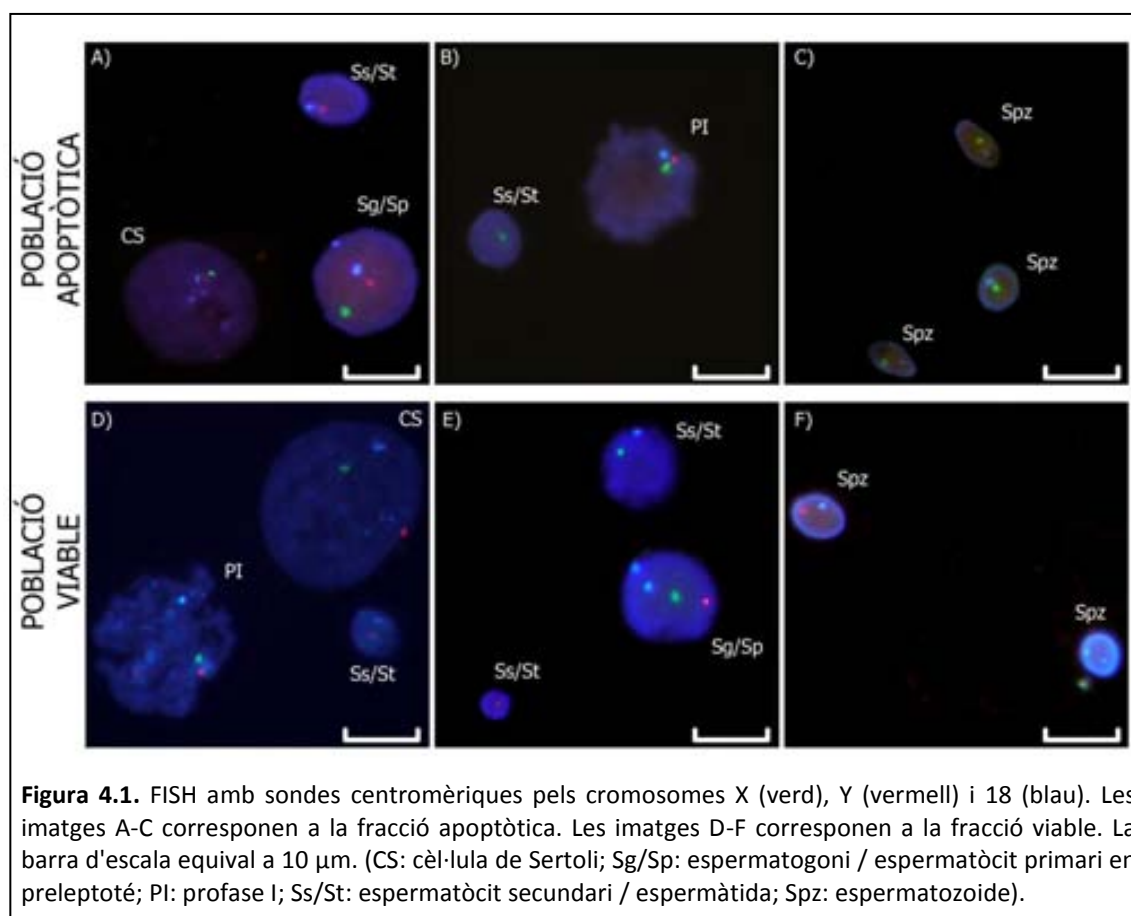
Un cop optimitzats els protocols de disgregació i marcatge específic, les suspensions cel·lulars marcades es van utilitzar per a la posada a punt de la separació mitjançant citometria de flux. Aquesta va ser eficient utilitzant un *tip* de 70 micròmetres i abaixant la pressió de la mostra i de la coberta fins a 10 PSI. Amb aquestes condicions es van analitzar les mostres 537, 538 i 554 per quantificar els percentatges mitjans de cèl·lules apoptòtiques (**taula 4.2**) i es va observar que s'ajustaven als avaluats prèviament mitjançant microscòpia de fluorescència (**taula 4.1**). La puresa de les fraccions seleccionades es va situar entre el 62 % i el 77 % per a la fracció apoptòtica i entre el 74 i el 100 % en la viable (**taula 4.2**).

Taula 4.2. Resultats de les poblacions analitzades al citòmetre de flux.

	Viable			Apoptosi		
	Cèl·lules recuperades	Fracció	Puresa	Cèl·lules recuperades	Fracció	Puresa
537BT	$1,8 \cdot 10^5$	53,7 %	74 %	$1,1 \cdot 10^5$	22 %	77 %
538BT	$1,9 \cdot 10^5$	42,7 %	74 %	$1,5 \cdot 10^5$	27,3 %	72 %
554BT	$2,9 \cdot 10^5$	40 %	100 %	$9,3 \cdot 10^5$	16,6 %	62 %
Mitjana	$2,2 \cdot 10^5$	45,5 %	82,7 %	$4 \cdot 10^5$	22 %	70,3 %
SD	$6,2 \cdot 10^4$	7,3 %	15 %	$4,6 \cdot 10^5$	5,3 %	7,6 %

La utilització de la citocentrífuga per estendre les fraccions seleccionades i la fixació posterior amb paraformaldehid va donar valors de pèrdua cel·lular inferiors al 10 %.

Els tractaments que es van fer a les mostres abans de la FISH (permeabilització de la membrana, eliminació del citoplasma i refixació de la mostra) van permetre obtenir hibridacions sense soroll de fons, amb senyals puntuals i avaluables a través del microscopi (**figura 4.1**). Les extensions, tant a la fracció apoptòtica com a la fracció viable, van mostrar cèl·lules representatives de totes les fases de l'espermatogènesi i cèl·lules de Sertoli (**figura 4.1**), a més a més d'eficiències d'hibridació superiors al 98 %.



4.2 ANÀLISI DE LA POBLACIÓ D'ESTUDI

4.2.1 Disgregació enzimàtica

Els resultats de la disgregació en les mostres d'anàlisi es detallen a la **taula 4.3**. La mitjana de cèl·lules disgregades obtingudes va ser de $2,9 \cdot 10^6 \pm 1,2 \cdot 10^6$. La viabilitat cel·lular avaluada amb blau tripan va superar el 70 % en tots els casos analitzats.

4.2.2 Marcatge específic d'apoptosi i necrosi

A tots els pacients es va analitzar la proporció de cadascuna de les tres poblacions en la mostra d'anàlisi. Els percentatges observats van variar entre el 6 - 40 % de cèl·lules apoptòtiques, entre l'1 - 17 % de necròtiques i entre el 56 - 89 % de viables (**taula 4.3**).

Taula 4.3. Resultats de la disgregació i del marcatge específic.

	Cèl·lules disgregades	Cèl·lules viables ¹	Cèl·lules apoptòtiques	Cèl·lules necròtiques	Cèl·lules viables ²
555BT	2,3 · 10 ⁶	-	6 %	5 %	89 %
560BT	2,7 · 10 ⁶	-	27 %	15 %	60 %
567BT	4,6 · 10 ⁶	74 %	24 %	17 %	59 %
576BT	4,4 · 10 ⁶	87 %	27 %	12 %	61 %
577BT	5,5 · 10 ⁶	71 %	30 %	13 %	57 %
578BT	1,6 · 10 ⁶	78 %	40 %	4 %	56 %
579BT	1,7 · 10 ⁶	89,4 %	32 %	10 %	58 %
585BT	3,4 · 10 ⁶	100 %	22 %	9 %	69 %
586BT	2,3 · 10 ⁶	95,6 %	36 %	3 %	61 %
597BT	1,8 · 10 ⁶	91,2 %	24 %	10 %	66 %
598BT	2,1 · 10 ⁶	98,4 %	32 %	2 %	66 %
599BT	2,3 · 10 ⁶	94,3 %	25 %	1 %	74 %
600BT	2 · 10 ⁶	95,7 %	26 %	2 %	72 %
602BT	3,4 · 10 ⁶	99,4 %	20 %	2 %	78 %
Mitjana	2,9 · 10 ⁶	89,5 %	27 %	7,5 %	66,1 %
SD	1,2 · 10 ⁶	10 %	8 %	5,4 %	9,5 %

(1)Viabilitat analitzada amb blau tripan; (2)Viabilitat analitzada amb annexina V i iodur de propidi.

4.2.3 Selecció mitjançant citometria de flux

El percentatge de cèl·lules informatives que configuraven el polígon R1 es va situar entre el 26,9 % i 79,5 % de les cèl·lules introduïdes al citòmetre (**taula 4.4**). Es van separar les dues poblacions (apoptòtica i viable) en els catorze pacients analitzats. El nombre de cèl·lules recuperades va variar entre $1 \cdot 10^5$ i $7,8 \cdot 10^5$ cèl·lules apoptòtiques i entre $1,3 \cdot 10^5$ i $1,6 \cdot 10^6$ cèl·lules viables.

Taula 4.4. Resultats del procediment de selecció mitjançant citometria de flux.

	Cèl·lules fracció anàlisi	Cèl·lules informatives (R1)	Cèl·lules informatives (R1)	Viabilitat		Apoptosi	
				Cèl·lules recuperades	Fracció	Cèl·lules recuperades	Fracció
555BT	$1,4 \cdot 10^6$	$8,5 \cdot 10^5$	60,4 %	$2 \cdot 10^5$	63,49 %	$2,3 \cdot 10^5$	16,3 %
560BT	$1,2 \cdot 10^6$	$6,5 \cdot 10^5$	54,1 %	$5 \cdot 10^5$	62,53 %	$3,4 \cdot 10^5$	9,8 %
567BT	$3,1 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^6$	75,2 %	$1,6 \cdot 10^6$	60,75 %	$7,3 \cdot 10^5$	28,8 %
576BT	$2,9 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^6$	56,6 %	$8 \cdot 10^5$	42,75 %	$4,3 \cdot 10^5$	30,6 %
577BT	$4 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$	62,7 %	$1,2 \cdot 10^6$	44,2 %	$7,8 \cdot 10^5$	20,3 %
578BT	$1 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^5$	26,9 %	$1,3 \cdot 10^5$	52,1 %	$1,3 \cdot 10^5$	14,3 %
579BT	$1,3 \cdot 10^6$	$8,6 \cdot 10^5$	66,6 %	$2,5 \cdot 10^5$	41,5 %	$1,2 \cdot 10^5$	12,1 %
585BT	$3,1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	63,8 %	$8,5 \cdot 10^5$	44,6 %	$2,5 \cdot 10^5$	25,3 %
586BT	$2 \cdot 10^6$	$7,3 \cdot 10^5$	36,4 %	$3,6 \cdot 10^5$	54,1 %	$1 \cdot 10^5$	10,3 %
597BT	$1,5 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	69,7 %	$5,2 \cdot 10^5$	43,5 %	$1,8 \cdot 10^5$	8,4 %
598BT	$2 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6$	64,1 %	$4,4 \cdot 10^5$	24 %	$1,5 \cdot 10^5$	8,7 %
599BT	$2 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	54,5 %	$5,1 \cdot 10^5$	38,3 %	$4 \cdot 10^5$	6,3 %
600BT	$1,8 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	61,4 %	$6,3 \cdot 10^5$	40,8 %	$3 \cdot 10^5$	4,6 %
602BT	$3,1 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$	79,5 %	$3,4 \cdot 10^5$	26,3 %	$3,7 \cdot 10^5$	12,3 %
Mitjana	$2,2 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6$	59,4 %	$5,5 \cdot 10^5$	45,6 %	$3,5 \cdot 10^5$	14,9 %
SD	$2 \cdot 10^5$	$7,2 \cdot 10^5$	13,9 %	$5,4 \cdot 10^5$	11,6 %	$5,9 \cdot 10^5$	8 %

4.2.4 Fixació cel·lular i hibridació *in situ* fluorescent (FISH)

La fracció de la suspensió cel·lular inicial no seleccionada i les fraccions apoptòtica i viable es van estendre i fixar paral·lelament per a cadascun dels pacients.

Es va avaluar el nombre de cèl·lules euploides i aneuploides per a cada tipus cel·lulars en les tres fraccions dels catorze pacients (**Taules 4.5, 4.6 i 4.7**). En el cas de figures meiòtiques només es van observar profases I.

Taula 4.5. Nombre de cèl·lules euploides i aneuploides per pacient i per a cadascun dels tipus cel·lulars analitzats en la fracció no seleccionada.

	Prereduccional		Profase I		Postreduccional		Espermatozoides		Cèl·lules de Sertoli		No Inf.	Total
	Euploide	Aneuploide	Euploide	Aneuploide	Euploide	Aneuploide	Euploide	Aneuploide	Euploide	Aneuploide		
	555BT	245	11	173	2	491	19	11	0	18		
560BT	223	6	145	1	479	32	23	0	12	2	89	1.012
567BT	388	5	104	9	358	21	29	0	87	3	57	1.061
576BT	174	13	126	0	609	22	25	3	10	0	67	1.049
577BT	197	16	57	0	614	17	76	1	-	-	45	1.023
578BT	456	5	151	3	290	15	5	0	20	0	63	1.008
579BT	801	3	2	0	61	33	-	-	-	-	112	1.012
585BT	368	10	115	2	370	31	44	1	2	0	72	1.015
586BT	362	7	223	1	304	21	-	-	64	0	65	1.047
597BT	277	13	78	0	514	20	69	0	13	1	48	1.033
598BT	428	12	112	1	278	28	44	5	28	0	77	1.013
599BT	174	12	43	2	427	35	269	3	9	1	49	1.024
600BT	297	10	54	0	390	32	157	1	6	0	67	1.014
602BT	523	22	60	0	237	34	27	1	-	-	122	1.026
Total	4.913	145	1.443	21	5.422	360	703	14	345	8	988	14.362

No Inf.: Cèl·lules no informatives

Taula 4.6. Nombre de cèl·lules euploides i aneuploides per pacient i per a cadascun dels tipus cel·lulars analitzats en la fracció viable.

	Prereduccional		Profase I		Postredduccional		Espermatozoides		Sertoli		No Inf.	Total
	Euploide	Aneuploide	Euploide	Aneuploide	Euploide	Aneuploide	Euploide	Aneuploide	Euploide	Aneuploide		
555BT	37	5	9	0	453	5	142	1	1	0	23	676
560BT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
567BT	497	7	14	0	209	12	16	0	98	2	150	1.005
576BT	3	0	-	-	18	0	18	3	-	-	0	42
577BT	21	1	1	0	34	2	24	5	-	-	2	90
578BT	463	3	15	1	174	67	64	3	24	0	186	1.000
579BT	764	9	2	1	31	47	-	-	6	0	157	1.017
585BT	268	20	212	0	467	24	18	1	12	0	86	1.108
586BT	442	9	21	0	122	8	17	0	43	0	32	694
597BT	10	0	-	-	10	0	6	0	-	-	1	27
598BT	501	2	19	0	88	26	37	3	64	0	260	1.000
599BT	-	-	-	-	-	-	22	3	-	-	0	25
600BT	50	0	-	-	25	4	29	0	-	-	26	134
602BT	392	8	4	0	72	21	27	1	-	-	57	582
Total	3.448	64	297	2	1.703	217	420	20	248	2	980	7.400

No Inf.: Cèl·lules no informatives

Taula 4.7. Nombre de cèl·lules euploides i aneuploides per pacient i per a cadascun dels tipus cel·lulars analitzats en la fracció apoptòtica.

	Prereduccional		Profase I		Postreduccional		Espermatozoides		Sertoli		No Inf.	Total
	Euploide	Aneuploide	Euploide	Aneuploide	Euploide	Aneuploide	Euploide	Aneuploide	Euploide	Aneuploide		
555BT	42	3	15	0	603	18	103	13	-	-	203	1.000
560BT	56	14	7	0	590	20	207	7	-	-	102	1.003
567BT	113	10	31	1	781	14	4	0	32	1	28	1.015
576BT	44	20	19	0	709	31	138	8	-	-	41	1.010
577BT	46	14	11	0	662	31	209	15	-	-	36	1.024
578BT	49	5	44	2	120	13	14	1	14	0	36	298
579BT	614	28	1	0	119	37	-	-	-	-	202	1.001
585BT	133	29	78	0	362	56	202	6	6	2	149	1.023
586BT	43	7	62	1	867	15	0	0	17	1	30	1.043
597BT	123	16	113	2	603	28	115	1	9	0	89	1.099
598BT	141	6	83	1	461	40	151	6	18	0	102	1.009
599BT	15	0	26	0	47	24	98	6	-	-	32	248
600BT	277	12	28	2	420	43	175	6	23	0	85	1.071
602BT	1	2	-	-	6	1	-	-	-	-	3	13
Total	1.697	166	518	9	6.350	371	1.416	69	119	4	1.138	11.857

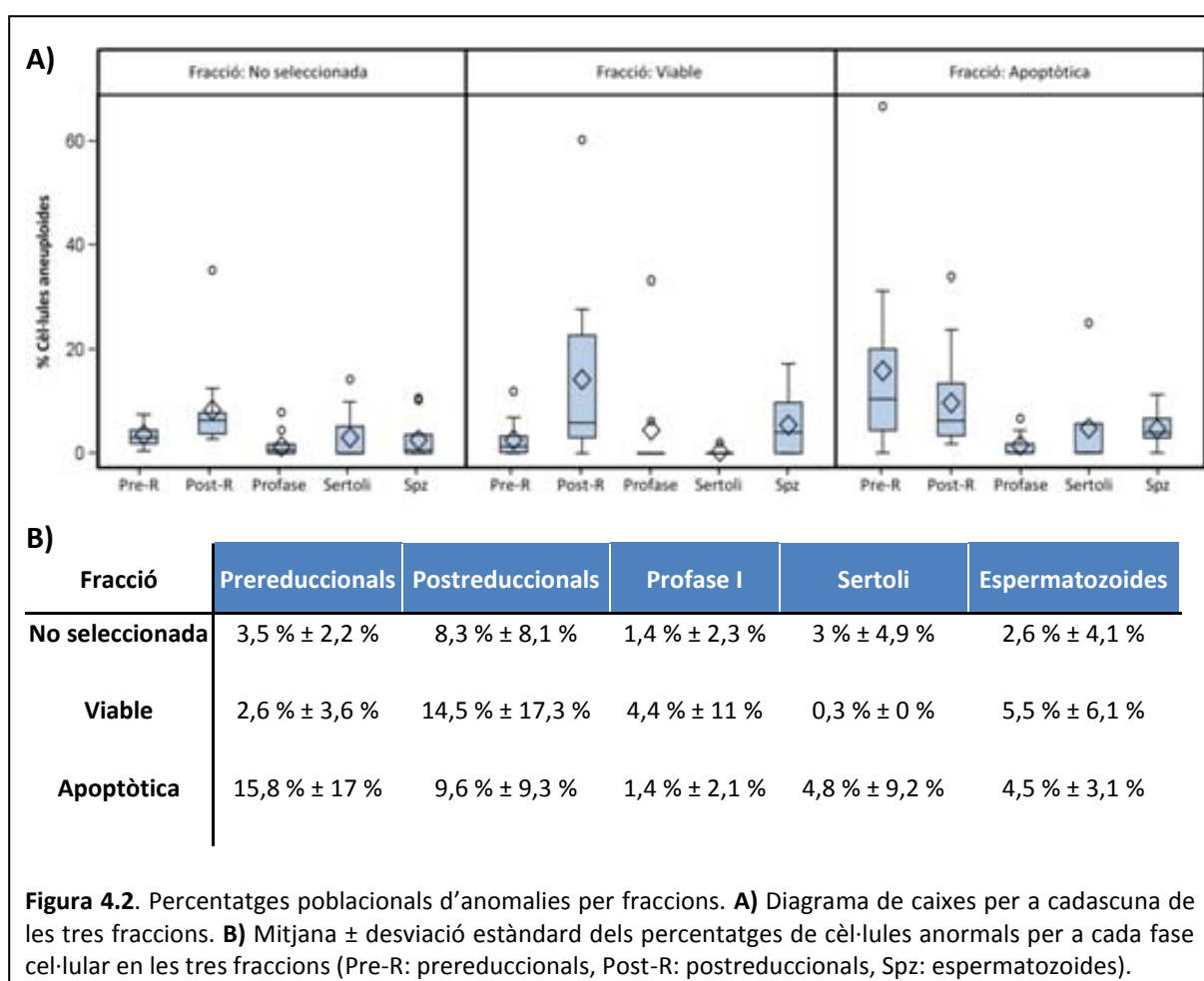
No Inf.: Cèl·lules no informatives

4.3 ANÀLISI DELS RESULTATS

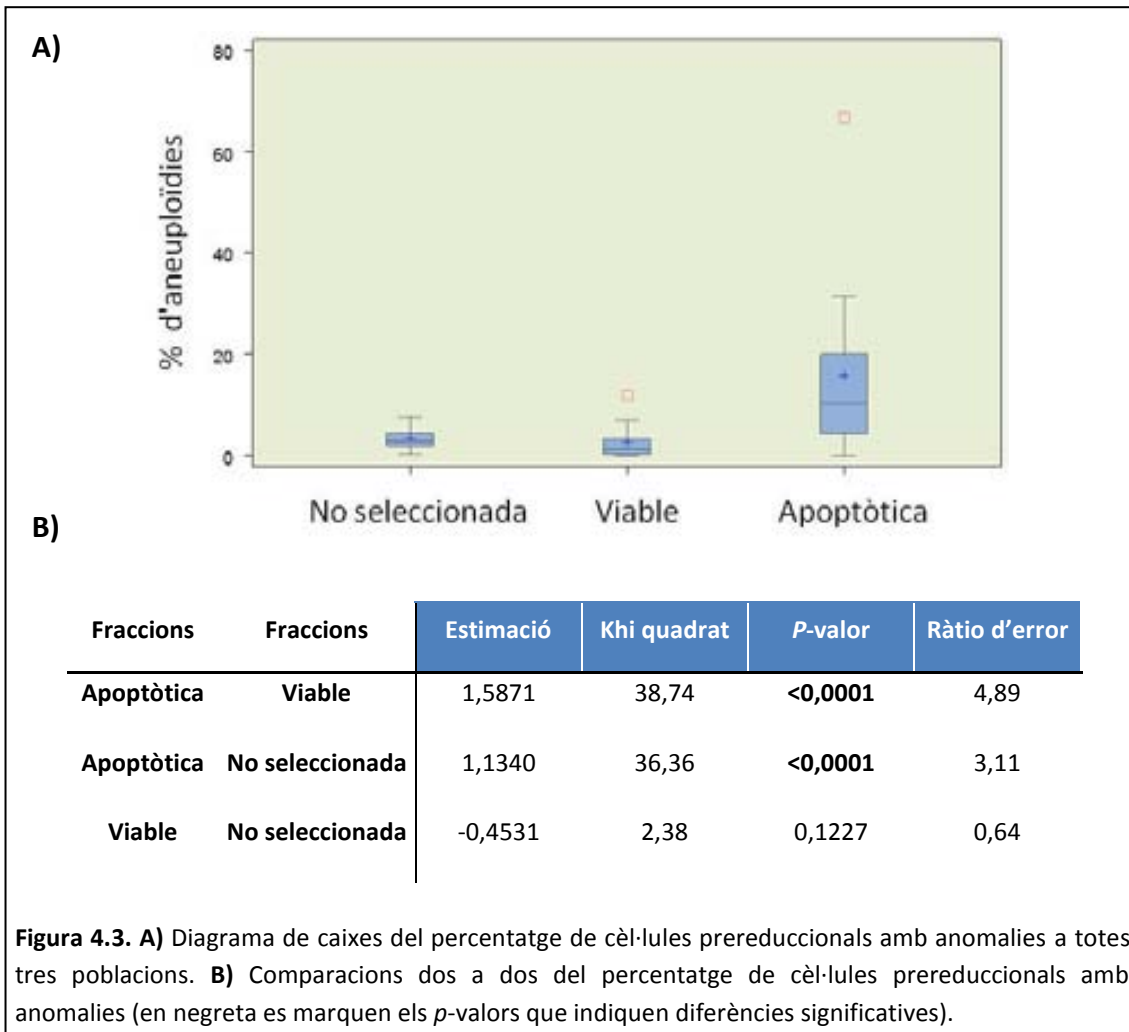
4.3.1 Anàlisi estadística poblacional

4.3.1.1 Estudi bivariant

L'agrupació del percentatge d'anomalies observat en cadascun dels tipus cel·lulars dels catorze pacients en les tres fraccions va aportar una dada poblacional per cada paràmetre que es presenta a la **figura 4.2**.

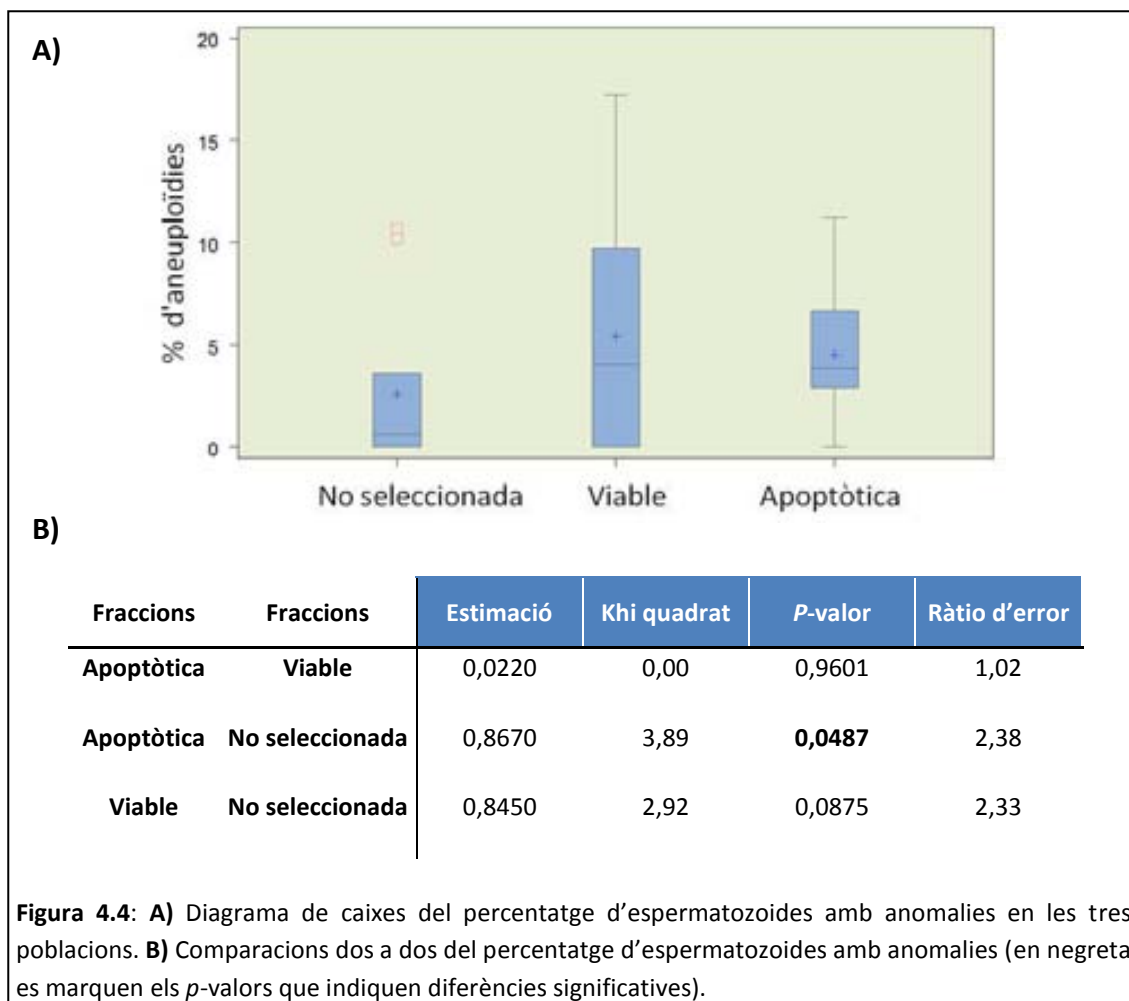


Les cèl·lules germinals prereduccionals, l'anàlisi poblacional va mostrar que els percentatges de cèl·lules amb anomalies eren diferents entre les tres fraccions ($\chi^2 = 14,29$; p -valor = 0,0008). Concretament, la fracció apoptòtica va mostrar un increment significatiu d'anomalies respecte les fraccions no seleccionada i viable (**figura 4.3**).



El percentatge d'anomalies observat a les cèl·lules en profase I no va ser diferent entre les tres fraccions ($\chi^2 = 0,96$, p -valor = 0,6185). Tampoc no es van observar diferències significatives en comparar dos a dos mitjançant la prova de khi quadrat (χ^2) a totes tres fraccions (**annex II**: apartat **2.2.2**). El mateix resultat es va observar a les cèl·lules postreduccionals ($\chi^2 = 0,073$; p -valor = 0,9642) i a les cèl·lules de Sertoli ($\chi^2 = 2,16$; p -valor = 0,3430) (**annex II**: apartats **2.2.3** i **2.2.5**, respectivament).

L'anàlisi estadística bivariant no va mostrar diferències significatives entre els percentatges d'anomalies en els espermatozoides ($\chi^2 = 3,14$; p -valor = 0,2075) de totes tres fraccions analitzades. No obstant això, les comparacions dos a dos es van mostrar que el percentatge d'anomalies en la fracció apoptòtica i el de la fracció no seleccionada eren significativament diferents amb un p -valor de 0,0487 (**figura 4.4**).



4.3.1.2 Estudi longitudinal

Per analitzar com es distribueixen les anomalies al llarg de la línia germinal es va comparar dos a dos els percentatges d'anomalies de cada tipus cel·lular per a cadascuna de totes tres fraccions. Es van observar diferències significatives ($p < 0,005$) entre els mateixos tipus cel·lulars entre la fracció no seleccionada i la viable (**taula 4.8**). Les diferències es van presentar sempre entre les cèl·lules postreduccionals i els altres tres tipus cel·lulars. A més, es va observar que el percentatge de cèl·lules postreduccionals amb anomalies era superior en les tres comparacions.

D'altra banda, a la fracció apoptòtica les diferències significatives no coincidien amb les de les altres dues fraccions. En aquest cas hi havia diferències significatives entre tots els tipus cel·lulars exceptuant-ne les comparacions entre prereduccionals i

postreduccionals, i entre el percentatge d'anomalies en cèl·lules postreduccionals i en espermatozoides (**taula 4.8**).

Taula 4.8. Resultats de l'estudi longitudinal en què es comparen dos a dos els quatre tipus de cèl·lules germinals en cada fracció (en negreta es marquen els *p*-valors, que indiquen diferències significatives).

Fracció	Tipus 1	Tipus 2	Estimació*	Khi quadrat	<i>P</i> -valor
No seleccionada	Prereduccionals	Postreduccionals	-0,7756	6,87	0,0088
No seleccionada	Prereduccionals	Profase	0,6924	1,97	0,1605
No seleccionada	Prereduccionals	Espermatozoides	0,3840	0,68	0,4090
No seleccionada	Postreduccionals	Profase	1,4680	12,72	0,0004
No seleccionada	Postreduccionals	Espermatozoides	1,1596	6,86	0,0088
No seleccionada	Profase	Espermatozoides	-0,3084	0,23	0,6304
Viable	Prereduccionals	Postreduccionals	-1,8208	8,42	0,0037
Viable	Prereduccionals	Profase	1,0022	0,67	0,4147
Viable	Prereduccionals	Espermatozoides	-0,9140	3,15	0,0757
Viable	Postreduccionals	Profase	2,8230	14,74	0,0001
Viable	Postreduccionals	Espermatozoides	0,9068	5,12	0,0237
Viable	Profase	Espermatozoides	-1,9163	3,37	0,0663
Apoptòtica	Prereduccionals	Postreduccionals	0,4788	1,70	0,1929
Apoptòtica	Prereduccionals	Profase	1,6520	13,95	0,0002
Apoptòtica	Prereduccionals	Espermatozoides	0,6511	4,80	0,0285
Apoptòtica	Postreduccionals	Profase	1,1732	10,33	0,0013
Apoptòtica	Postreduccionals	Espermatozoides	0,1723	0,34	0,5579
Apoptòtica	Profase	Espermatozoides	-1,0009	9,15	0,0025

(*Estimació: és la resta del valor estimat la khi quadrat del tipus 1 menys el valor estimat en el tipus 2)

4.3.2 Anàlisi estadística individual

Amb la finalitat d'obtenir l'agrupació dels pacients en clústers es va treballar amb un perfil per pacient que contenia les dades de cada fase cel·lular per a totes tres fraccions. La fracció viable del pacient 560 no es va poder valorar per absència de cèl·lules. Per a l'anàlisi de clústers se'n van excloure els pacients 579, 599 i 602 perquè presentaven un valor atípic o més d'un (interval de confiança del 99 %; **figura 4.5**). A més, es va observar que els seus perfils d'anomalies eren molt variables i molt diferents dels perfils que presentaven els altres pacients.

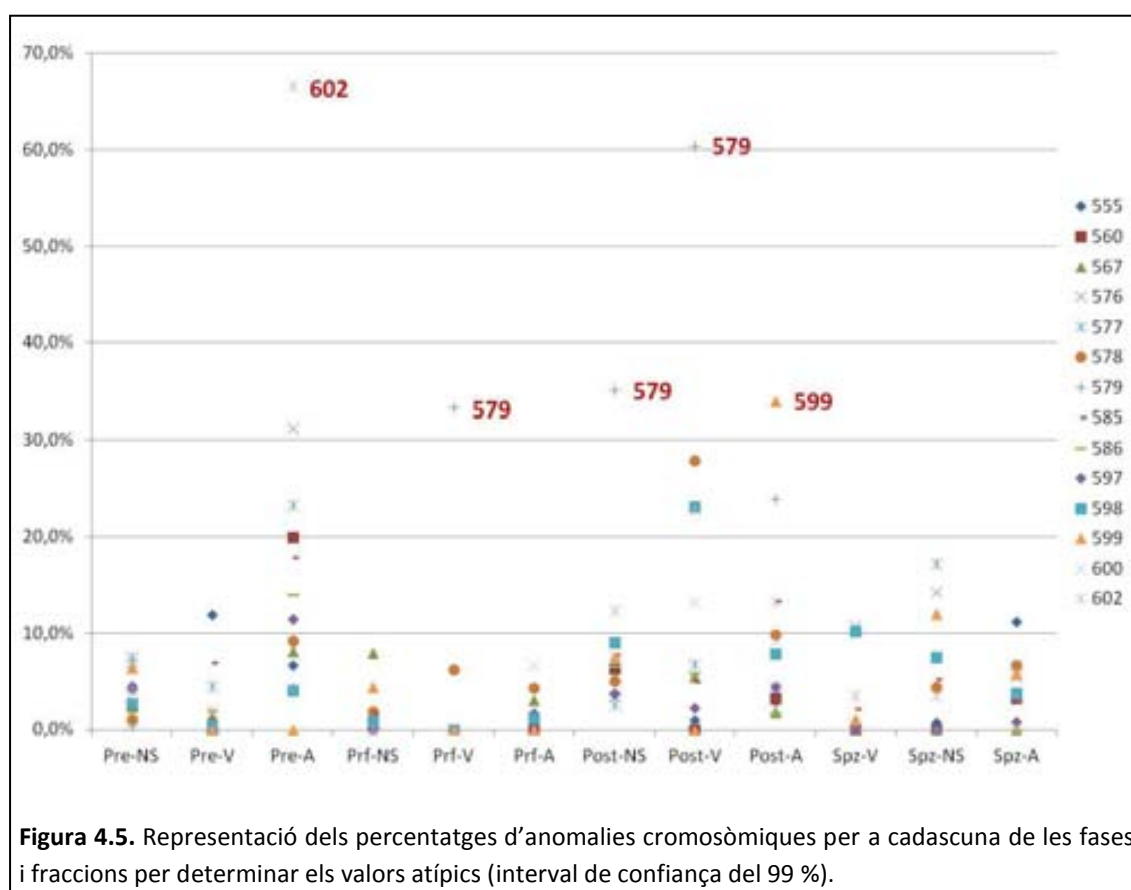
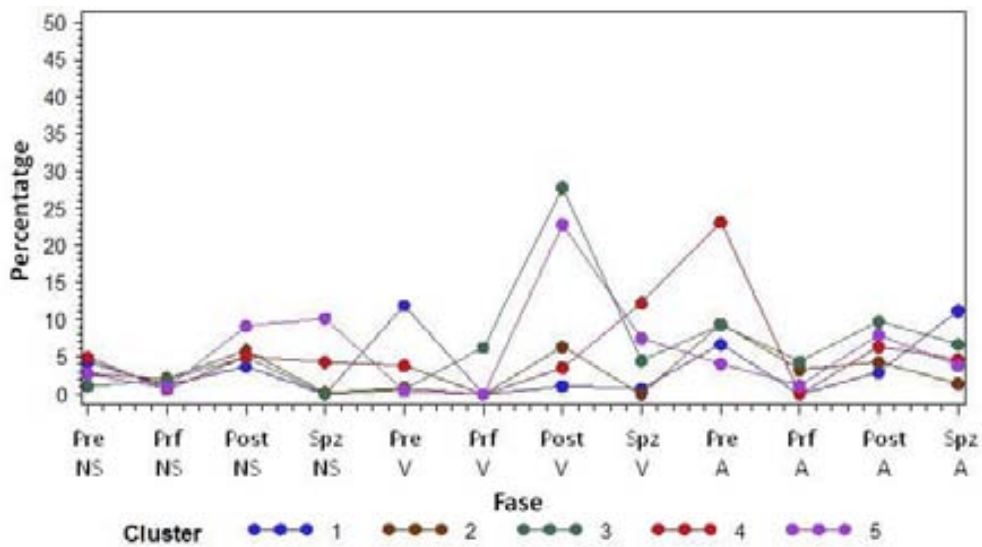


Figura 4.5. Representació dels percentatges d'anomalies cromosòmiques per a cadascuna de les fases i fraccions per determinar els valors atípics (interval de confiança del 99 %).

L'agrupació més eficient per als onze pacients inclosos en l'anàlisi va ser en cinc clústers (**figura 4.6**). Es va observar que els pacients 555, 578 i 598 es distribuïen en un clúster cadascú i presentaven un perfil de percentatges d'anomalies clarament diferenciat (**annex II**).

A)



B)

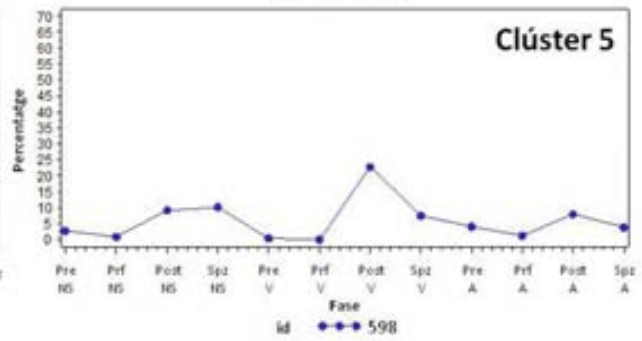
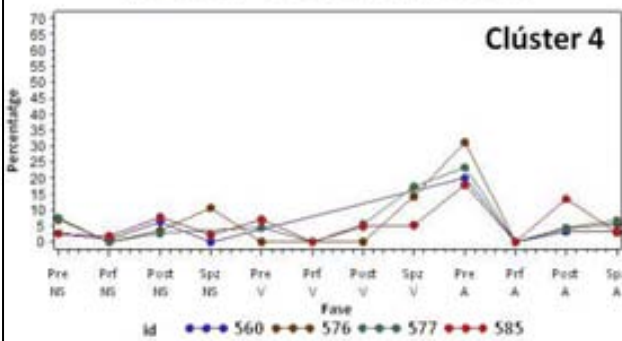
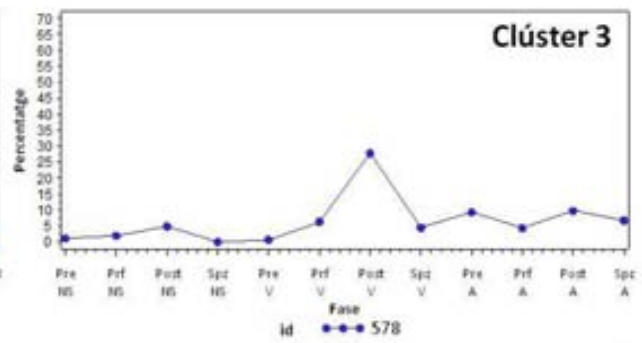
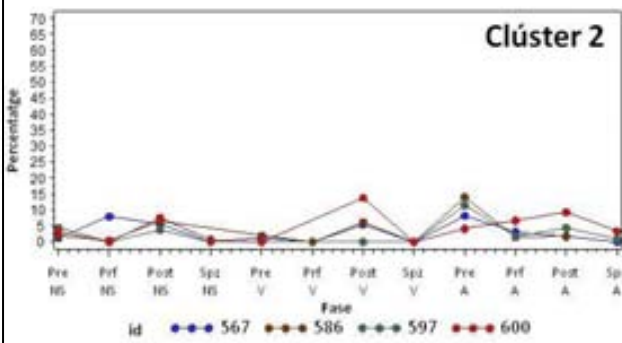
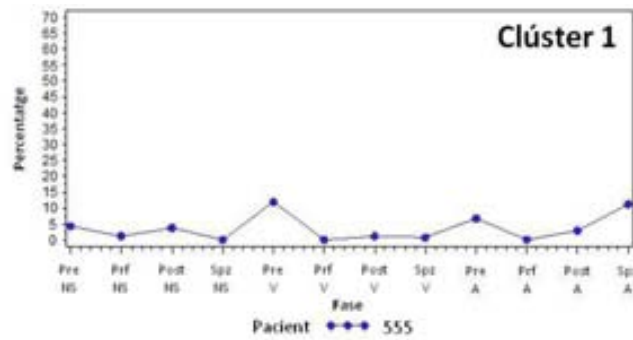


Figura 4.6. Agrupació mitjançant clústers. **A)** Representació de tots cinc clústers formats. **B)** Gràfics dels clústers individuals amb els perfil d'anomalies per als quatre tipus cel·lulars de cada fracció dels pacients inclosos. (Pre: prereduccionals; Prf: profases; Post: postreduccionals; Spz: espermatozoides; NS: fracció no seleccionada; V: fracció viable; A: fracció apoptòtica).

El pacient 555 es caracteritzava per presentar percentatges d'anomalies entre el 15 % – 20 % en cèl·lules prereducionals (fracció apoptòtica i viable), i als espermatozoides (fracció apoptòtica). Els pacients 578 i 598 presentaven percentatges elevats d'anomalies cromosòmiques en cèl·lules postreduccionals (fracció viable), i una distribució uniforme per a la resta de paràmetres. La separació en dos clústers dels pacients 578 i 598 s'explica perquè el pacient 598 presentava aproximadament un 10 % d'anomalies en espermatozoides en la fracció no seleccionada que no es va observar en el pacient 578 (**figura 4.6**).

Els vuit pacients restants van formar dos clústers. El clúster 2 agrupava els pacients 567, 586, 597 i 600 caracteritzats per presentar un perfil uniforme sense percentatges elevats d'anomalies. En canvi, el clúster 4 contenia els pacients 560, 576, 577 i 585. Aquests individus presentaven percentatges elevats d'anomalies en cèl·lules prereducionals de la fracció apoptòtica (**figura 4.6**).

4.3.3 Relació entre l'anàlisi de clústers i les dades clíniques

Hi ha una gran variabilitat entre les dades dels pacients que conformen la població d'estudi. No es va observar cap relació entre el seminograma i l'anàlisi de FISH en espermatozoides dels pacients estudiats i la distribució dels pacients en clústers.

En relació amb l'estudi meiòtic, s'observa una relació amb les agrupacions mitjançant clústers. Els pacients agrupats al clúster 2 (pacients 567, 586, 597 i 600), caracteritzats per una absència d'anomalies cromosòmiques, en tots els casos presenten un estudi meiòtic normal. En canvi, en els pacients que van ser exclosos de l'anàlisi de clústers (pacients 579, 599 i 602), en presentar valors extrems en els percentatges d'aneuploidies i, en general, patrons molt dispars respecte de la resta de pacients, presenten un resultat de l'estudi meiòtic alterat.

D **ISCUSSIONÓ**

5.1 CONSIDERACIONS METODOLÒGIQUES

Per analitzar la relació entre les anomalies cromosòmiques i la inducció de processos apoptòtics en cèl·lules de teixit testicular humà s'ha desenvolupat una metodologia seqüencial. Aquesta metodologia ha permès obtenir una suspensió cel·lular a partir de la disgregació de biòpsies testicular diagnòstiques tot mantenint la integritat i la viabilitat de les cèl·lules. La incorporació d'un marcatge específic de mort cel·lular, compatible amb la integritat de les membranes, va permetre seleccionar les diferents poblacions cel·lulars mitjançant citometria de flux. Finalment, les modificacions sobre el protocol de fixació així com sobre el protocol estàndard de FISH van permetre assolir els objectius plantejats. A continuació es discuteixen aspectes relacionats amb les característiques del mètode aplicat.

5.1.1 Disgregació enzimàtica

La disgregació del teixit testicular s'aplica amb l'objectiu de recuperar espermatozoides aptes per tècniques de reproducció assistida. La majoria dels laboratoris utilitzen protocols de disgregació mecànica, però, s'ha descrit que la utilització d'una disgregació enzimàtica podria millorar la quantitat d'espermatozoides recuperats sense afectar el seu potencial de fecundació (Crabbe *et al.* 1998). A més, en estudis de transplantament de cèl·lules germinals s'ha demostrat que la disgregació enzimàtica del teixit testicular és eficient per a la recuperació dels diferents tipus cel·lulars (espermatogonis, espermatòcits, espermatides i cèl·lules de Sertoli), mantenint la integritat i la viabilitat cel·lulars (Schlatt *et al.* 1999; Ogawa *et al.* 2000; Brook *et al.* 2001). Tenint en compte aquest precedents, en el nostre treball es va optar per aplicar un protocol de disgregació enzimàtica.

Els mètodes de disgregació enzimàtica tissular utilitzen combinacions de diferents enzims que sempre inclouen la col·lagenasa i la hialorunidasa (Durham i Grogan 1984; Watanabe *et al.* 1984; Ogawa *et al.* 1997; Schlatt *et al.* 1999; Ogawa *et al.* 2000; Brook *et al.* 2001; Schlatt *et al.* 2002). Atesa la gran complexitat cel·lular del teixit testicular, es va

optar per utilitzar una col·lagenasa d'ampli espectre d'actuació, com és la col·lagenasa tipus IA. Aquest enzim actua sobre el col·lagen tipus I, que és el component estructural majoritari dels teixits amb suport fibrós i garanteix un alliberament cel·lular màxim. També es va utilitzar hialuronidasa, un enzim que desestructura els glicosaminoglicans, que donen suport mecànic a la matriu extracel·lular. A més, es va incloure DNAsa per eliminar les molècules de DNA alliberades al medi, que incrementen l'aglutinació cel·lular (Navapurkar *et al.* 1998). Altres components com l'EDTA (agent quelant), i la tripsina (proteasa que trenca unions cel·lulars Ca^{2+} dependents) van facilitar la disgregació del teixit. Aquesta combinació ha permès l'alliberament dels diferents tipus de cèl·lules presents en els túbuls seminífers tot preservant-ne la viabilitat.

5.1.2 Marcatge específic d'apoptosi i necrosi

Amb l'objectiu d'identificar les cèl·lules apoptòtiques i diferenciar-les de les cèl·lules necròtiques i viables es va considerar la utilització de diferents tècniques. Es va optar pel marcatge específic amb annexina V (AV-FITC) / iodur de propidi (IP) ja que possibilita la valoració prèvia de les poblacions al microscopi de fluorescència i la seva posterior selecció mitjançant citometria de flux. A més, es compatible amb una valoració final de la puresa i la constitució cromosòmica de les cèl·lules seleccionades, i és una tècnica sensible i metodològicament poc complexa (Vermes *et al.* 1995).

5.1.3 Selecció mitjançant citometria de flux

Per fer una bona selecció de les poblacions cel·lulars cal tenir en compte la diversitat de morfologies i complexitats de les cèl·lules analitzades. La morfologia cel·lular es determina per la mida de la dispersió frontal dels fotons que incideixen sobre les cèl·lules (una obertura més gran es relaciona amb una mida cel·lular superior) (**figura 5.1**). La complexitat cel·lular és un reflex de la quantitat d'orgànuls, la condensació de la cromatina i la densitat del citosol. Es detecta per la lectura que fan els receptors laterals dels fotons del làser dispersats per les estructures cel·lulars (**figura 5.1**). A més, també

cal considerar els requeriments específics de la tècnica per a la selecció de les poblacions, com són el manteniment de la integritat cel·lular i del marcatge específic de membrana.

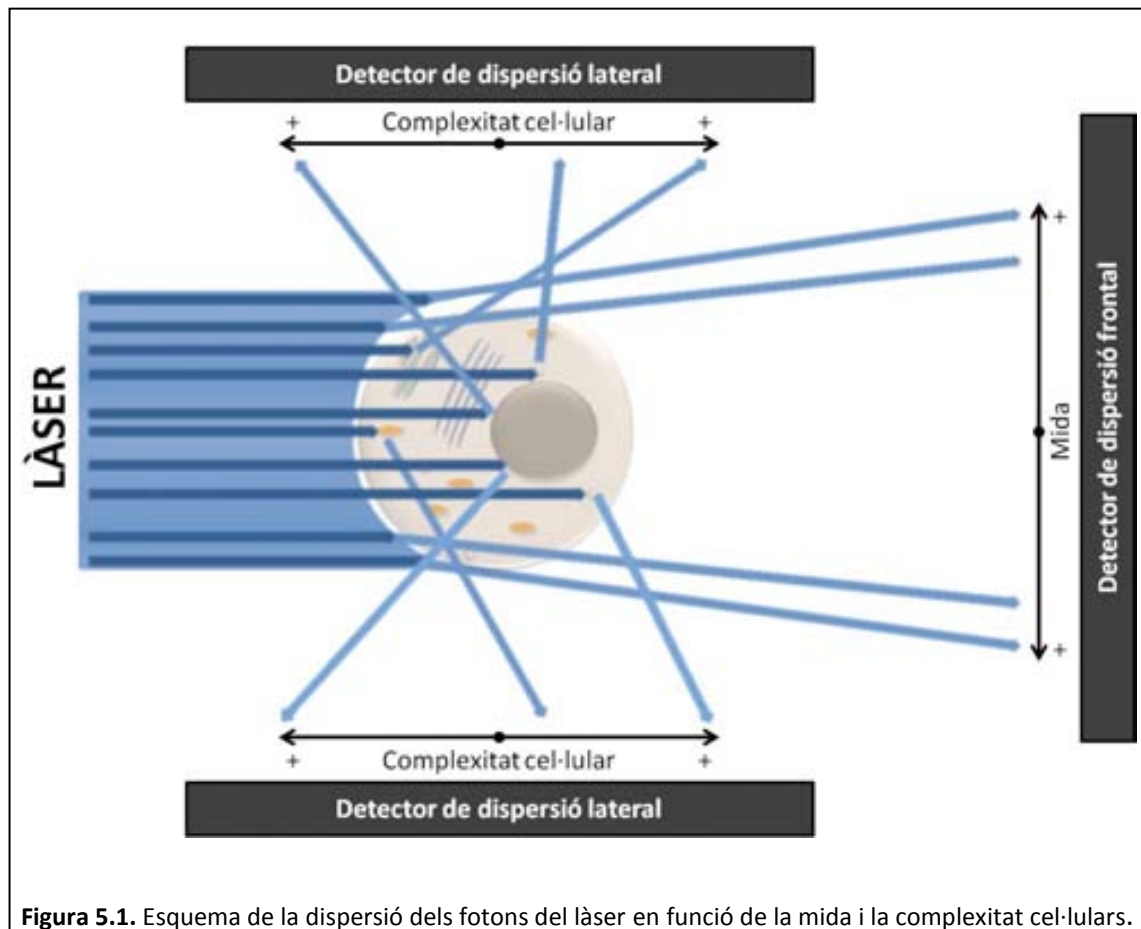


Figura 5.1. Esquema de la dispersió dels fotons del làser en funció de la mida i la complexitat cel·lulars.

El citòmetre de flux treballa amb valors d'intensitat de fluorescència a escala logarítmica per determinar la intensitat del marcatge. Abans de la selecció s'han d'establir els llindars per fer la selecció a partir dels controls de marcatge, del coneixement dels percentatges de cada població avaluats prèviament al microscopi de fluorescència i dels perfils de fluorescència que presenta la mostra d'estudi durant la valoració inicial al citòmetre.

Per tal que els diferents tipus de cèl·lules d'estudi estiguessin representats en les fraccions seleccionades, es van haver d'ajustar les finestres de la dispersió lateral

(relativa a la complexitat cel·lular) respecte de la dispersió frontal (relativa a la mida cel·lular) (**figura 3.2,A R1**). Aquest ajustaments van permetre descartar fragments i agregats cel·lulars. D'altra banda, s'ha de tenir en compte que, tot i que la unió annexina V-fosfatidilserina és una unió de gran afinitat, la pressió estàndard de la coberta de 50 PSI (*Pound per Square Inch*) provocava l'afebliment de la unió. Així doncs, va caldre disminuir la pressió fins a 10 PSI per preservar el marcatge durant la selecció. Aquest canvi de pressió va fer variar la freqüència de trencament de gota i, per tant, vam haver d'utilitzar un *tip* més gran (70 μm en lloc de 30 μm) per assegurar la presència d'una sola cèl·lula per gota. L'optimització de les variables esmentades ha permès seleccionar correctament les poblacions apoptòtica i viable, i es van obtenir fraccions amb pureses superiors al 70 %.

5.1.4 Fixació cel·lular

Les fraccions seleccionades contenen un nombre reduït de cèl·lules. Per aquest motiu es va treballar en el desenvolupament d'un protocol de fixació que minimitzés la pèrdua cel·lular oferint unes condicions òptimes per fer l'anàlisi citogenètica mitjançant FISH. Els mètodes utilitzats clàssicament per fer extensions cel·lulars es basen en la fixació amb Carnoy i donen com a resultat extensions amb nuclis ben aïllats i sense restes citoplasmàtiques. No obstant això, impliquen una pèrdua cel·lular significativa a causa dels diversos rentats, centrifugacions i recuperacions del material, i a la realització de les extensions citogenètiques mitjançant el mètode d'assecamment a l'aire (> 90 % de pèrdua, dades del nostre laboratori). Amb la finalitat de reduir la pèrdua cel·lular es va optar per desenvolupar un protocol per estendre les suspensions cel·lulars seleccionades amb una citocentrífuga i seguidament fixar les cèl·lules amb paraformaldehid. Aquesta metodologia permet fixar de manera eficient poblacions cel·lulars de concentracions molt baixes tot minimitzant la pèrdua cel·lular (10 %, dades del nostre laboratori). La utilització de la citocentrífuga també va permetre estendre un nombre constant de cèl·lules ($5 \cdot 10^4$ cèl·lules) sobre una superfície de 28 mm^2 . Per tant, podem obtenir preparacions similars, en termes de concentració i distribució cel·lular, indistintament del nombre de cèl·lules presents a la població de partida.

5.1.5 Hibridació *in situ* fluorescent (FISH)

La presència d'extensions cel·lulars amb nuclis aïllats, l'absència de restes citoplasmàtiques i l'absència de residus de fixador són tres característiques que determinen la qualitat d'una extensió cel·lular per a l'aplicació de protocols d'anàlisi citogenètica. Aquestes característiques asseguren una accessibilitat correcta de les sondes al DNA diana i donen com a resultat senyals d'hibridació òptims. Els mètodes de fixació basats en la utilització de paraformaldehid van dirigits a la preservació de les estructures cel·lulars, que òbviament inclouen la membrana plasmàtica i el citoplasma. La presència d'aquestes estructures cel·lulars condicionen l'accés de les sondes al DNA. Per superar aquesta limitació es van aplicar tres tractaments previs al protocol de FISH per facilitar l'accessibilitat al nucli i eliminar les restes citoplasmàtiques. És important remarcar que en absència d'aquest tractaments les taxes d'hibridació no assolien els valors estàndards del nostre laboratori. El protocol de FISH desenvolupat presenta una elevada eficiència d'hibridació i una òptima qualitat de les hibridacions que validen la seva utilització per a la valoració de cèl·lules testiculars fixades mitjançant el mètode utilitzat en aquest treball.

En resum, els resultats obtinguts demostren que la metodologia desenvolupada és eficient per avaluar l'associació de processos apoptòtics i anomalies cromosòmiques en cèl·lules testiculars. Això no obstant, cal destacar que per assolir aquest propòsit és necessari l'aplicació seqüencial de cinc protocols sobre una mateixa mostra que, en general, impliquen procediments llargs i laboriosos. Òbviament, aquest mètode requereix el domini de diferents protocols, com són la disgregació tissular, el marcatge específic de processos de mort cel·lular (apoptosi i necrosi) i l'extensió i fixació de suspensions cel·lulars per l'anàlisi citogenètica. Tanmateix, cal conèixer el funcionament del citòmetre de flux per detectar i seleccionar les poblacions desitjades. A més, s'han d'aplicar criteris estrictes de valoració microscòpica que incloguin les variables relatives a la morfologia i a la citogenètica cel·lulars.

5.2 ANÀLISI DE LA POBLACIÓ D'ESTUDI

L'anàlisi de l'associació entre la inducció de processos apoptòtics i la presència d'anomalies cromosòmiques en les cèl·lules germinals ha posat de manifest una selecció de les cèl·lules amb anomalies cromosòmiques cap a les fraccions apoptòtiques en les cèl·lules germinals prereduccionals i en espermatozoides. En els altres tres tipus cel·lulars (cèl·lules de Sertoli, cèl·lules germinals postreduccionals i cèl·lules en profase I) no s'ha observat aquesta associació.

5.2.1 Cèl·lules germinals prereduccionals

Les fraccions corresponents a les cèl·lules prereduccionals contenen espermatogonis i espermatòcits primaris en preleptotè. L'anàlisi citogenètica d'aquestes cèl·lules suggereix que durant la proliferació mitòtica s'estan generant anomalies cromosòmiques que s'acumulen a la fracció apoptòtica, la qual cosa posa de manifest que les cèl·lules amb aneuploidies són eficientment eliminades via apoptosi.

En relació amb els espermatogonis, els mecanismes de control del cicle cel·lular no estan dissenyats per identificar i eliminar les aneuploidies. Els punts de control del dany detecten trencaments de cadena doble, mentre que el punt de control del SAC detecta la correcta orientació dels cromosomes a la placa metafàsica. No obstant, estudis recents en llevats han proposat que la presència d'aneuploidies incrementen el metabolisme cel·lular (Williams *et al.* 2008; Li *et al.* 2010) tot provocant l'activació de processos apoptòtics via ATM i P53 (Fang i Zhang 2011; revisat per Gordon *et al.* 2012). Aquest resultat mostra una relació preferent amb el guany de cromosomes, en què l'alteració de la proliferació seria deguda a la sobrepressió gènica (Torres *et al.* 2007; Williams *et al.* 2008). En aquest sentit, s'ha observat que el 80–90 % dels gens presents als cromosomes extres es transcriuen, però hi ha errors en la seva traducció i plegament que desencadena en la degradació dels transcrits (Torres *et al.* 2007). L'excés de transcripció i eliminació s'ha relacionat amb un increment del metabolisme que podria alterar l'expressió de proteïnes relacionades amb la síntesi i la reparació del DNA

(Hernando 2008; Fang i Zhang 2011). Com a conseqüència es provocarien defectes de proliferació i l'eliminació via apoptosi de les cèl·lules aneuploides (revisat per Gordon *et al.* 2012). Tanmateix, no tots els guanys de cromosomes causen els mateixos efectes sobre la proliferació (Weaver i Cleveland 2008) i sovint són necessaris defectes en la cascada supressora de tumors de P53 per fer que una aneuploïdia sigui tolerada (Matijasevic *et al.* 2008; Thompson i Compton 2010).

D'altra banda, les cèl·lules prereduccionals observades podrien correspondre a espermatòcits primaris en estadi de preleptotè que s'eliminen via apoptosi abans d'iniciar la primera divisió meiótica. Està descrit que l'inici prematur de la meiosi en etapes prepuberals està lligat a una onada d'apoptosi (Rodriguez *et al.* 1997; Shaha *et al.* 2010). Aquesta situació s'explica per una manca de suport hormonal i un desajustament de la ràtio entre cèl·lules de Sertoli i cèl·lules germinals. En models animals s'ha observat que l'inici de la meiosi està mediat per l'àcid retinoic (AR), que provoca la transcripció del gen *Stra8*. En la línia germinal masculina l'entrada en meiosi també està controlada per l'inhibidor CYP26B1 expressat per les cèl·lules de Sertoli que bloqueja l'activació de STRA8 (Handel i Schimenti 2010). L'AR se sintetitza a partir de la vitamina A i els seus receptors modulen l'expressió de gens, entre els quals hi ha els *HOX* i *Stra8*. Errors en el receptor RAR (*Retinoic Acid Receptor*) desencadenarien la mort cel·lular via apoptosi ja que no sols és el responsable de la decisió d'iniciar la meiosi en els espermatòcits primaris, sinó que també està implicat en la supervivència i el desenvolupament dels espermatòcits en estadis inicials de la profase I (revisat per Doyle *et al.* 2007). A més, s'ha observat que l'expressió de *stra8* és suficient per induir la síntesi d'intermediaris de la meiosi com la proteïna SYCP3 (*Synaptonemal Complex Protein 3*) o la recombinasa específica de meiosi DMC1 (revisat per Hogarth i Griswold 2010). Així doncs, en el cas que l'aneuploïdia impliqués els cromosomes que contenen gens necessaris per l'entrada en meiosi i que produís una alteració dels nivells d'expressió de RAR podria desencadenar la mort cel·lular via apoptosi.

5.2.2 Cèl·lules de Sertoli

Els nostres estudis no mostren associació dels processos apoptòtics amb les aneuploidies en les cèl·lules de Sertoli. S'ha descrit que l'absència de marcadors d'apoptosi en cèl·lules de Sertoli (Lin *et al.* 1997a; Tay *et al.* 2007; Hassan *et al.* 2009; Stiblar-Martincic 2009) podria ser degut a mecanismes que les protegeixen contra la mort cel·lular programada (Johnson *et al.* 2008). Aquest fet s'explica perquè les cèl·lules de Sertoli són cèl·lules quiescents i estan en un estadi G0 irreversible. En aquesta situació la maquinària i els complexos ciclins/Cdk estan inhibits, desestructurats o bé no hi són presents. Així doncs, l'absència dels mecanismes de control impedeixen el reconeixement d'anomalies cromosòmiques.

És important remarcar que les cèl·lules de Sertoli són eliminades via apoptosi en resposta a senyals hormonals (Tesarik *et al.* 2002). S'ha observat que les alteracions dels receptors d'estrògens (Royer *et al.* 2012) així com dels nivells hormonals (Aksglaede *et al.* 2006) desencadenen en la mort cel·lular programada de les cèl·lules de Sertoli (Tesarik *et al.* 2002). Un exemple que demostra aquesta relació el veiem en els individus amb cariotip 47,XXY. En model murí s'ha observat que les cèl·lules de Sertoli amb el complement genètic XXY presenten nivells inferiors d'expressió del receptor d'andrògens (AR, *Androgen Receptor*) (Lue *et al.* 2005) que explicaria l'hipogonadisme hipergonadotròfic relacionat amb l'activació d'apoptosi que presenten els individus 47,XXY (Aksglaede *et al.* 2006).

5.2.3 Cèl·lules en profase I

Durant la profase I la presència d'aneuploidies afavoreix l'exposició de regions asinàptiques i, per tant, l'activació del MSUC (*Meiotic Silencing Unsinapsed Chromosome*) que, a través del reconeixement d'aquestes regions, provoca el seu silenciament i l'aturada de les cèl·lules (revisat per Burgoyne *et al.* 2009). En cas que no es puguin reparar, les anomalies de sinapsi i recombinació desencadenaran l'eliminació de les cèl·lules afectades via apoptosi (Hamer *et al.* 2008; Burgoyne *et al.* 2009). No

obstant això, el nostre estudi no mostra cap associació de les anomalies cromosòmiques amb la inducció de processos apoptòtics durant la profase I.

Aquesta manca d'associació es pot explicar per diferents factors. El primer està relacionat amb el baix nombre de profases I amb anomalies (32 profases amb anomalies de 2.290 profases totals) de les quals tan sols 10 eren paquitens. Com hem descrit a l'apartat **5.2.1**, les cèl·lules prereducionals amb aneuploïdies són eliminades eficientment pels punts de control mitòtics. En aquest sentit, considerem que la nostra població de paquitens amb aneuploïdies és insuficient per determinar l'associació entre la presència d'aneuploïdies i l'activació de processos apoptòtics.

En segon lloc, les cèl·lules aneuploides presenten mecanismes per evitar l'exposició de regions asinàptiques (formació de trivalents o sinapsi heteròloga) i no activar el punt de control de sinapsi i recombinació. Aquesta habilitat per presentar una aparença sinàptica adequada podria ser la responsable que els paquitens amb aneuploïdies escapessin de l'eliminació, més que per una reducció o alteració de la restrictivitat dels punts de control (Morelli i Cohen 2005). S'ha observat en pacients 47,XYY la formació d'un trivalent entre els cromosomes sexuals que permet superar el punt de control de sinapsi i recombinació (Blanco *et al.* 2001; Burgoyne *et al.* 2009). Una situació similar s'observa en oòcits primaris de dones amb trisomia 21 on els tres cromosomes s'observen formant un trivalent sense exposar regions asinàptiques (Speed 1984; Robles *et al.* 2007; Hulten *et al.* 2008). En el cas de monosomies, s'ha observat que els oòcits de pacients amb síndrome de Turner (45,X) presenten fenòmens d'autosinapsi al cromosoma X per evitar l'exposició de regions asinàptiques i el consegüent silenciament per part de MSUC (Turner *et al.* 2005; Burgoyne *et al.* 2009).

Finalment, cal esmentar que l'eliminació de les cèl·lules per part del punt de control de sinapsi i recombinació respon a l'acumulació de cèl·lules aturades. Així doncs, la falta d'associació entre aneuploïdies i processos apoptòtics podria explicar-se pel baix nombre de paquitens amb anomalies presents en la població d'estudi que no assoleixen el llindar cel·lular que desencadenarà l'eliminació via apoptosi (Hamer *et al.* 2008). Aquesta eliminació estaria determinada per un senyal paracrí provinent de les cèl·lules

de Sertoli que produiria la inducció de processos apoptòtics independents de P53 (Hamer *et al.* 2008).

5.2.4 Cèl·lules germinals postreduccionals

Les fraccions corresponents a les cèl·lules postreduccionals contenen des d'espermatòcits secundaris fins a espermatides. Els nostres resultats mostren percentatges elevats d'anomalies no vinculats amb processos apoptòtics.

Tenint en compte que la nostra població d'estudi no presenta espermatòcits primaris amb aneuploidies (apartat 5.2.3) els percentatges elevats de cèl·lules germinals postreduccionals aneuploides observades han de provenir d'errades de distribució dels cromosomes durant la primera divisió meiótica. Actualment no hi ha cap estudi que mostri la via molecular d'eliminació del punt de control del SAC meiótic associada a una cascada de senyalització de mort cel·lular programada. Això no obstant, Eaker *et al.* (2001) observen en ratolins amb translocacions robertsonianes una associació entre errors d'alineació a la placa metafàsica del trivalent i fenòmens d'apoptosi. Tanmateix, troben una eficiència limitada del punt de control en l'eliminació de les cèl·lules amb problemes d'alineació deduïda a través d'increments d'anomalies cromosòmiques en els espermatozoides. Aquests resultats, igual que els nostres i els d'altres autors (Ferguson *et al.* 2007; Sun *et al.* 2008) posen de manifest que el punt de control del SAC, tot i detectar cèl·lules amb problemes d'alineació cromosòmica, presenta una eficiència d'eliminació limitada i, per tant, es tradueix en increments d'anomalies cromosòmiques en cèl·lules postreduccionals.

L'absència d'associació d'anomalies cromosòmiques amb processos d'apoptosi podria estar relacionada amb altres vies d'eliminació de les cèl·lules amb anomalies o bé amb una inducció d'apoptosi que no impliqués l'externalització de la fosfatidilserina. Tot i que l'apoptosi és la via d'eliminació principal de les cèl·lules germinals (Sinha Hikim *et al.* 2003) no totes les cèl·lules germinals en degeneració presenten la morfologia clàssica d'apoptosi (Sofikitis *et al.* 2008). A més, en pacients infèrtils s'ha observat de manera

freqüent l'alliberament prematur de les espermàtides o la fagocitosi per part de les cèl·lules de Sertoli per eliminar les cèl·lules (Print i Loveland 2000; Francavilla *et al.* 2002; Sofikitis *et al.* 2008; Yan 2009). Una altra possible via d'eliminació de les cèl·lules amb anomalies és la formació de cèl·lules gegants (Sofikitis *et al.* 2008; Yan 2009). Aquesta via d'eliminació no s'ha pogut avaluar en el nostre estudi ja que, com hem descrit anteriorment, una cèl·lula multinucleada o gegant, tot i presentar externalització de la fosfatidilserina, mostraria valors extrems de dispersió lateral i frontal que no es podran diferenciar d'agregats cel·lulars durant la selecció mitjançant citometria de flux.

5.2.5 Espermatozoides

Els espermatozoides de la nostra població d'estudi presenten dos resultats destacables. En primer lloc s'observa que entre el 53 % i el 68 % de les cèl·lules postreduccionals amb aneuploïdies no arriben a espermatozoides i són eliminades per vies no apoptòtiques. No obstant això, una fracció de cèl·lules amb aneuploïdies escapen a aquesta eliminació i progressen al llarg de l'espermioogènesi.

En segon lloc s'observa una associació entre la presència d'anomalies cromosòmiques i la inducció de processos apoptòtics. Aquestes dades concorden amb l'estudi de Muriel *et al.* (2007) que mostra que un percentatge significatiu d'espermatozoides aneuploides són apoptòtics. Altres estudis també observen una correlació positiva entre la presència d'apoptòtics i aneuploïdies amb una valoració independent del dos processos (Carrell *et al.* 2003; Schmid *et al.* 2003; Liu *et al.* 2004; Perrin *et al.* 2011). A partir d'aquest estudis s'ha proposat que les aneuploïdies serien les que induirien els processos apoptòtics. Ja sigui, com a part d'un mecanisme dissenyat per inactivar genèticament els espermatozoides amb una constitució cromosòmica anòmala (Muriel *et al.* 2007). O bé, perquè la presència d'aneuploïdies estigués alterant la transcripció dels gens clau o alterant la dosi gènica que s'ha descrit que desencadenaria l'activació del punt de control d'expressió (Yan 2009).

5.3 RELACIÓ ENTRE L'ANÀLISI DE CLÚSTERS I LES DADES CLÍNiques

La població analitzada presenta una gran heterogeneïtat individual respecte dels perfils d'anomalies cromosòmiques en les cèl·lules germinals que es manifesta amb la formació d'un elevat nombre de clústers. Aquesta diversitat és un reflex de l'ampli ventall d'errors que poden originar les aneuploïdies tant durant la sinapsi (Vendrell *et al.* 1999; Egozcue *et al.* 2000b; Guichaoua *et al.* 2005; Sun *et al.* 2007), la recombinació (Gonsalves *et al.* 2004; Codina-Pascual *et al.* 2005; Ferguson *et al.* 2007; Sun *et al.* 2007) o la segregació cromosòmica (Uroz *et al.* 2008; Sun i Kim 2012). A més, aquest errors sovint són produïts per mutacions en gens clau meiòtics o bé per polimorfismes que incrementen la gran diversitat de causes d'una infertilitat idiopàtica (revisat per Matzuk i Lamb 2008).

En la població analitzada no es van trobar grups de pacients amb comportaments similars quant al percentatge d'aneuploïdies i el seminograma i/o l'anàlisi de FISH en espermatozoides. En canvi, es va observar una relació entre dos de les agrupacions formades i l'estudi meiòtic. En el primer grup, que engloba els pacients caracteritzats per no presentar percentatges elevats d'aneuploïdies, s'observa un estudi meiòtic normal. En el cas del segon grup, corresponent als pacients amb una alteració important dels perfils d'anomalies cromosòmiques, els tres pacients presentaven un estudi meiòtic alterat. Aquests resultats estarien reafirmant que els errors produïts durant la segregació mitòtica (revisat per Gordon *et al.* 2012) i meiòtica (revisat per Tempest 2011; revisat per Templado *et al.* 2011) causarien l'aparició d'aneuploïdies en la línia germinal de pacients infèrtils. Tot i això, la presència d'un estudi meiòtic normal no és exclusiu del clúster sense percentatges elevats d'aneuploïdies. Així doncs, en la població analitzada, l'estudi meiòtic, igual que el seminograma i l'anàlisi de FISH en espermatozoides, no és un factor indicatiu de l'agrupació de pacients realitzada, fet que entraria dins del que s'esperava, atesa la gran diversitat de processos implicats en l'origen de les aneuploïdies i la infertilitat.

C ONCLUSIONS

1. La metodologia desenvolupada permet la detecció, l'aïllament i l'anàlisi citogenètica de cèl·lules apoptòtiques en les diferents fases de l'espermatogènesi i en les cèl·lules de Sertoli de biòpsies testiculars diagnòstiques.
2. Les aneuploïdies observades en cèl·lules prereducionals s'originen per errors de segregació durant la proliferació mitòtica i són eficientment eliminades via apoptosi.
3. La població d'espermatòcits primaris en profase I és majoritàriament euploide i no s'observa una relació entre la presència d'aneuploïdies i els processos apoptòtics.
4. No s'ha trobat correlació entre la presència d'aneuploïdies i d'apoptosi a les cèl·lules de Sertoli.
5. El punt de control del SAC no és eficient, fet que es reflecteix en un increment d'aneuploïdies en cèl·lules postreduccionals. No s'ha observat correlació entre la presència d'aneuploïdies i processos apoptòtics en cèl·lules postreduccionals. Aquestes cèl·lules són eliminades per vies independents de processos apoptòtics.
6. S'ha observat una relació entre els processos apoptòtics i la presència d'anomalies cromosòmiques en els espermatozoides.

7. La població analitzada és molt heterogènia pel que fa als percentatges d'anomalies cromosòmiques i a les dades clíniques. La qual cosa no ha permès determinar característiques clíniques comunes en les agrupacions realitzades en funció dels percentatges d'anomalies cromosòmiques en els diferents etapes de l'espermatogènesi. Aquestes dades reflecteixen la diversitat citogenètica i fenotípica de les poblacions infèrtils.

B **IBLIOGRAFIA**

A

- Aitken RJ and Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl* 13:36-42 (2011).
- Aitken RJ, Findlay JK, Hutt KJ and Kerr JB. Apoptosis in the germ line. *Reproduction* 141:139-150 (2011).
- Aks glaede L, Wikstrom AM, Rajpert-De Meyts E, Dunkel L, Skakkebaek NE and Juul A. Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Update* 12:39-48 (2006).
- Amann RP. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl* 29:469-487 (2008).

B

- Baker DJ, Dawlaty MM, Galardy P and van Deursen JM. Mitotic regulation of the anaphase-promoting complex. *Cell Mol Life Sci* 64:589-600 (2007).
- Blanco J, Egozcue J and Vidal F. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 11:722-726 (1996).
- Blanco J, Egozcue J and Vidal F. Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47,XXY, mosaic 46,XY/47,XXY and 47,XYY) assessed by fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 16:887-892 (2001).
- Braham S, Mehdi M, Elghezal H and Saad A. Detection of DNA fragmentation and meiotic segregation in human with isolated teratozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 28:41-48 (2011).
- Braun RE. Every sperm is sacred--or is it? *Nat Genet* 18:202-204 (1998).
- Brook PF, Radford JA, Shalet SM, Joyce AD and Gosden RG. Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertil Steril* 75:269-274 (2001).
- Burgoyne PS, Mahadevaiah SK and Turner JM. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat Rev Genet* 10:207-216 (2009).

C

- Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, Campbell B, Branch DW and Hatasaka HH. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 101:1229-1235 (2003).
- Chen Z, Hauser R, Trbovich AM, Shifren JL, Dorer DJ, Godfrey-Bailey L and Singh NP. The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. *J Androl* 27:112-120 (2006).
- Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Campillo M, Garcia F, Egozcue S, Abad C, Egozcue J and Benet J. Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum Reprod* 20:2133-2139 (2005).
- Cohen PE, Pollack SE and Pollard JW. Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr Rev* 27:398-426 (2006).
- Compton DA. Mechanisms of aneuploidy. *Curr Opin Cell Biol* 23:109-113 (2011).
- Crabbe E, Verheyen G, Silber S, Tournaye H, Van de Velde H, Goossens A and Van Steirteghem A. Enzymatic digestion of testicular tissue may rescue the intracytoplasmic sperm injection cycle in some patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 13:2791-2796 (1998).

D

- Ding DQ, Haraguchi T and Hiraoka Y. From meiosis to postmeiotic events: alignment and recognition of homologous chromosomes in meiosis. *FEBS J* 277:565-570 (2010).
- Doyle TJ, Braun KW, McLean DJ, Wright RW, Griswold MD and Kim KH. Potential functions of retinoic acid receptor A in Sertoli cells and germ cells during spermatogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1120:114-130 (2007).
- Durham LA, 3rd and Grogan WM. Characterization of multiple forms of cholesteryl ester hydrolase in the rat testis. *J Biol Chem* 259:7433-7438 (1984).

E

- Eaker S, Pyle A, Cobb J and Handel MA. Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci* 114:2953-2965 (2001).
- Egozcue J, Sarrate Z, Codina-Pascual M, Egozcue S, Oliver-Bonet M, Blanco J, Navarro J, Benet J and Vidal F. Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet Genome Res* 111:337-342 (2005).
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F and Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 6:93-105 (2000a).
- Egozcue S, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN and Egozcue J. Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 17:307-309 (2000b).

F

- Fang X and Zhang P. Aneuploidy and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol* 22:595-601 (2011).
- Ferguson KA, Wong EC, Chow V, Nigro M and Ma S. Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum Mol Genet* 16:2870-2879 (2007).
- Francavilla S, D'Abrizio P, Cordeschi G, Pelliccione F, Necozone S, Ulisse S, Properzi G and Francavilla F. Fas expression correlates with human germ cell degeneration in meiotic and post-meiotic arrest of spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 8:213-220 (2002).
- Frankfurt OS, Robb JA, Sugarbaker EV and Villa L. Monoclonal antibody to single-stranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis. *Exp Cell Res* 226:387-397 (1996).

G

- Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501 (1992).

Gonsalves J, Sun F, Schlegel PN, Turek PJ, Hopps CV, Greene C, Martin RH and Pera RA. Defective recombination in infertile men. *Hum Mol Genet* 13:2875-2883 (2004).

Gordon DJ, Resio B and Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet* 13:189-203 (2012).

Guichaoua MR, Perrin J, Metzler-Guillemain C, Saias-Magnan J, Giorgi R and Grillo JM. Meiotic anomalies in infertile men with severe spermatogenic defects. *Hum Reprod* 20:1897-1902 (2005).

H

Hamer G, Novak I, Kouznetsova A and Hoog C. Disruption of pairing and synapsis of chromosomes causes stage-specific apoptosis of male meiotic cells. *Theriogenology* 69:333-339 (2008).

Handel MA and Schimenti JC. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet* 11:124-136 (2010).

Hassan A, el-Nashar EM and Mostafa T. Programmed cell death in varicocele-bearing testes. *Andrologia* 41:39-45 (2009).

Hassold T and Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2:280-291 (2001).

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776 (2000).

Hernando E. Cancer. Aneuploidy advantages? *Science* 322:692-693 (2008).

Hogarth CA and Griswold MD. The key role of vitamin A in spermatogenesis. *J Clin Invest* 120:956-962 (2010).

Holstein AF, Schulze W and Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 1:107 (2003).

Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S and Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* 139:143-156 (2007).

Hulten MA, Patel SD, Tankimanova M, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM and Iwarsson E. On the origin of trisomy 21 Down syndrome. *Mol Cytogenet* 1:21 (2008).

Huynh T, Mollard R and Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod Update* 8:183-198 (2002).

I

Ishiguro K and Watanabe Y. Chromosome cohesion in mitosis and meiosis. *J Cell Sci* 120:367-369 (2007).

J

Jackson SP and Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461:1071-1078 (2009).

Jeganathan KB and van Deursen JM. Differential mitotic checkpoint protein requirements in somatic and germ cells. *Biochem Soc Trans* 34:583-586 (2006).

Johnson L, Thompson DL, Jr and Varner DD. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Anim Reprod Sci* 105:23-51 (2008).

K

Kastan MB and Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432:316-323 (2004).

Kateneva AV and Higgins JM. Shugoshin and PP2A: collaborating to keep chromosomes connected. *Dev Cell* 17:303-305 (2009).

Keeney S and Neale MJ. Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem Soc Trans* 34:523-525 (2006).

Kingsbury MA, Friedman B, McConnell MJ, Rehen SK, Yang AH, Kaushal D and Chun J. Aneuploid neurons are functionally active and integrated into brain circuitry. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6143-6147 (2005).

Kitajima TS, Sakuno T, Ishiguro K, Iemura S, Natsume T, Kawashima SA and Watanabe Y. Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* 441:46-52 (2006).

Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD and Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2474-2479 (2006).

L

- Leduc F, Nkoma GB and Boissonneault G. Spermiogenesis and DNA repair: a possible etiology of human infertility and genetic disorders. *Syst Biol Reprod Med* 54:3-10 (2008).
- Li M, Fang X, Baker DJ, Guo L, Gao X, Wei Z, Han S, van Deursen JM and Zhang P. The ATM-p53 pathway suppresses aneuploidy-induced tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:14188-14193 (2010).
- Li XC, Barringer BC and Barbash DA. The pachytene checkpoint and its relationship to evolutionary patterns of polyploidization and hybrid sterility. *Heredity* 102:24-30 (2009).
- Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Abrams J, Lipshultz LI and Kim ED. Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic states. *J Urol* 158:1791-1793 (1997a).
- Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Lipshultz LI and Kim ED. In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 68:1065-1069 (1997b).
- Liu CH, Tsao HM, Cheng TC, Wu HM, Huang CC, Chen CI, Lin DP and Lee MS. DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy in the spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic males. *J Assist Reprod Genet* 21:119-126 (2004).
- Lobrich M and Jeggo PA. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer* 7:861-869 (2007).
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H and Matsudaira P. *Molecular Cell Biology*, 6th edn. Chapter 20.7: Checkpoints in cell-cycle regulation. Ed W.H. Freeman and Company, New York, USA (2007).
- Lue Y, Jentsch JD, Wang C, Rao PN, Hikim AP, Salameh W and Swerdloff RS. XXY mice exhibit gonadal and behavioral phenotypes similar to Klinefelter syndrome. *Endocrinology* 146:4148-4154 (2005).

M

- Martin RH. Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update* 14:379-390 (2008).

Matijasevic Z, Steinman HA, Hoover K and Jones SN. MdmX promotes bipolar mitosis to suppress transformation and tumorigenesis in p53-deficient cells and mice. *Mol Cell Biol* 28:1265-1273 (2008).

Matzuk MM and Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 14:1197-1213 (2008).

Morelli MA and Cohen PE. Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 130:761-781 (2005).

Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Alvarez JG and Fernandez JL. Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J Androl* 28:38-49 (2007).

N

Navapurkar VU, Skepper JN, Jones JG and Menon DK. Propofol preserves the viability of isolated rat hepatocyte suspensions under an oxidant stress. *Anesth Analg* 87:1152-1157 (1998).

O

Ogawa T, Arechaga JM, Avarbock MR and Brinster RL. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol* 41:111-122 (1997).

Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR and Brinster RL. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nat Med* 6:29-34 (2000).

Ollinger R, Reichmann J and Adams IR. Meiosis and retrotransposon silencing during germ cell development in mice. *Differentiation* 79:147-158 (2010).

P

Paasch U, Grunewald S, Fitzl G and Glander HJ. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl* 24:246-252 (2003).

Page SL and Hawley RS. Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301:785-789 (2003).

Perrin A, Basinko A, Douet-Guilbert N, Gueganic N, Le Bris MJ, Amice V, De Braekeleer M and Morel F. Aneuploidy and DNA fragmentation in sperm of carriers of a constitutional chromosomal abnormality. *Cytogenet Genome Res* 133:100-106 (2011).

Print CG and Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 22:423-430 (2000).

R

Rehen SK, McConnell MJ, Kaushal D, Kingsbury MA, Yang AH and Chun J. Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13361-13366 (2001).

Rehen SK, Yung YC, McCreight MP, Kaushal D, Yang AH, Almeida BS, Kingsbury MA, Cabral KM, McConnell MJ, Anliker B et al. Constitutional aneuploidy in the normal human brain. *J Neurosci* 25:2176-2180 (2005).

Riedel CG, Katis VL, Katou Y, Mori S, Itoh T, Helmhart W, Galova M, Petronczki M, Gregan J, Cetin B et al. Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* 441:53-61 (2006).

Robles P, Roig I, Garcia R, Ortega A, Egozcue J, Cabero LL and Garcia M. Pairing and synapsis in oocytes from female fetuses with euploid and aneuploid chromosome complements. *Reproduction* 133:899-907 (2007).

Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I and Vassalli P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 16:2262-2270 (1997).

Royer C, Lucas TF, Lazari MF and Porto CS. 17Beta-Estradiol Signaling and Regulation of Proliferation and Apoptosis of Rat Sertoli Cells. *Biol Reprod* (2012).

Royo H, Polikiewicz G, Mahadevaiah SK, Prosser H, Mitchell M, Bradley A, de Rooij DG, Burgoyne PS and Turner JM. Evidence that meiotic sex chromosome inactivation is essential for male fertility. *Curr Biol* 20:2117-2123 (2010).

S

- Said TM, Paasch U, Glander HJ and Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update* 10:39-51 (2004).
- Sakkas D, Mariethoz E and St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 251:350-355 (1999).
- San Filippo J, Sung P and Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* 77:229-257 (2008).
- Schlatt S, Kim SS and Gosden R. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. *Reproduction* 124:339-346 (2002).
- Schlatt S, Rosiepen G, Weinbauer GF, Rolf C, Brook PF and Nieschlag E. Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Hum Reprod* 14:144-150 (1999).
- Schmid TE, Kamischke A, Bollwein H, Nieschlag E and Brinkworth MH. Genetic damage in oligozoospermic patients detected by fluorescence in-situ hybridization, inverse restriction site mutation assay, sperm chromatin structure assay and the Comet assay. *Hum Reprod* 18:1474-1480 (2003).
- Schutters K and Reutelingsperger C. Phosphatidylserine targeting for diagnosis and treatment of human diseases. *Apoptosis* 15:1072-1082 (2010).
- Shaha C, Tripathi R and Mishra DP. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365:1501-1515 (2010).
- Shintomi K and Hirano T. Sister chromatid resolution: a cohesin releasing network and beyond. *Chromosoma* 119:459-467 (2010).
- Silverthorn DU. *Human Physiology*, 5th edn. Chapter 26: Reproduction and development. Ed Benjamin Cummings, San Francisco, USA (2009).
- Sinha Hikim AP and Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 4:38-47 (1999).
- Sinha Hikim AP, Lue Y, Diaz-Romero M, Yen PH, Wang C and Swerdloff RS. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:175-182 (2003).

- Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D and Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109:323-330 (2008).
- Speed RM. Meiotic configurations in female trisomy 21 fetuses. *Hum Genet* 66:176-180 (1984).
- Stiblar-Martincic D. Morphometrical evaluation of germ cell apoptosis in infertile men. *Folia Biol (Praha)* 55:233-237 (2009).
- Sun F, Mikhaail-Philips M, Oliver-Bonet M, Ko E, Rademaker A, Turek P and Martin RH. Reduced meiotic recombination on the XY bivalent is correlated with an increased incidence of sex chromosome aneuploidy in men with non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 14:399-404 (2008).
- Sun F, Turek P, Greene C, Ko E, Rademaker A and Martin RH. Abnormal progression through meiosis in men with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 87:565-571 (2007).
- Sun JG, Jurisicova A and Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 56:602-607 (1997).
- Sun SC and Kim NH. Spindle assembly checkpoint and its regulators in meiosis. *Hum Reprod Update* 18:60-72 (2012).
- Szekvolgyi L and Nicolas A. From meiosis to postmeiotic events: homologous recombination is obligatory but flexible. *FEBS J* 277:571-589 (2010).

T

- Tang Z, Shu H, Qi W, Mahmood NA, Mumby MC and Yu H. PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Dev Cell* 10:575-585 (2006).
- Tay TW, Andriana BB, Ishii M, Tsunekawa N, Kanai Y and Kurohmaru M. Disappearance of vimentin in Sertoli cells: a mono(2-ethylhexyl) phthalate effect. *Int J Toxicol* 26:289-295 (2007).
- Taylor RC, Cullen SP and Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:231-241 (2008).

- Tempest HG. Meiotic recombination errors, the origin of sperm aneuploidy and clinical recommendations. *Syst Biol Reprod Med* 57:93-101 (2011).
- Templado C, Vidal F and Estop A. Aneuploidy in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 133:91-99 (2011).
- Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P and Mendoza C. Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol Hum Reprod* 4:757-762 (1998).
- Tesarik J, Martinez F, Rienzi L, Iacobelli M, Ubaldi F, Mendoza C and Greco E. In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. *Hum Reprod* 17:1811-1819 (2002).
- Thompson SL and Compton DA. Proliferation of aneuploid human cells is limited by a p53-dependent mechanism. *J Cell Biol* 188:369-381 (2010).
- Topping D, Brown P, Judis L, Schwartz S, Seftel A, Thomas A and Hassold T. Synaptic defects at meiosis I and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 21:3171-3177 (2006).
- Torres EM, Sokolsky T, Tucker CM, Chan LY, Boselli M, Dunham MJ and Amon A. Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. *Science* 317:916-924 (2007).
- Turner JM, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A, Xu X, Deng CX and Burgoyne PS. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet* 37:41-47 (2005).
- Turner JM. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* 134:1823-1831 (2007).

U

- Uroz L, Rajmil O and Templado C. Premature separation of sister chromatids in human male meiosis. *Hum Reprod* 23:982-987 (2008).

V

- Van Engeland M, Kuijpers HJ, Ramaekers FC, Reutelingsperger CP and Schutte B. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Exp Cell Res* 235:421-430 (1997).
- Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Calderon G, Egozcue S, Egozcue J and Barri PN. Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Hum Reprod* 14:375-378 (1999).
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184:39-51 (1995).
- Vogt E, Kirsch-Volders M, Parry J and Eichenlaub-Ritter U. Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutat Res* 651:14-29 (2008).

W

- Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ, Jr, Falcone T and Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 80:531-535 (2003).
- Watanabe TK, Hansen LJ, Reddy NK, Kanwar YS and Reddy JK. Differentiation of pancreatic acinar carcinoma cells cultured on rat testicular seminiferous tubular basement membranes. *Cancer Res* 44:5361-5368 (1984).
- Weaver BA and Cleveland DW. The aneuploidy paradox in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* 14:431-433 (2008).
- Williams BR, Prabhu VR, Hunter KE, Glazier CM, Whittaker CA, Housman DE and Amon A. Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. *Science* 322:703-709 (2008).
- Wolgemuth DJ and Roberts SS. Regulating mitosis and meiosis in the male germ line: critical functions for cyclins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365:1653-1662 (2010).
- Wood AJ, Severson AF and Meyer BJ. Condensin and cohesin complexity: the expanding repertoire of functions. *Nat Rev Genet* 11:391-404 (2010).

Y

Yan W. Male infertility caused by spermiogenic defects: lessons from gene knockouts. *Mol Cell Endocrinol* 306:24-32 (2009).

Z

Zhang HB, Lu SM, Ma CY, Wang L, Li X and Chen ZJ. Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl* 10:227-235 (2008).

Zilfou JT and Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001883 (2009).

A NNEXES

Annex I:

medis i solucions de treball

MEDIS DE DISGREGACIÓ

· 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)

SOLUCIONS DE FIXACIÓ

· Paraformaldehid 4 % en PBS a pH 7,4

Dissoldre en agitació a 50 °C:

- 1,6 g de paraformaldehid (Sigma-Aldrich GmbH)
- 30ml d'H₂O destil·lada.

Afegir-hi a poc a poc NaOH (Merk KGaA. Darnstadt, Alemanya) controlant el pH i dissoldre amb:

- 4 ml de 10 x PBS i deixar refredar.
- Aigua destil·lada fins a 40 ml.

SOLUCIONS PREHIBRIDACIÓ*· RNasa A (1µg/µl)*

Dissoldre:

- 10 µl de 2 x SSC (Abbot Molecular inc. Des Plaines, IL. 60018)
- 1 mg d'RNasa A (Roche Diagnostics GmbH).
- 990 µl de 2 x SSC.

· Pepsina (50 µg/ml)

Dissoldre:

- 50 mg de pepsina (Sigma-Aldrich GmbH)
- 0,5 ml d'H₂O desionitzada a 37 °C
- 990 ml d'H₂O_T
- 10 ml d'HCl (Panreac Química Sau. Castellà del Vallès, Barcelona. Espanya) 1,0 N a 37 °C

· Formaldehid 1 %

Dissoldre:

- 32,9 ml d'H₂O desionitzada
- 2 ml MgCl₂ (Sigma-Aldrich GmbH)
- 4 ml 10 x PBS
- 1,08 ml formaldehid 37 % (Sigma-Aldrich GmbH)

SOLUCIONS HIBRIDACIÓ*· Formamida 70 %*

Dissoldre:

- 28 ml formamida (Roche Diagnostics GmbH)
- 4 ml 20 x SSC
- 8 ml H₂O desionitzada

· *DTT (dithiothreitol, 5mM)*

Dissoldre:

- 0,604 g tris (Roche Diagnostics GmbH)
- 1 ml tritró-X100 (Sigma-Aldrich GmbH)
- 0,0772 g DTT (sense humitat) (Roche Diagnostics GmbH)
- 100 ml d'H₂O desionitzada

Annex II:

informe del servei d'estadística aplicada

Informe Estadístic

INFORME ESTADÍSTIC

Elaborat per a:

Lydia Garcia Quevedo
Francesca Vidal
Joan Blanco
Departament de Biologia Cel·lular
Edifici C - Campus UAB

Disseny i anàlisi:

Oliver Valero
Servei d'Estadística UAB
Edifici D - Campus UAB
Tel. 935 81 13 47
08193 Cerdanyola del Vallès
(Barcelona)

Novembre de 2011

Índex

1 MATERIAL I MÈTODES	117
1.1 ANÀLISI DESCRIPTIVA	117
1.2 ANÀLISI BIVARIADA	117
1.3 ANÀLISI LONGITUDINAL	118
1.4 ANÀLISI DE CLÚSTERS	118
2 RESULTATS	119
2.1 ANÀLISI DESCRIPTIVA	119
2.2 ANÀLISI BIVARIADA	122
2.2.1 DIPLOIDES	122
2.2.2 PROFASE	124
2.2.3 HAPLOIDES	126
2.2.4 ZOIDES	128
2.2.5 SERTOLI	130
2.3 ANÀLISI LONGITUDINAL	132
2.4 ANÀLISI DE CLÚSTERS	134
2.4.1 CLASSIFICACIÓ EN 5 GRUPS	134
2.4.2 CLASSIFICACIÓ EN 6 GRUPS	139
2.5 ANÀLISI DE CLÚSTERS SEGONS LA FRACCIÓ	145
2.6 ANÀLISI DE CLÚSTERS INDIVIDUAL	151
2.6.1 ANÀLISI AMB TOTS ELS PACIENTS	151
2.6.2 ANÀLISI SENSE ELS PACIENTS 7 I 14	156
2.6.3 ANÀLISI SENSE ELS PACIENTS 7, 12 I 14	160

1 Material i mètodes

Per facilitar l'anàlisi dels pacients i de les poblacions es va assignar a cada pacient un codi ordinal i es va simplificar les terminologies per els tipus cel·lular i les fraccions.

Codificació Pacients									
Pacient	Codi	Pacient	Codi	Pacient	Codi	Pacient	Codi	Pacient	Codi
555	1	576	4	579	7	597	10	600	13
560	2	577	5	585	8	598	11	602	14
567	3	578	6	586	9	599	12		

Terminologies		
Terme	Codi	Abreviatura
Fracció apoptòtica	Anexina +	A+/AP
Fracció viable	Anexina -	A-/AN
Fracció no seleccionada	Control	C
Pre-reduccionals	Diploides	Dip
Post-reduccionals	Haploides	Hap
Espermatozoides	Zoides	Zoi
Profase I	Profase	Pro

1.1 Anàlisi descriptiva

S'han representat gràficament mitjançant diagrames de caixa el total de cèl·lules segons la fase i segons la fase en cadascuna de les fraccions. També s'han representat el total de cèl·lules anormals i el percentatge de cèl·lules a normals.

1.2 Anàlisi bivariada

Per a cadascuna de les valoracions (Diploides, Profase, Haploides, Zoides i Sertoli) s'ha calculat el percentatge de cèl·lules anormals. Aquests percentatges s'han representat gràficament mitjançant histogrames i diagrames de caixa per a cadascuna de les fraccions (Control, Anexina- i Anexina+).

S'han obtingut taules resum amb els estadístics de resum: N, Mediana, Quartils, i Valors Màxim i Mínim per a cada fracció. Per comparar els percentatges de cèl·lules anormals entre les tres fraccions s'ha utilitzat un model no paramètric (Test de Kruskal-Wallis). En cas d'obtenir un resultat significatiu, s'han realitzat els contrastos 2 a 2 a *posteriori*.

L'anàlisi dels percentatges no té en compte el nombre total de cèl·lules observades en cada pacient ni les mesures repetides entre individus. Per evitar aquests problemes s'ha considerat un model lineal generalitzat amb mesures repetides per modelar el nombre de cèl·lules anòmales en funció de la fracció tenint en compte el total de cèl·lules de cada individu (aquesta informació s'ha considerat com a *offset*). S'ha corregit el problema de sobredispersió en la variable resposta (*over dispersion*).

Per a cadascuna de les fraccions s'han obtingut els percentatges de cèl·lules anòmales estimats pel model amb l'interval de confiança al 95% i s'han realitzat comparacions 2 a 2.

1.3 Anàlisi longitudinal

Per analitzar el nombre de cèl·lules anormals segons la fase (Diploides, Haploides, Profase i Zoides) i la fracció conjuntament s'ha considerat un model lineal generalitzat amb mesures repetides. Com a variables explicatives s'han fet servir la fase, la fracció i la interacció entre les dues variables. Per a cadascuna de les fraccions s'han obtingut els percentatges de cèl·lules anòmales estimats pel model amb l'interval de confiança al 95% i s'han realitzat comparacions 2 a 2.

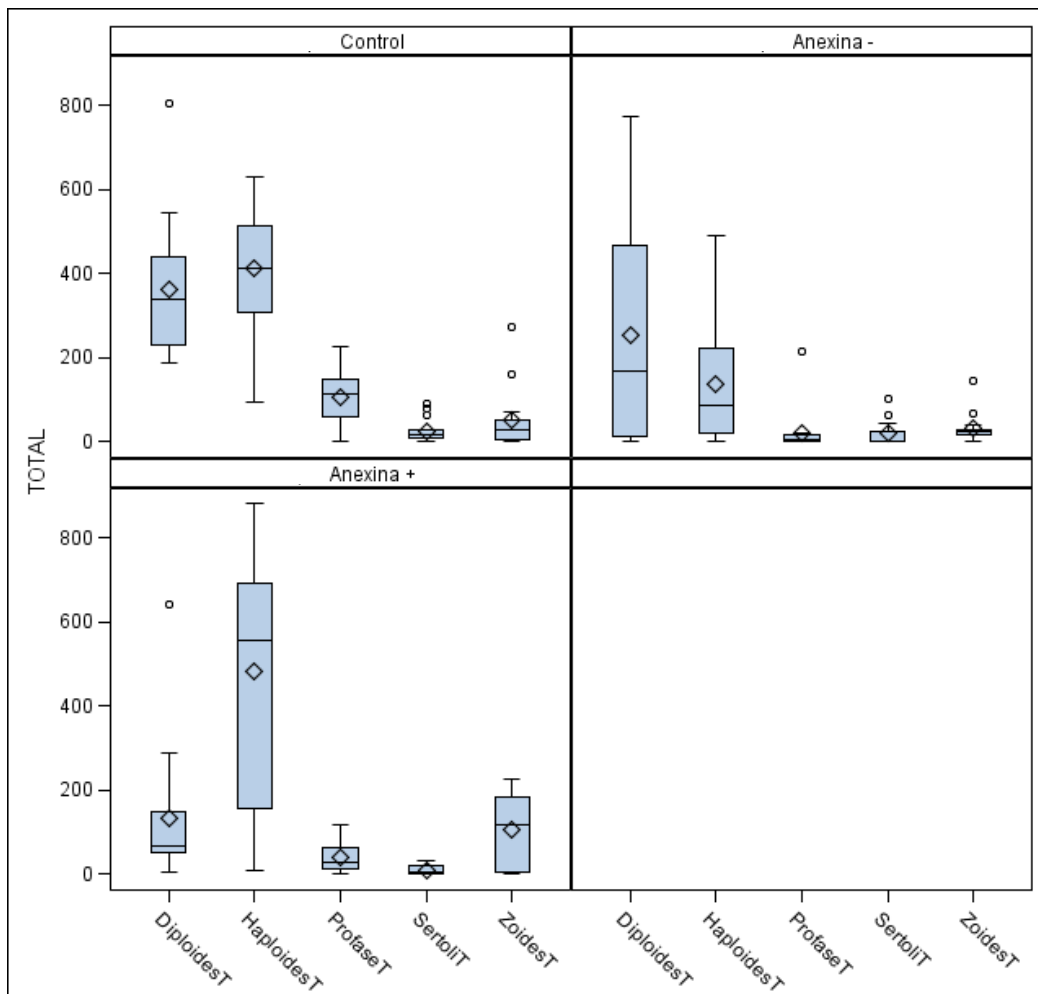
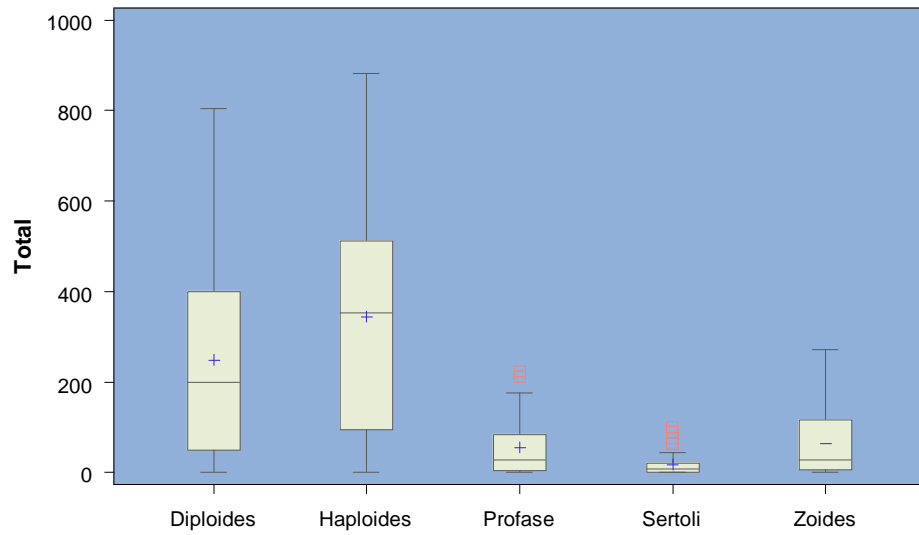
1.4 Anàlisi de clústers

Per tal de detectar grups d'individus amb perfils similars pel que fa al percentatge de cèl·lules anormals en les fases Diploides, Haploides, Profase i Zoides s'ha realitzat un anàlisi de clústers.

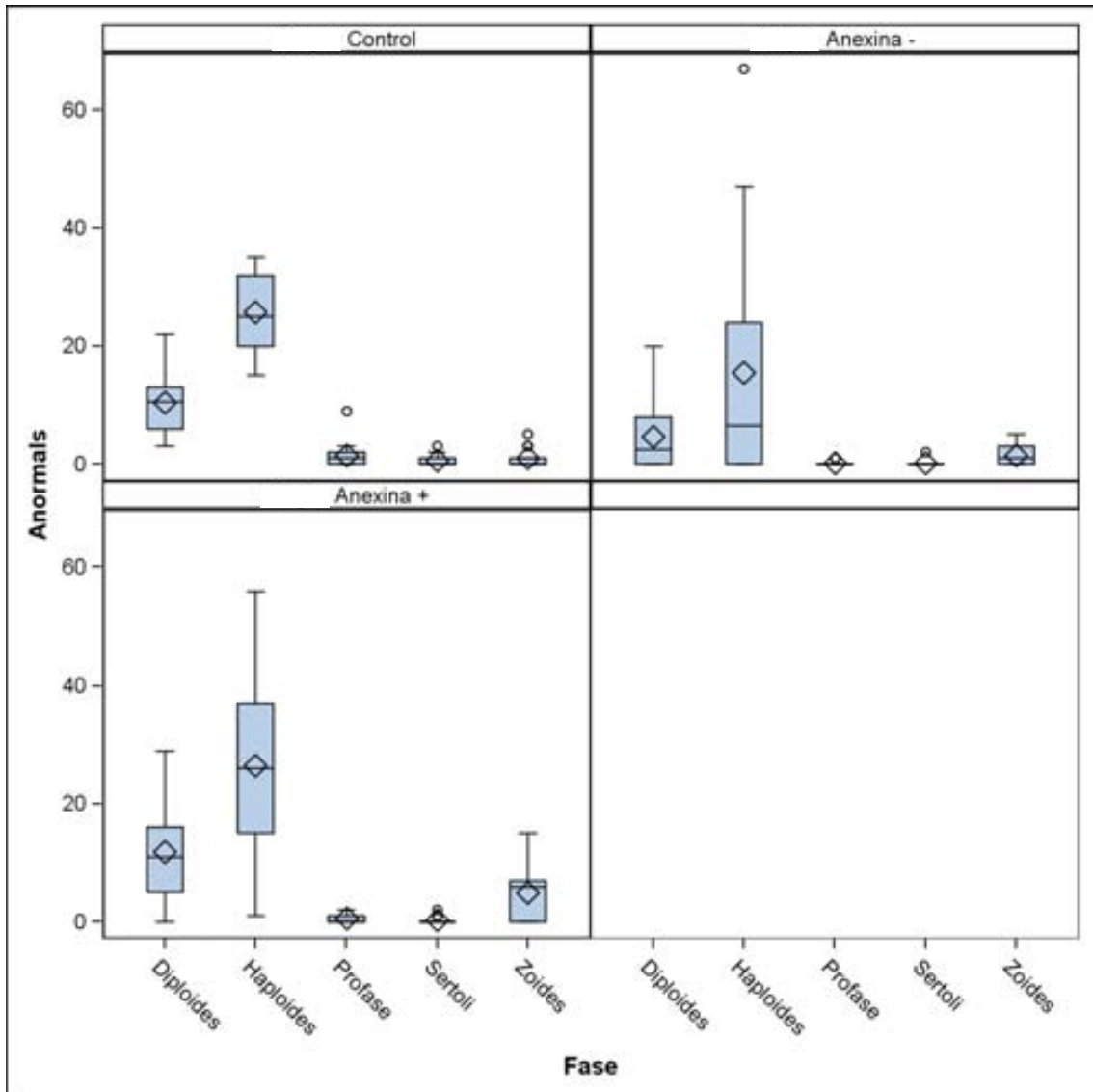
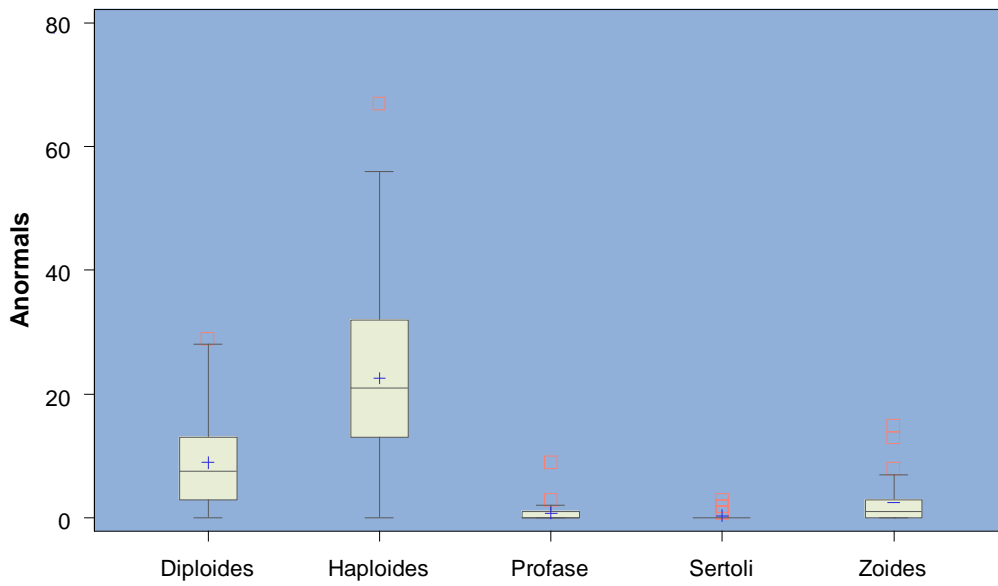
2 Resultats

2.1 Anàlisi descriptiva

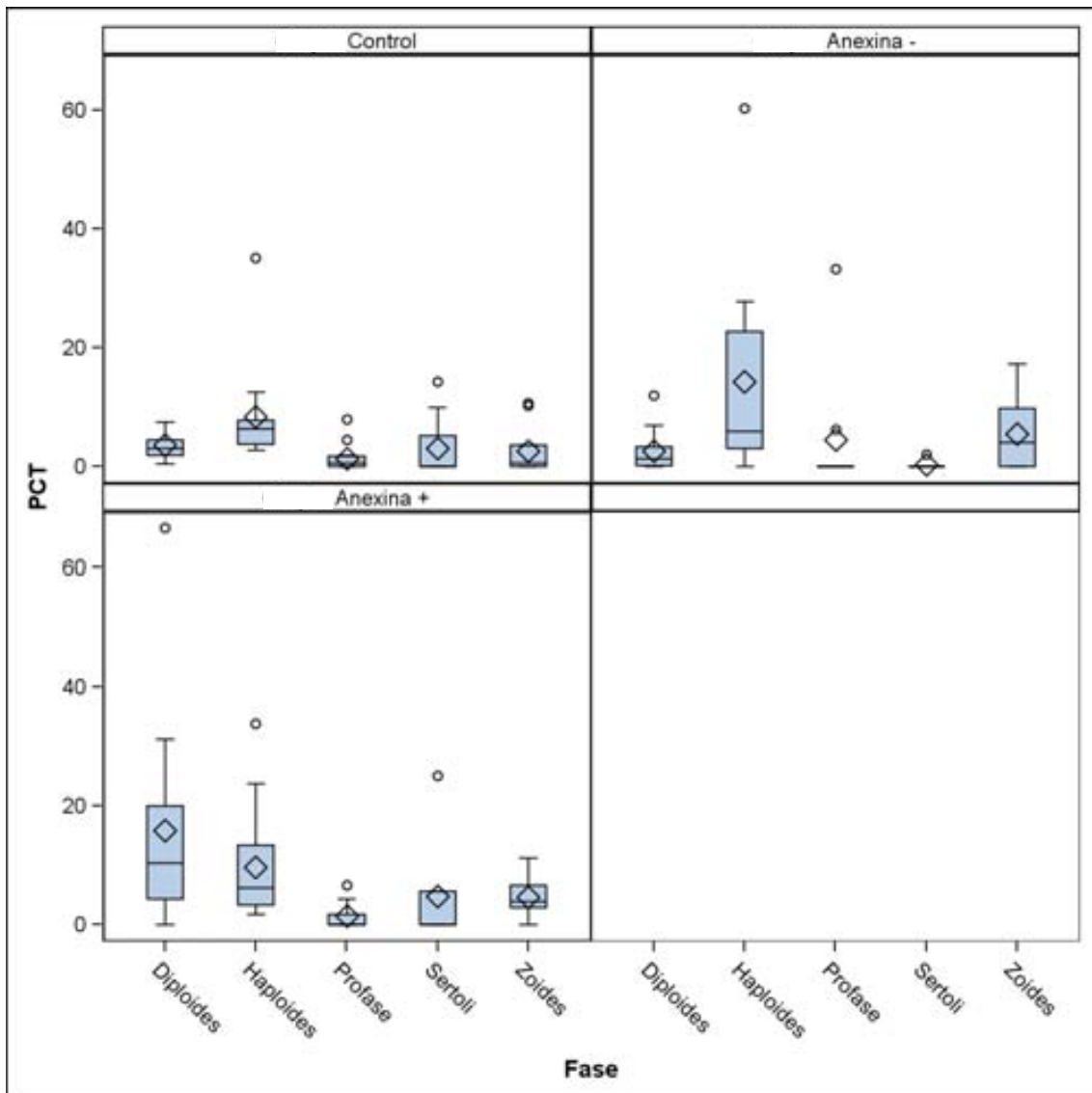
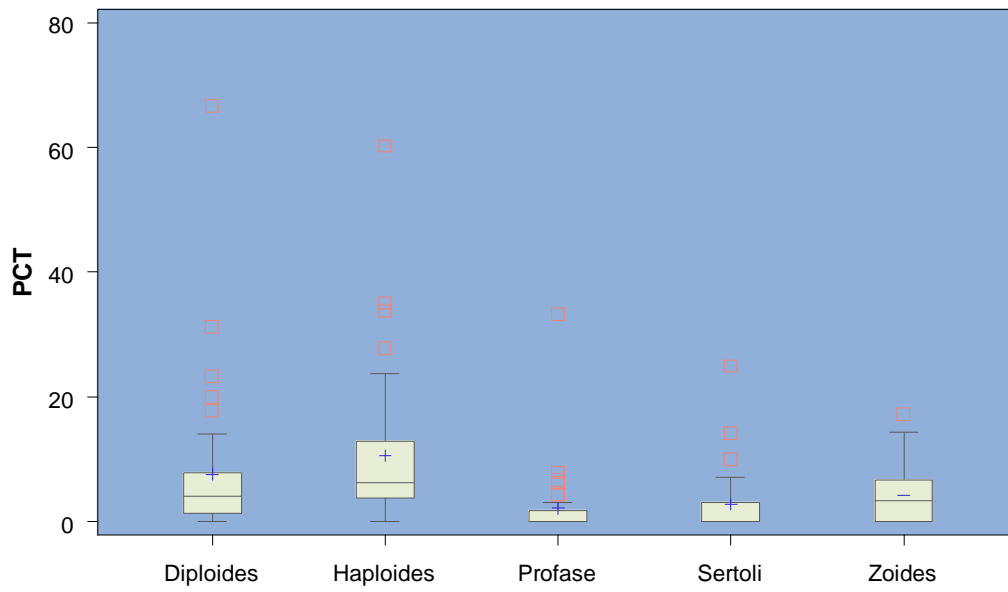
Distribució del nombre total de cèl·lules segons la fase:



Distribució del nombre total de cèl·lules anormals segons la fase:

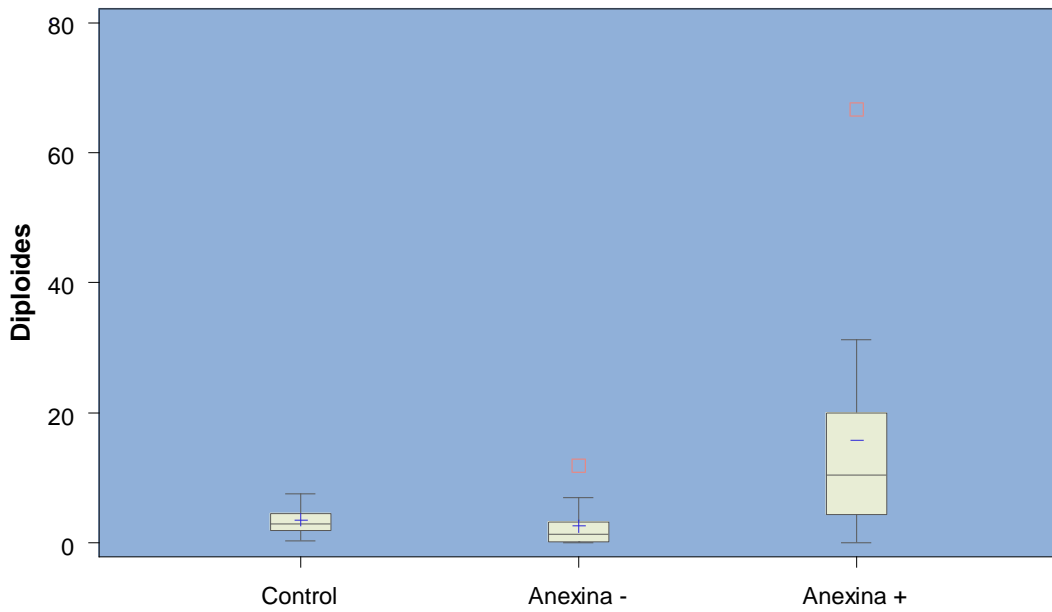
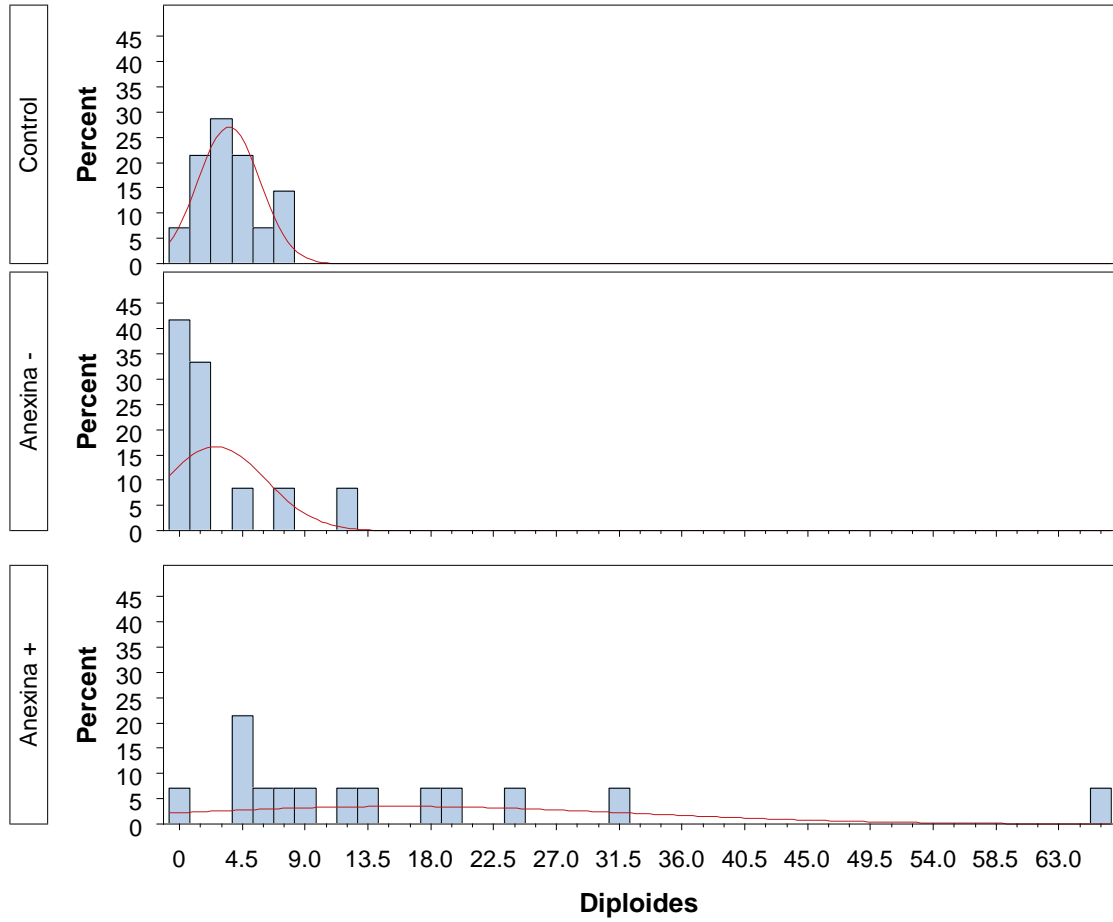


Distribució del percentatge de cèl·lules anormals segons la fase:



2.2 Anàlisi bivariada

2.2.1 Diploides



Analysis Variable : Diploides							
Fracció	N Obs	N Miss	Minimum	Lower Quartile	Median	Upper Quartile	Maximum
Control	14	0	0.4	1.9	3.0	4.5	7.5
Anexina -	14	2	0.0	0.2	1.3	3.3	11.9
Anexina +	14	0	0.0	4.4	10.4	20.0	66.7

Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	14.2921
DF	2
Pr > Chi-Square	0.0008

S'observen diferències estadísticament significatives ($\chi^2=14,29$, p-valor=0,0008). Per veure entre quines fraccions hi ha diferències s'han realitzat comparacions 2 a 2:

i/j	1	2	3
1		0.1050	0.0019
2			0.0024
3			

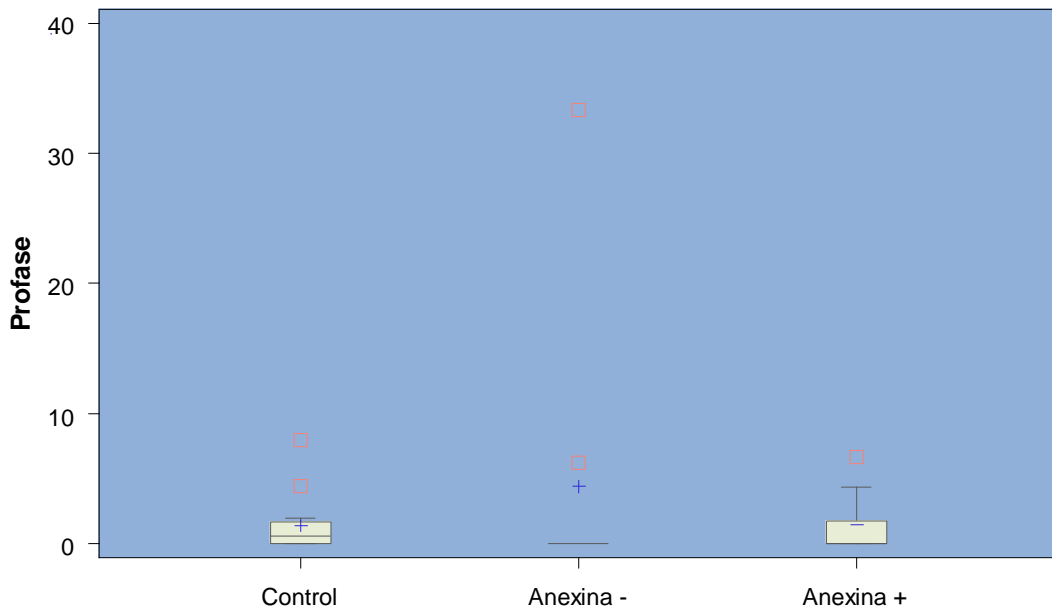
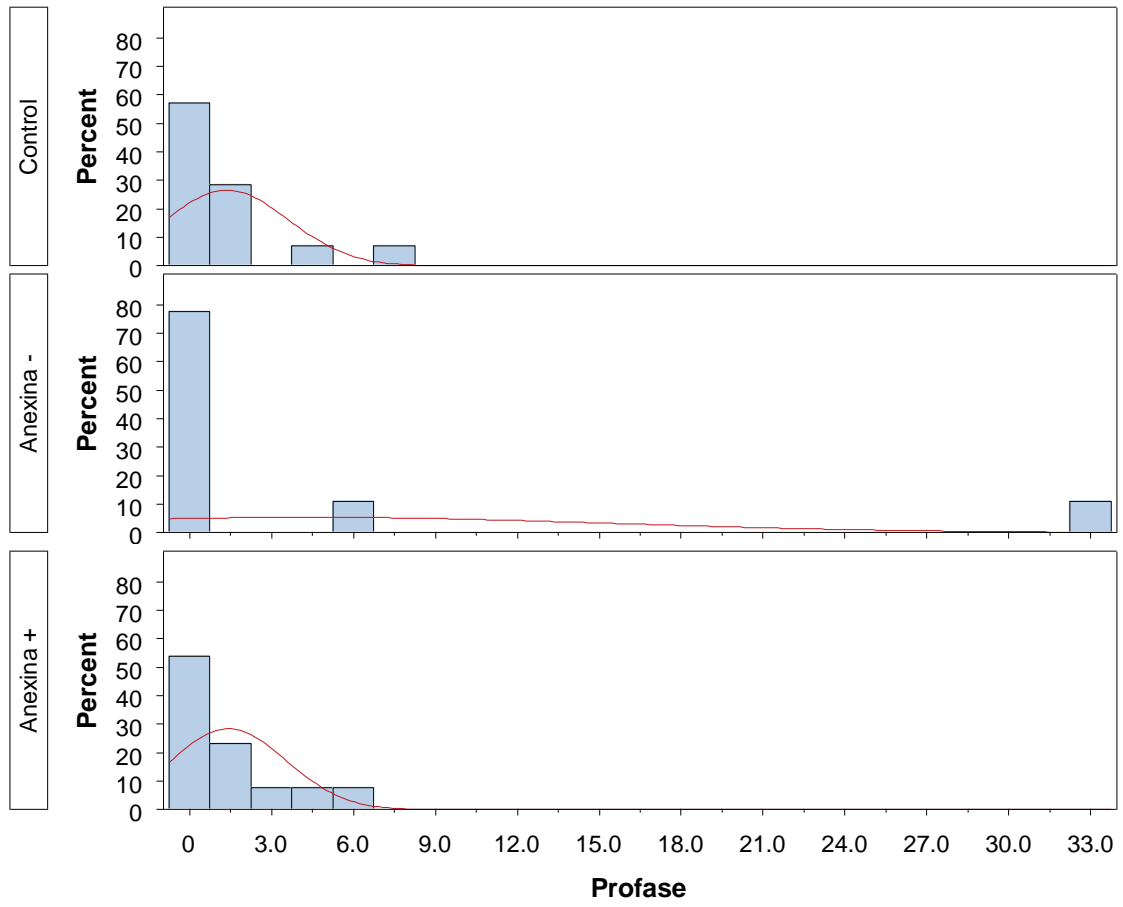
Modelització:

Score Statistics For Type 3 GEE Analysis			
Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
Fracció	2	10.85	0.0044

Fracció	Estimate	Lower Confidence Limit	Upper Confidence Limit
Anexina +	8.9104	5.4995	14.4367
Anexina -	1.8223	1.0275	3.2319
Control	2.8667	1.9554	4.2028

Fracció	_Fracció	Estimate	ChiSquare	Pr>Chi	RR
Anexina +	Anexina -	1.5871	38.74	<.0001	4.89
Anexina +	Control	1.1340	36.36	<.0001	3.11
Anexina -	Control	-0.4531	2.38	0.1227	0.64

2.2.2 Profase



Analysis Variable : Profase							
Fracció	N Obs	N Miss	Minimum	Lower Quartile	Median	Upper Quartile	Maximum
Control	14	0	0.0	0.0	0.6	1.7	8.0
Anexina -	14	5	0.0	0.0	0.0	0.0	33.3
Anexina +	14	1	0.0	0.0	0.0	1.7	6.7

Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	0.9610
DF	2
Pr > Chi-Square	0.6185

No s'observen diferències estadísticament significatives ($\chi^2=0,96$, p-valor=0,6185).

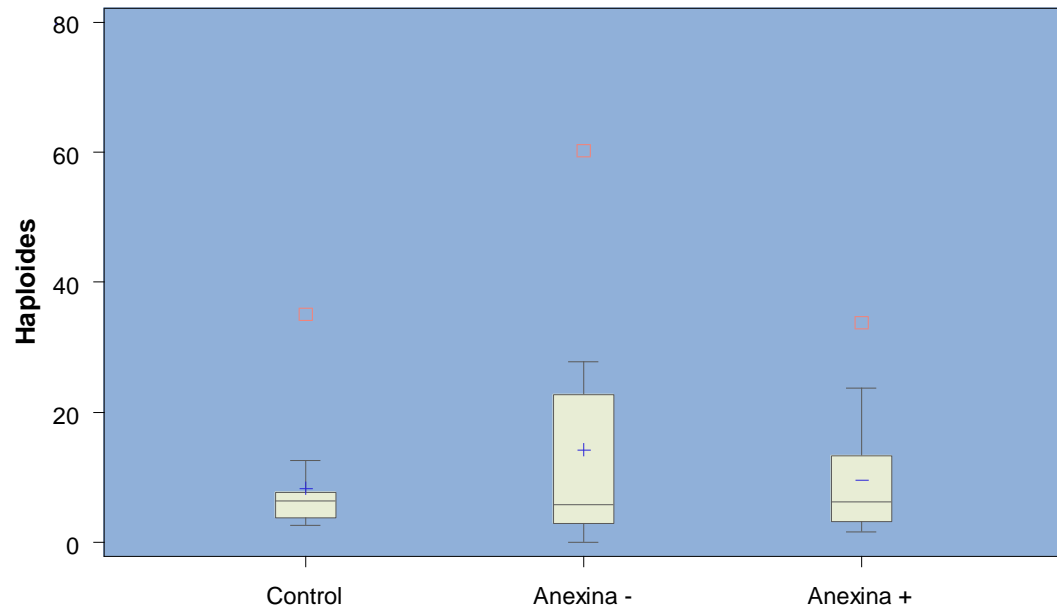
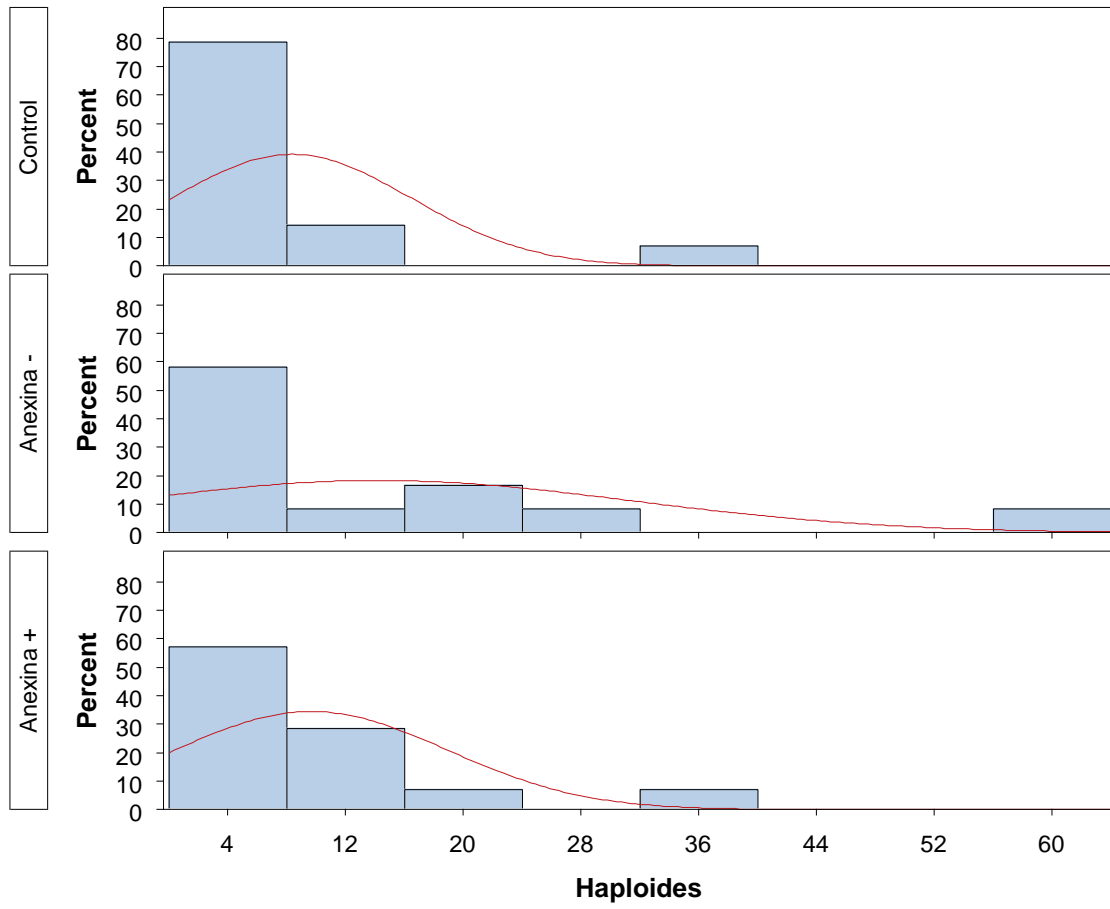
Modelització:

Score Statistics For Type 3 GEE Analysis			
Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
Fracció	2	1.59	0.4510

Fracció	Estimate	Lower Confidence Limit	Upper Confidence Limit
Anexina +	1.7078	0.9894	2.9477
Anexina -	0.6689	0.0986	4.5387
Control	1.4344	0.6559	3.1368

Fracció	_Fracció	Estimate	ChiSquare	Pr>Chi	RR
Anexina +	Anexina -	0.9373	1.26	0.2622	2.55
Anexina +	Control	0.1744	0.15	0.6962	1.19
Anexina -	Control	-0.7629	0.52	0.4699	0.47

2.2.3 Haploides



Analysis Variable : Haploides							
Fracció	N Obs	N Miss	Minimum	Lower Quartile	Median	Upper Quartile	Maximum
Control	14	0	2.7	3.7	6.4	7.7	35.1
Anexina -	14	2	0.0	3.0	5.9	22.7	60.3
Anexina +	14	0	1.7	3.3	6.2	13.4	33.8

Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	0.0729
DF	2
Pr > Chi-Square	0.9642

No s'observen diferències estadísticament significatives ($\chi^2=0,073$, p-valor=0,9642).

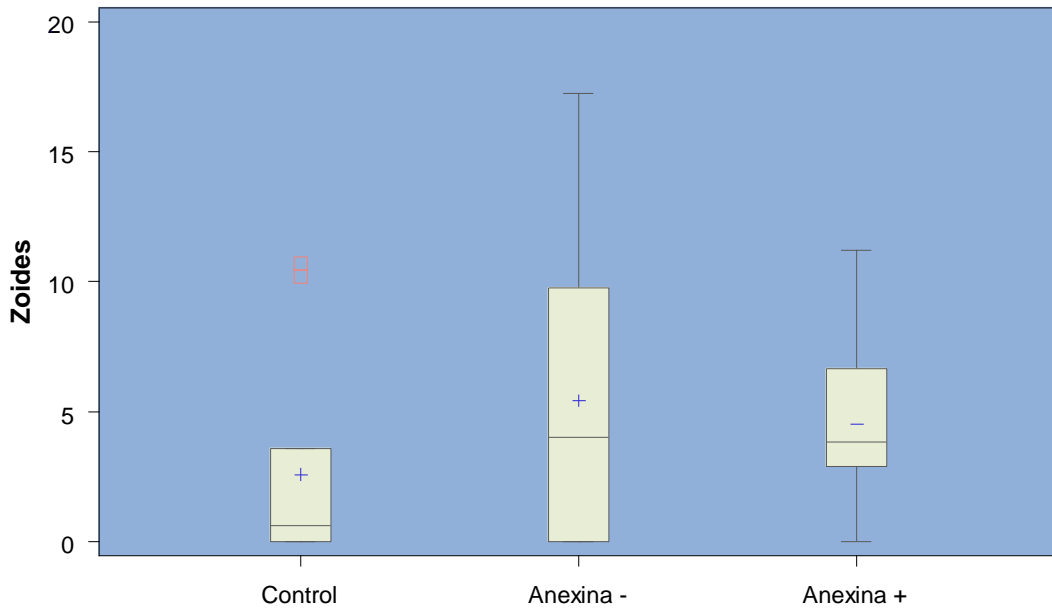
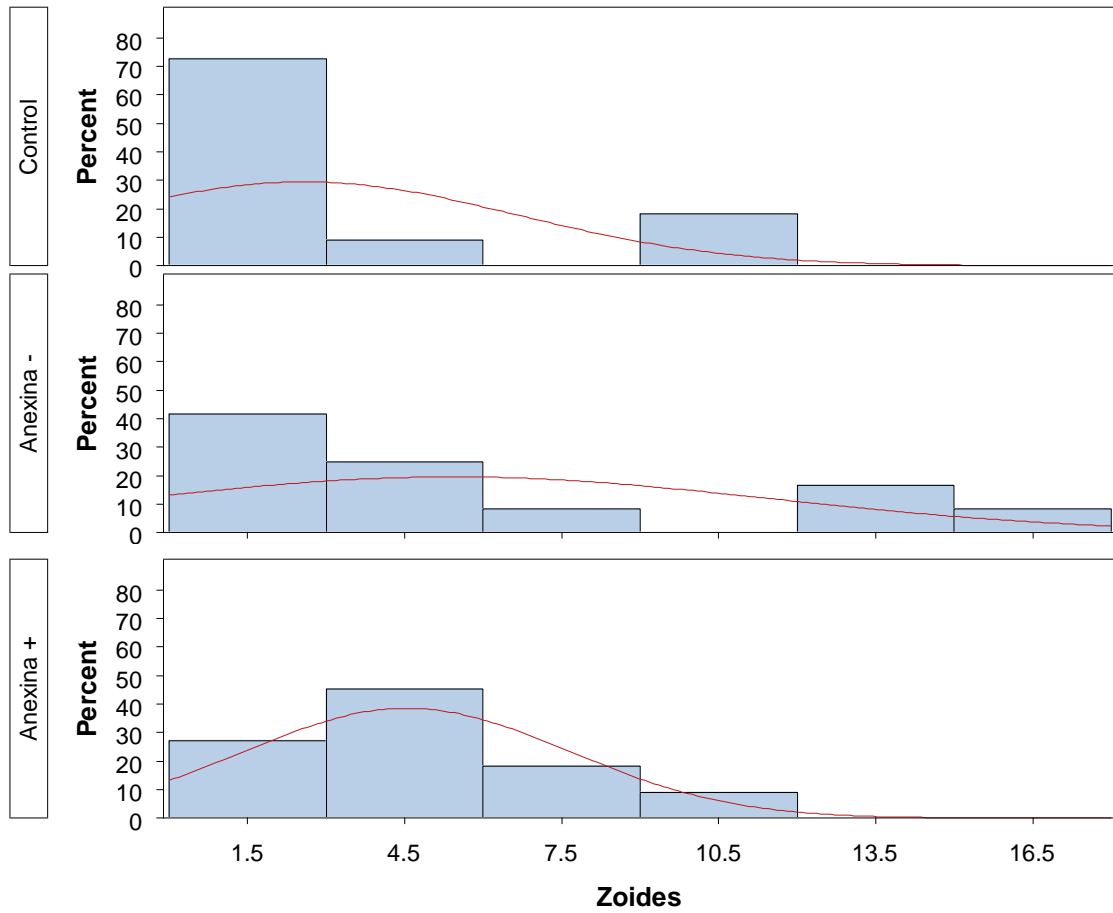
Modelització:

Score Statistics For Type 3 GEE Analysis			
Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
Fracció	2	2.50	0.2859

Fracció	Estimate	Lower Confidence Limit	Upper Confidence Limit
Anexina +	5.5200	3.7362	8.1555
Anexina -	11.2559	5.3558	23.6555
Control	6.2262	4.7751	8.1183

Fracció	_Fracció	Estimate	ChiSquare	Pr>Chi	RR
Anexina +	Anexina -	-0.7125	3.72	0.0538	0.49
Anexina +	Control	-0.1204	0.51	0.4754	0.89
Anexina -	Control	0.5921	2.97	0.0847	1.81

2.2.4 Zoides



Analysis Variable : Zoides							
Fracció	N Obs	N Miss	Minimum	Lower Quartile	Median	Upper Quartile	Maximum
Control	14	3	0.0	0.0	0.6	3.6	10.7
Anexina -	14	2	0.0	0.0	4.0	9.8	17.2
Anexina +	14	3	0.0	2.9	3.8	6.7	11.2

Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	3.1448
DF	2
Pr > Chi-Square	0.2075

No s'observen diferències estadísticament significatives ($\chi^2=3,14$, p-valor=0,2075).

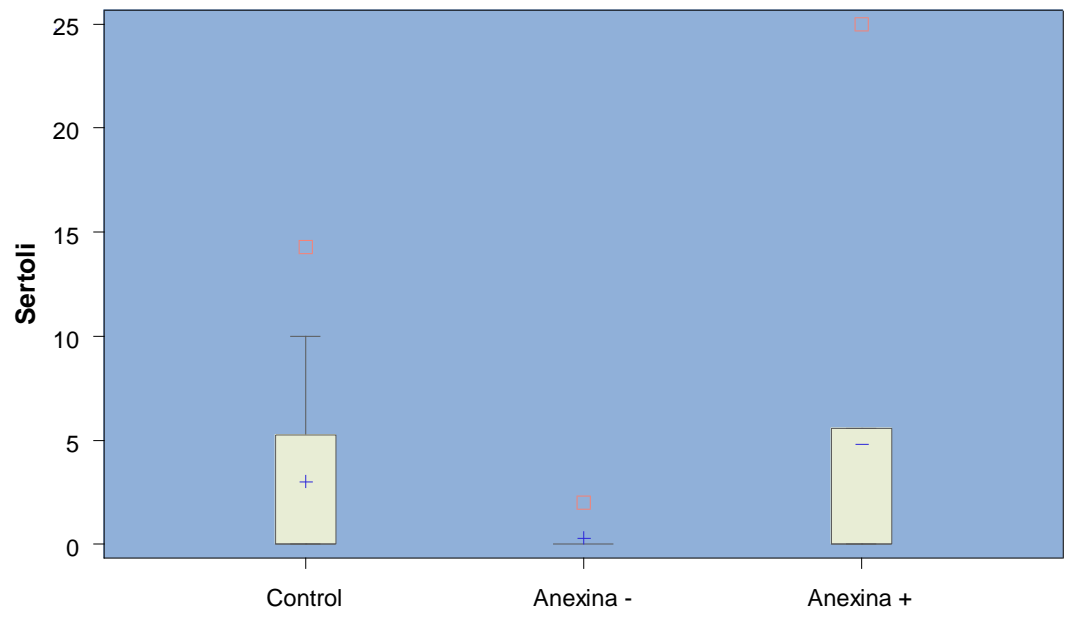
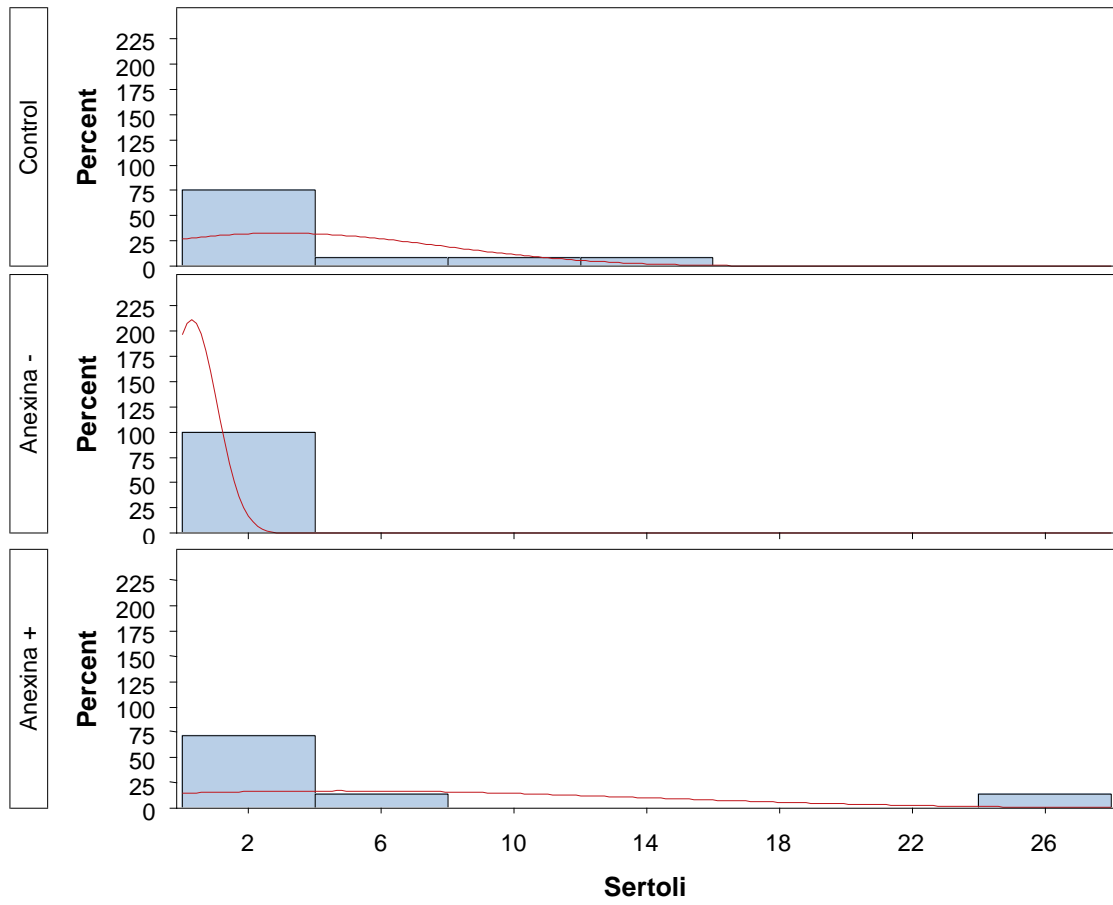
Modelització:

Score Statistics For Type 3 GEE Analysis			
Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
Fracció	2	2.85	0.2404

Fracció	Estimate	Lower Confidence Limit	Upper Confidence Limit
Anexina +	4.6465	3.3576	6.4301
Anexina -	4.5455	2.1847	9.4572
Control	1.9526	0.8563	4.4524

Fracció	_Fracció	Estimate	ChiSquare	Pr>Chi	RR
Anexina +	Anexina -	0.0220	0.00	0.9601	1.02
Anexina +	Control	0.8670	3.89	0.0487	2.38
Anexina -	Control	0.8450	2.92	0.0875	2.33

2.2.5 Sertoli



Analysis Variable : Sertoli							
Fracció	N Obs	N Miss	Minimum	Lower Quartile	Median	Upper Quartile	Maximum
Control	14	2	0.0	0.0	0.0	5.2	14.3
Anexina -	14	7	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0
Anexina +	14	7	0.0	0.0	0.0	5.6	25.0

Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	2.1557
DF	2
Pr > Chi-Square	0.3403

No s'observen diferències estadísticament significatives ($\chi^2=2,16$, p-valor=0,3430).

Modelització:

Score Statistics For Type 3 GEE Analysis			
Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
Fracció	2	4.52	0.1042

Fracció	Estimate	Lower Confidence Limit	Upper Confidence Limit
Anexina +	3.2520	1.1636	9.0886
Anexina -	0.8000	0.2095	3.0544
Control	2.2663	1.1178	4.5949

Fracció	_Fracció	Estimate	ChiSquare	Pr>Chi	RR
Anexina +	Anexina -	1.4024	2.64	0.1042	4.06
Anexina +	Control	0.3611	0.31	0.5782	1.43
Anexina -	Control	-1.0413	3.20	0.0735	0.35

2.3 Anàlisi longitudinal

Score Statistics For Type 3 GEE Analysis			
Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
Fase	3	6.59	0.0861
Fracció	2	5.62	0.0603
Fase*Fracció	6	12.04	0.0611

Fase	Fracció	Estimate	Lower Confidence Limit	Upper Confidence Limit
Diploides	Anexina +	8.9104	5.4995	14.4367
Diploides	Anexina -	1.8223	1.0275	3.2319
Diploides	Control	2.8667	1.9554	4.2028
Haploides	Anexina +	5.5200	3.7362	8.1555
Haploides	Anexina -	11.2559	5.3558	23.6555
Haploides	Control	6.2262	4.7751	8.1183
Profase	Anexina +	1.7078	0.9894	2.9477
Profase	Anexina -	0.6689	0.0986	4.5387
Profase	Control	1.4344	0.6559	3.1368
Zoides	Anexina +	4.6465	3.3576	6.4301
Zoides	Anexina -	4.5455	2.1847	9.4572
Zoides	Control	1.9526	0.8563	4.4524

Comparacions 2 a 2:

Fase	Fracció	_Fracció	Estimate	ChiSquare	Pr>Chi
Diploides	Anexina +	Anexina -	1.5871	38.74	<.0001
Diploides	Anexina +	Control	1.1340	36.36	<.0001
Diploides	Anexina -	Control	-0.4531	2.38	0.1227
Haploides	Anexina +	Anexina -	-0.7125	3.72	0.0538
Haploides	Anexina +	Control	-0.1204	0.51	0.4754
Haploides	Anexina -	Control	0.5921	2.97	0.0847
Profase	Anexina +	Anexina -	0.9373	1.26	0.2622
Profase	Anexina +	Control	0.1744	0.15	0.6962
Profase	Anexina -	Control	-0.7629	0.52	0.4699
Zoides	Anexina +	Anexina -	0.0220	0.00	0.9601
Zoides	Anexina +	Control	0.8670	3.89	0.0487
Zoides	Anexina -	Control	0.8450	2.92	0.0875

Fracció	Fase	_Fase	Estimate	ChiSquare	Pr>Chi
Control	Diploides	Haploides	-0.7756	6.87	0.0088
Control	Diploides	Profase	0.6924	1.97	0.1605
Control	Diploides	Zoides	0.3840	0.68	0.4090
Control	Haploides	Profase	1.4680	12.72	0.0004
Control	Haploides	Zoides	1.1596	6.86	0.0088
Control	Profase	Zoides	-0.3084	0.23	0.6304
Anexina -	Diploides	Haploides	-1.8208	8.42	0.0037
Anexina -	Diploides	Profase	1.0022	0.67	0.4147
Anexina -	Diploides	Zoides	-0.9140	3.15	0.0757
Anexina -	Haploides	Profase	2.8230	14.74	0.0001
Anexina -	Haploides	Zoides	0.9068	5.12	0.0237
Anexina -	Profase	Zoides	-1.9163	3.37	0.0663
Anexina +	Diploides	Haploides	0.4788	1.70	0.1929
Anexina +	Diploides	Profase	1.6520	13.95	0.0002
Anexina +	Diploides	Zoides	0.6511	4.80	0.0285
Anexina +	Haploides	Profase	1.1732	10.33	0.0013
Anexina +	Haploides	Zoides	0.1723	0.34	0.5579
Anexina +	Profase	Zoides	-1.0009	9.15	0.0025

2.4 Anàlisi de clústers

2.4.1 Classificació en 5 grups

Clúster				
CLUSTER	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
1	7	17.07	7	17.07
2	4	9.76	11	26.83
3	21	51.22	32	78.05
4	7	17.07	39	95.12
5	2	4.88	41	100.00

Frequency Missing = 1

Distribució de les fraccions en els clústers:

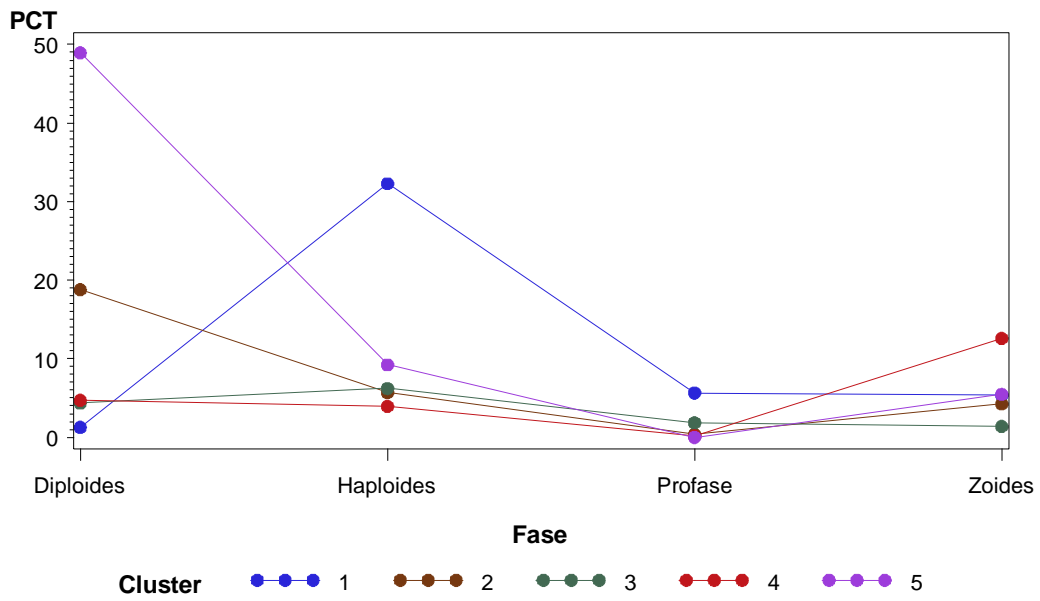
Table of CLUSTER by fraction				
Clúster	Fracció			
Frequency Row Pct	Control	Anexina -	Anexina +	Total
1	1 14.29	4 57.14	2 28.57	7
2	0 0.00	0 0.00	4 100.00	4
3	10 47.62	6 28.57	5 23.81	21
4	3 42.86	3 42.86	1 14.29	7
5	0 0.00	0 0.00	2 100.00	2
Total	14	13	14	41

Frequency Missing = 1

Descripció dels clústers:

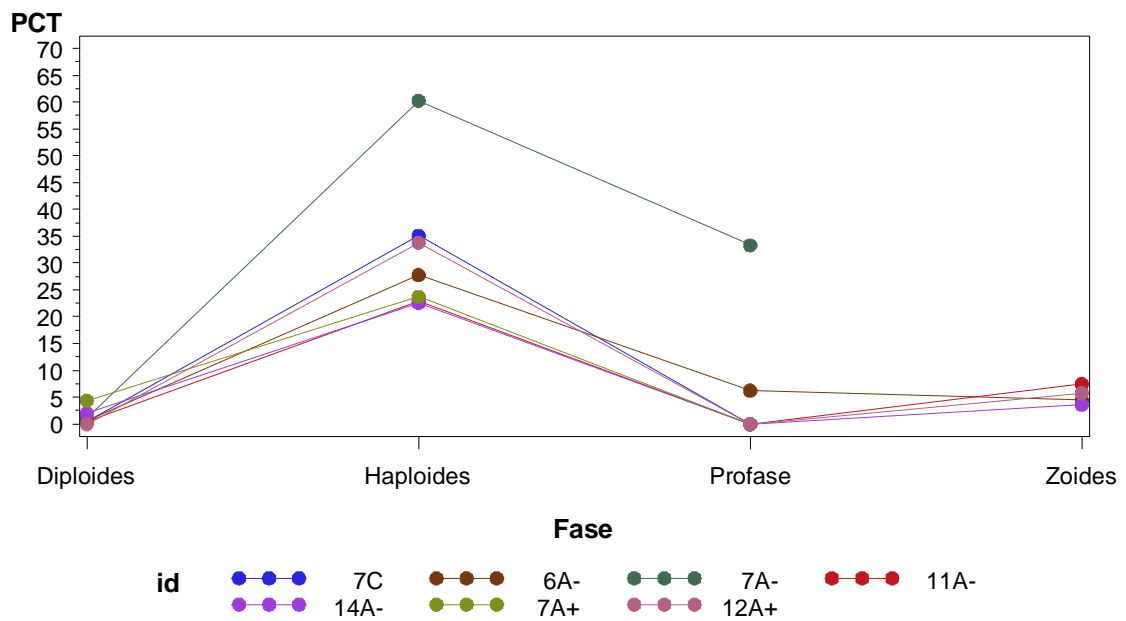
Analysis Variable : PCT							
Fase	Cluster	N	N Miss	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
Diploides	1	7	0	1.28	1.51	0.00	4.36
	2	4	0	18.81	3.91	14.00	23.33
	3	21	0	4.35	3.49	0.00	11.90
	4	6	1	4.73	2.93	0.00	7.51
	5	2	0	48.96	25.04	31.25	66.67
Haploides	1	7	0	32.30	13.36	22.58	60.26
	2	4	0	5.71	5.25	1.70	13.40
	3	21	0	6.22	3.42	0.00	13.79
	4	6	1	3.96	3.10	0.00	9.15
	5	2	0	9.24	7.14	4.19	14.29
Profase	1	7	0	5.65	12.43	0.00	33.33
	2	4	0	0.40	0.79	0.00	1.59
	3	19	2	1.86	2.40	0.00	7.96
	4	5	2	0.18	0.40	0.00	0.88
	5	1	1	0.00	.	0.00	0.00
Zoides	1	4	3	5.33	1.70	3.57	7.50
	2	3	1	4.28	2.10	2.88	6.70
	3	20	1	1.41	2.03	0.00	6.67
	4	6	1	12.61	2.68	10.20	17.24
	5	1	1	5.48	.	5.48	5.48
Sertoli	1	3	4	0.00	0.00	0.00	0.00
	2	2	2	15.28	13.75	5.56	25.00
	3	18	3	2.21	4.14	0.00	14.29
	4	3	4	0.43	0.75	0.00	1.30
	5	0	2

Gràfic de perfils:

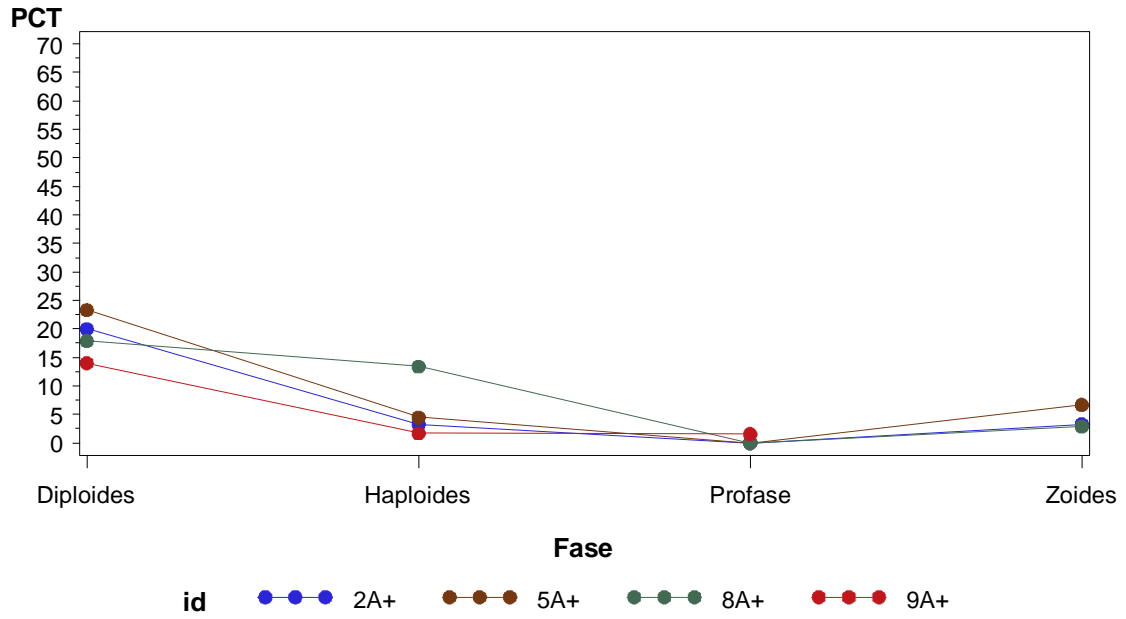


Perfils individuals:

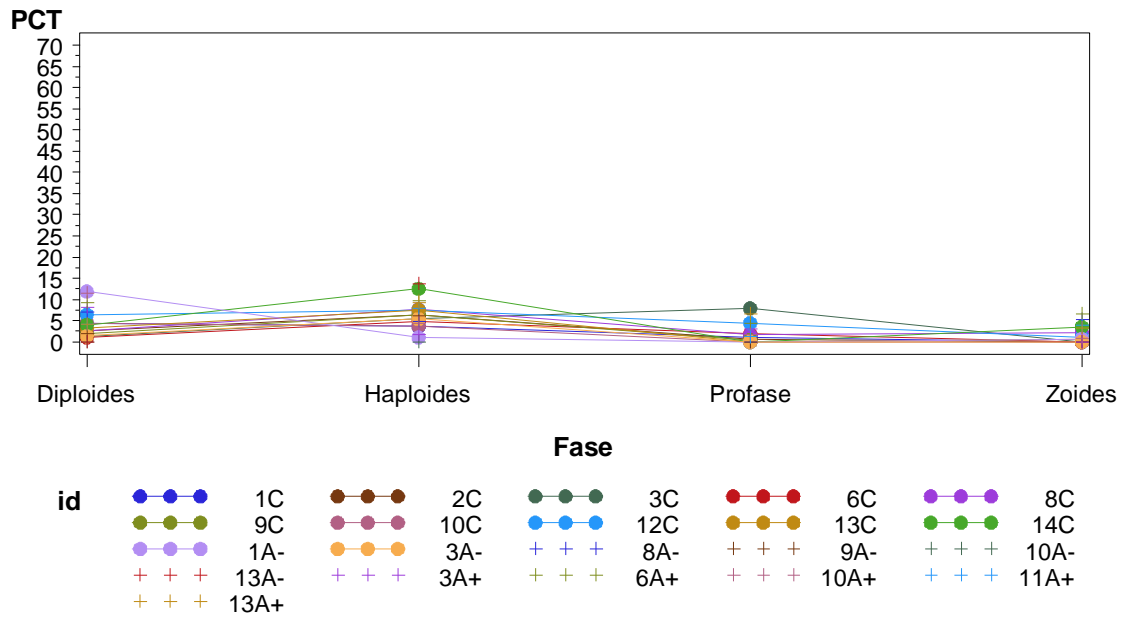
Cluster=1



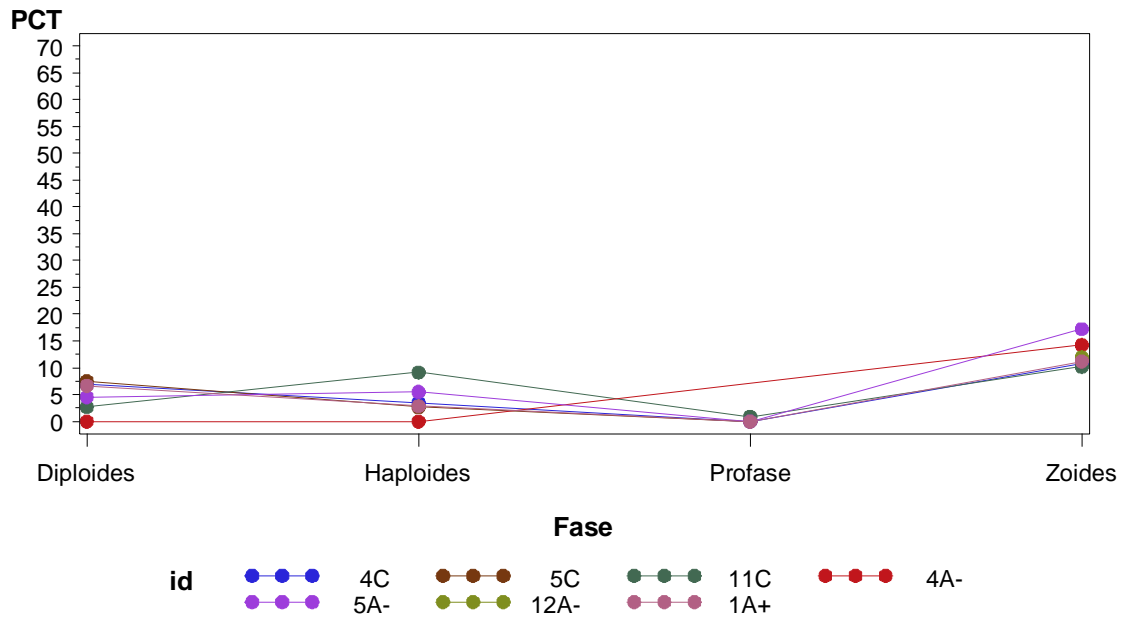
Cluster=2



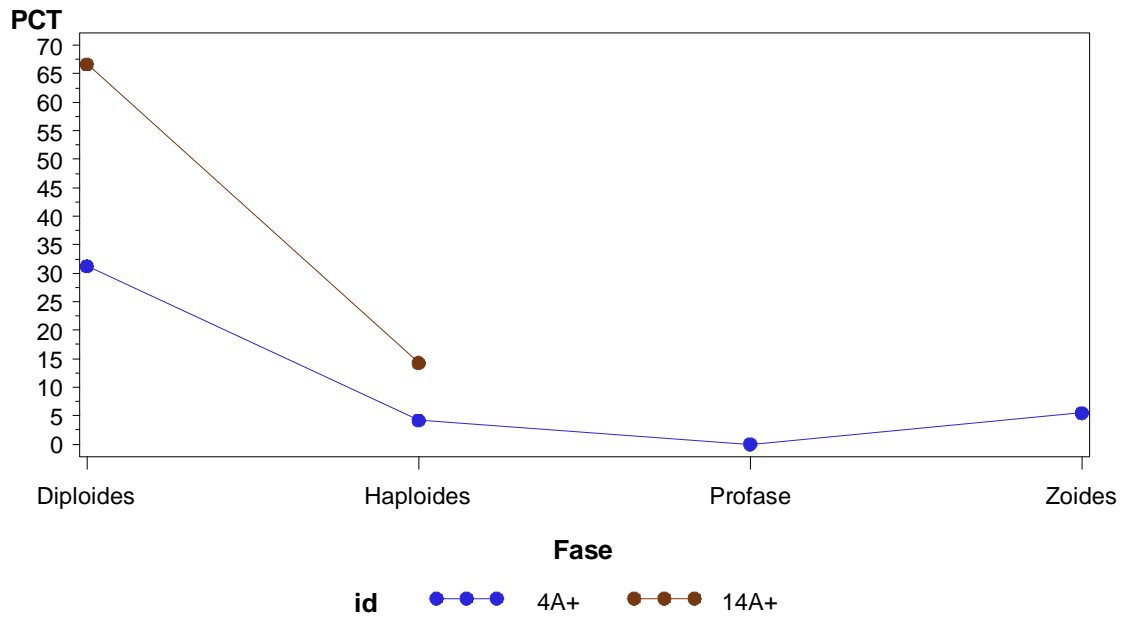
Cluster=3



Cluster=4



Cluster=5



2.4.2 Classificació en 6 grups

Clúster				
CLUSTER	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
1	3	7.32	3	7.32
2	6	14.63	9	21.95
3	2	4.88	11	26.83
4	7	17.07	18	43.90
5	15	36.59	33	80.49
6	8	19.51	41	100.00

Frequency Missing = 1

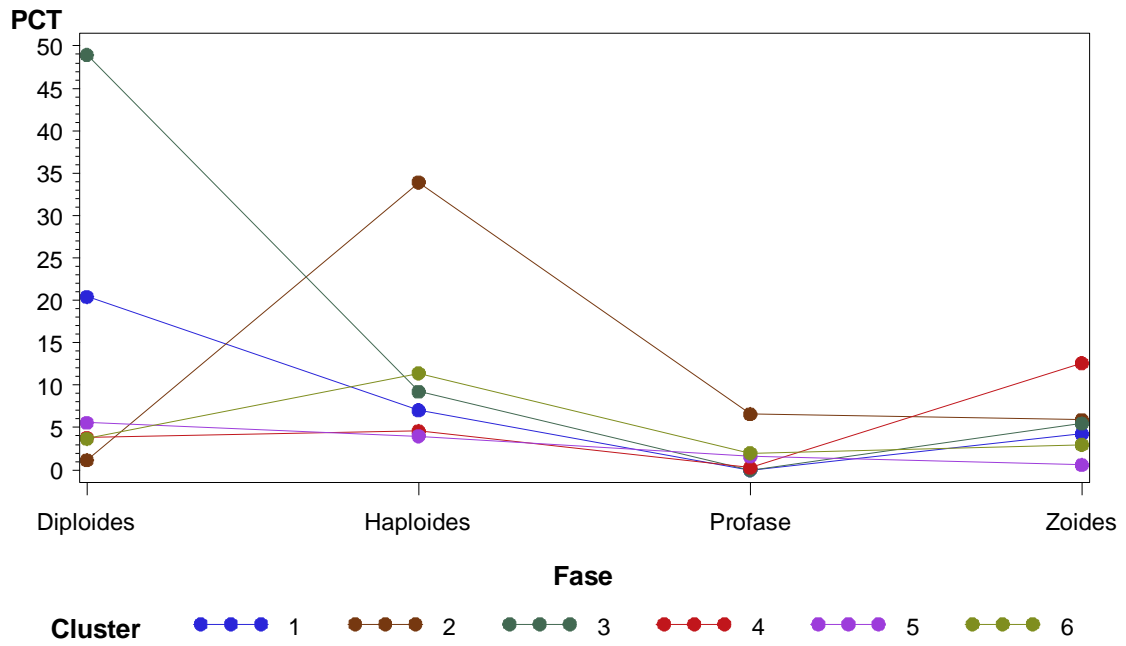
Distribució de les fraccions en els clústers:

Table of CLUSTER by fraction				
CLUSTER(Clúster)	Fraction			
Frequency Row Pct	Control	Anexina -	Anexina +	Total
1	0 0.00	0 0.00	3 100.00	3
2	1 16.67	3 50.00	2 33.33	6
3	0 0.00	0 0.00	2 100.00	2
4	3 42.86	3 42.86	1 14.29	7
5	7 46.67	5 33.33	3 20.00	15
6	3 37.50	2 25.00	3 37.50	8
Total	14	13	14	41
Frequency Missing = 1				

Descripció dels clústers:

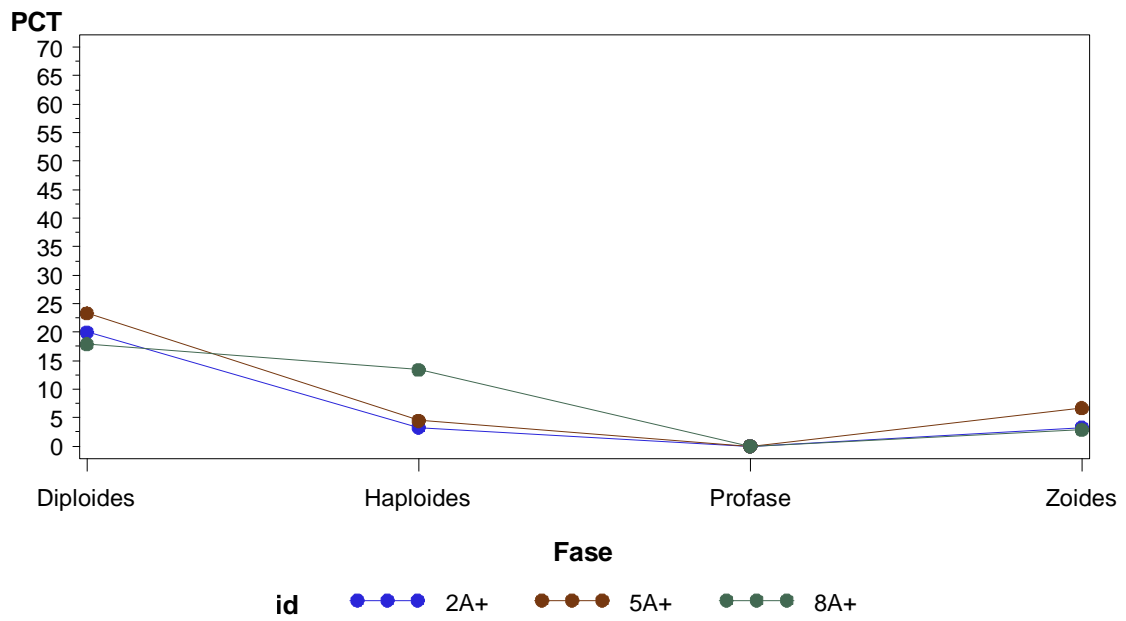
Analysis Variable : PCT							
Fase	Cluster	N	N Miss	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
Diploides	1	3	0	20.41	2.74	17.90	23.33
	2	6	0	1.16	1.62	0.00	4.36
	3	2	0	48.96	25.04	31.25	66.67
	4	6	1	3.80	2.75	0.00	6.95
	5	15	0	5.57	4.40	0.00	14.00
	6	8	0	3.68	2.65	0.00	9.26
Haploides	1	3	0	7.05	5.53	3.28	13.40
	2	6	0	33.92	13.86	22.81	60.26
	3	2	0	9.24	7.14	4.19	14.29
	4	6	1	4.59	3.17	0.00	9.15
	5	15	0	3.99	2.16	0.00	7.58
	6	8	0	11.41	5.05	7.58	22.58
Profase	1	3	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	2	6	0	6.60	13.33	0.00	33.33
	3	1	1	0.00	.	0.00	0.00
	4	5	2	0.27	0.40	0.00	0.88
	5	14	1	1.62	2.28	0.00	7.96
	6	7	1	1.99	2.58	0.00	6.67
Zoides	1	3	0	4.28	2.10	2.88	6.70
	2	3	3	5.92	1.52	4.48	7.50
	3	1	1	5.48	.	5.48	5.48
	4	6	1	12.61	2.68	10.20	17.24
	5	13	2	0.61	1.45	0.00	5.26
	6	8	0	2.98	2.07	0.00	6.67
Sertoli	1	1	2	25.00	.	25.00	25.00
	2	3	3	0.00	0.00	0.00	0.00
	3	0	2
	4	3	4	0.00	0.00	0.00	0.00
	5	14	1	3.33	4.44	0.00	14.29
	6	5	3	0.00	0.00	0.00	0.00

Gràfic de perfils:

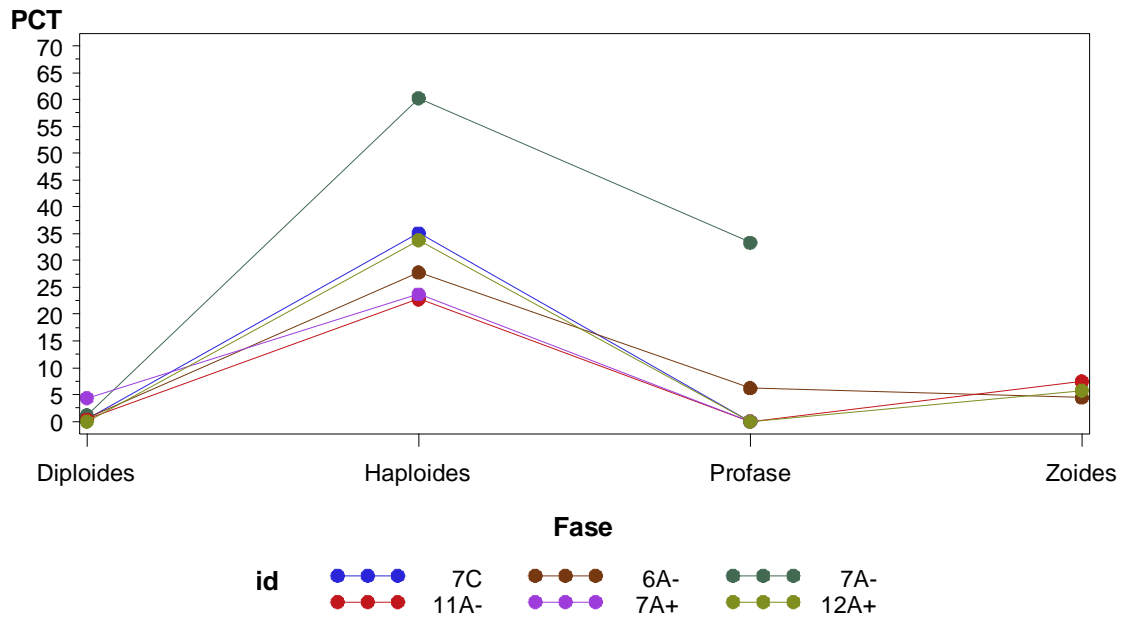


Perfils individuals:

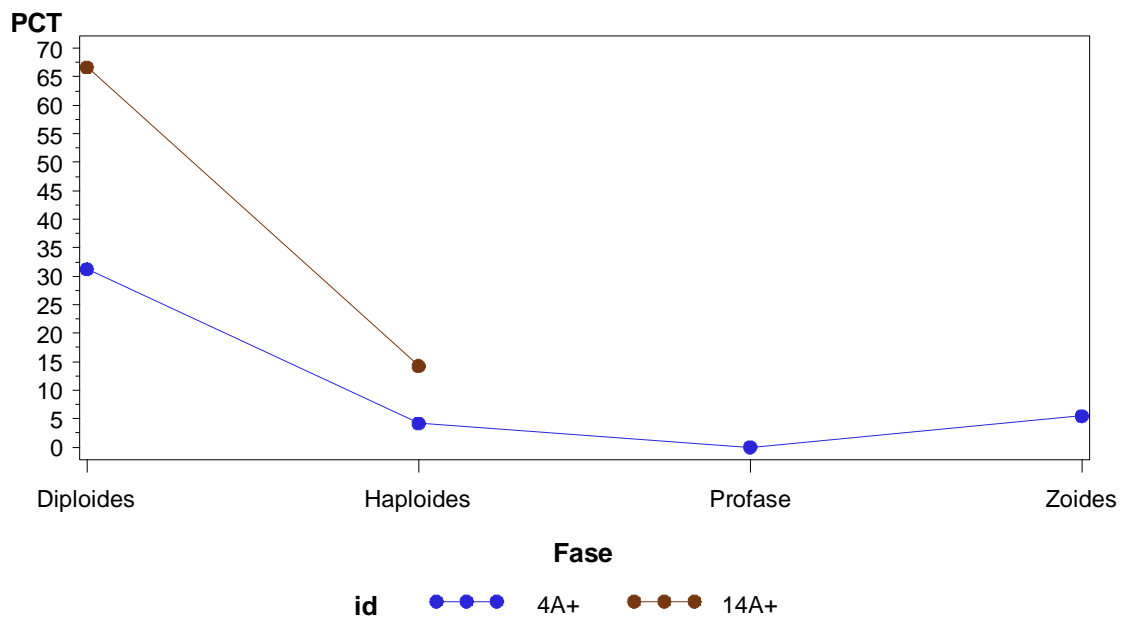
Cluster=1



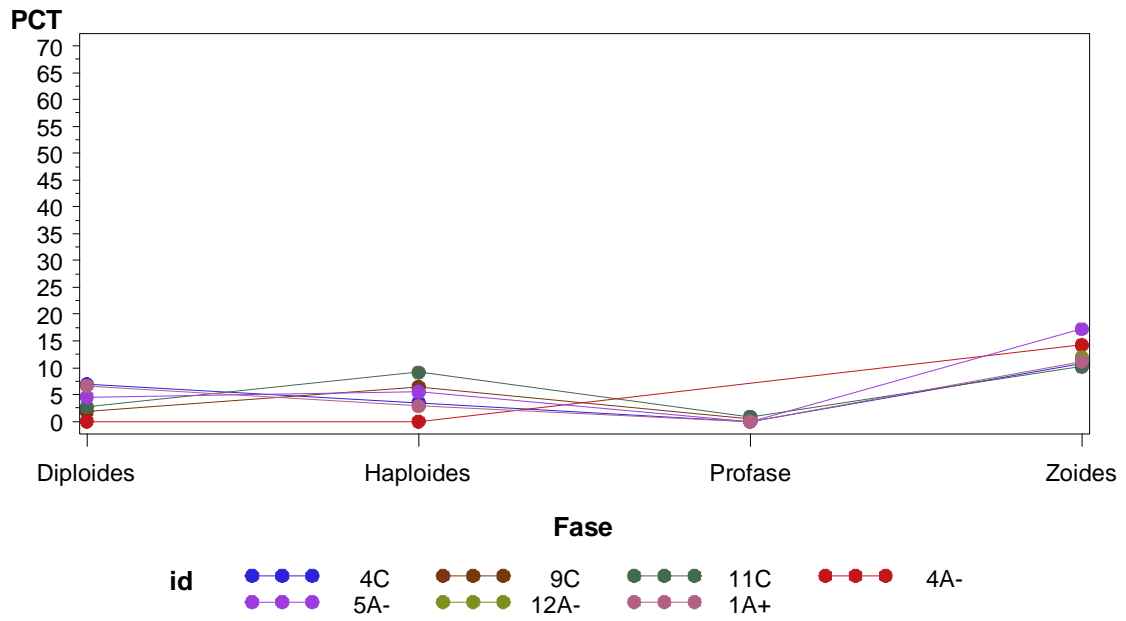
Cluster=2



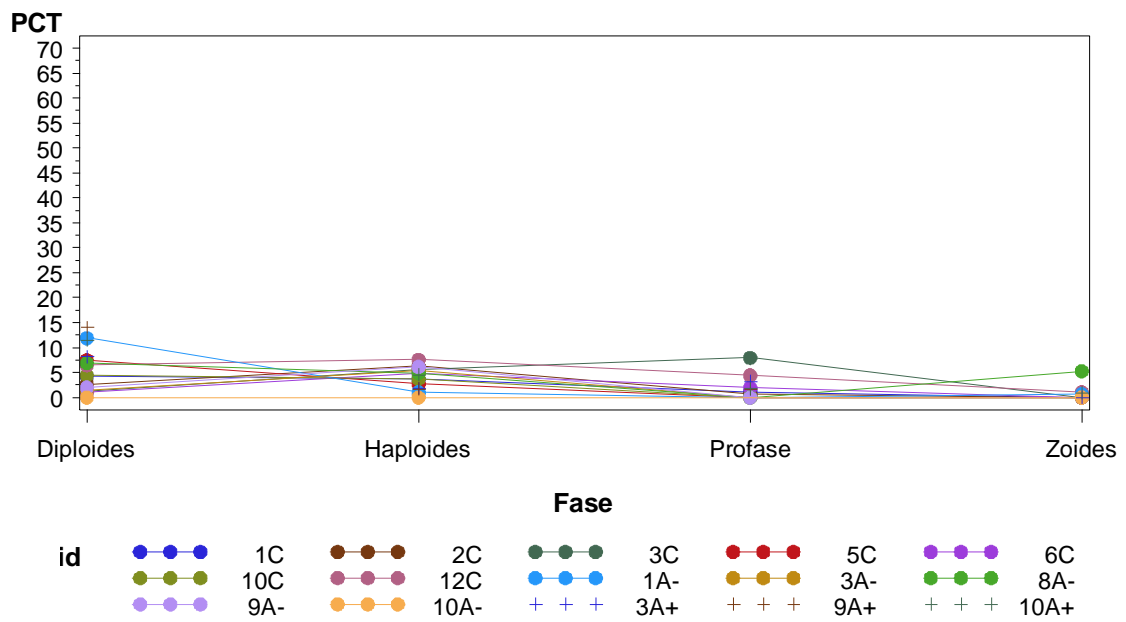
Cluster=3



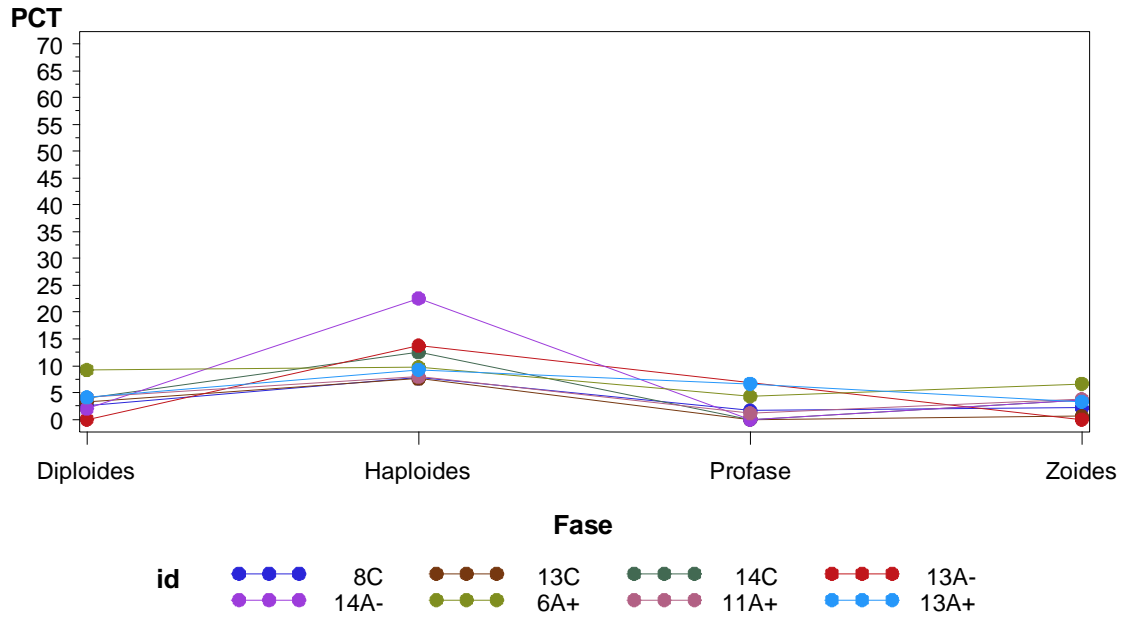
Cluster=4



Cluster=5



Cluster=6



2.5 Anàlisi de clústers segons la fracció

En aquest apartat s'ha realitzat un anàlisi de clústers per a cadascuna de les fraccions per separat (control, Anexina- i Anexina+).

fracció=Control			fracció=Anexina -			fracció=Anexina +		
Cluster			Cluster			Cluster		
	Frequency	Cumulative Frequency		Frequency	Cumulative Frequency		Frequency	Cumulative Frequency
1	10	10	1	6	6	1	9	9
2	3	13	2	4	10	2	3	12
3	1	14	3	3	13	3	2	14

Observem que el número d'individus per clúster no és el mateix en cada fracció, és a dir, pacients amb un perfil similar en la fracció control no tenen el mateix perfil en les fraccions d'Anexina.

Fracció=Control

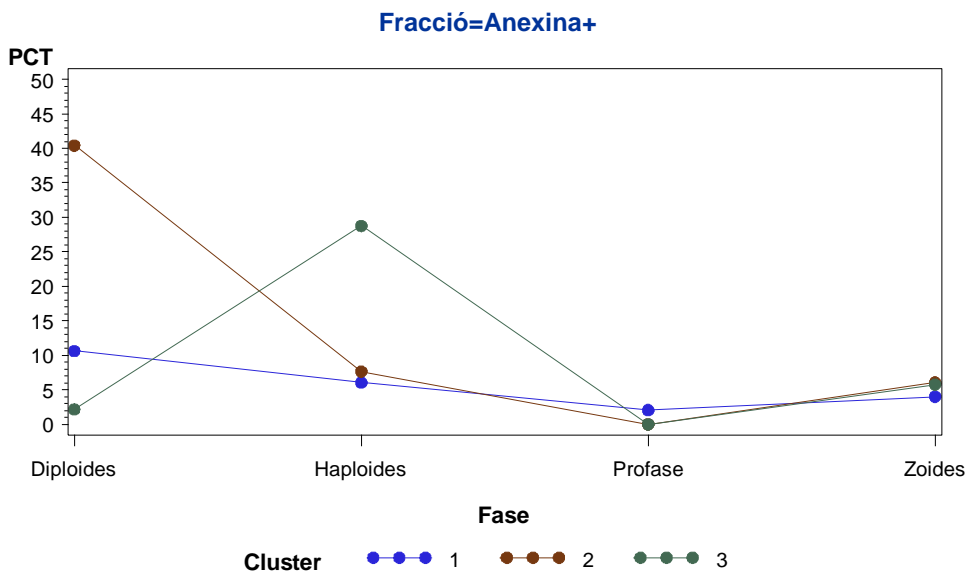
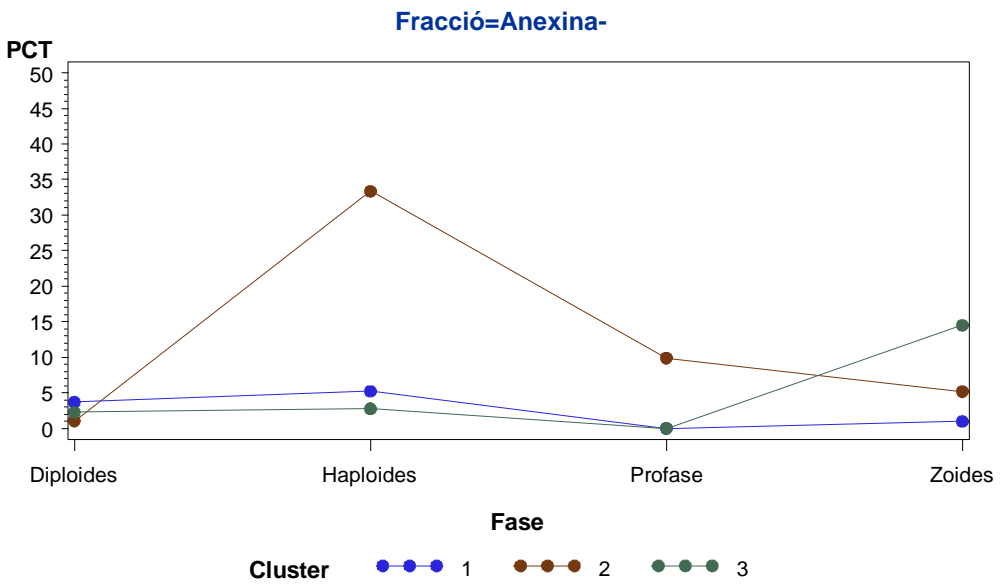
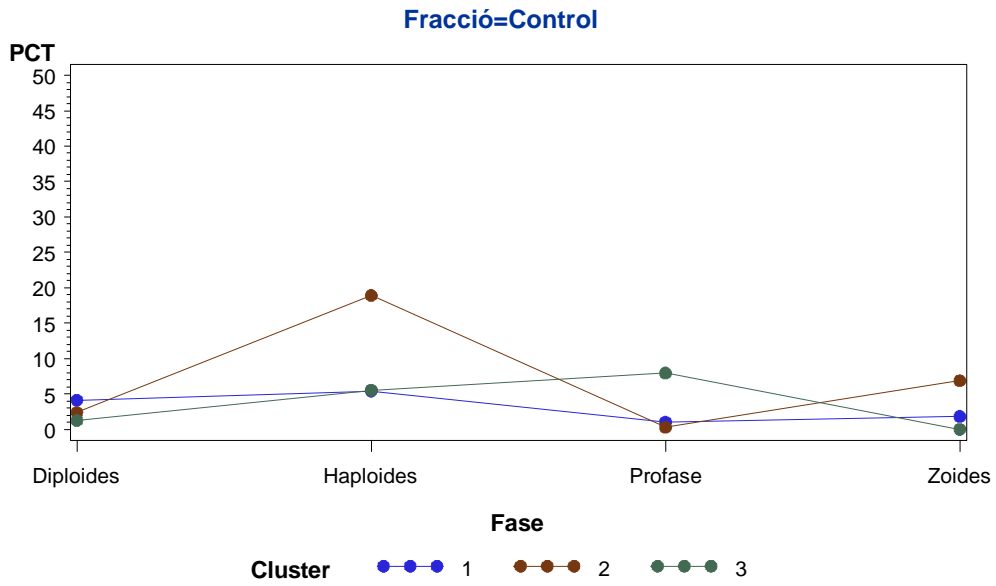
Analysis Variable : PCT							
Fase	Cluster	N	N Miss	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
Diploides	1	10	0	4.12	2.22	1.08	7.51
	2	3	0	2.38	1.86	0.37	4.04
	3	1	0	1.27	.	1.27	1.27
Haploides	1	10	0	5.42	1.93	2.69	7.73
	2	3	0	18.93	14.11	9.15	35.11
	3	1	0	5.54	.	5.54	5.54
Profase	1	10	0	1.04	1.40	0.00	4.44
	2	3	0	0.29	0.51	0.00	0.88
	3	1	0	7.96	.	7.96	7.96
Sertoli	1	10	0	3.27	5.27	0.00	14.29
	2	1	2	0.00	.	0.00	0.00
	3	1	0	3.33	.	3.33	3.33
Zoides	1	8	2	1.83	3.67	0.00	10.71
	2	2	1	6.89	4.69	3.57	10.20
	3	1	0	0.00	.	0.00	0.00

Fracció=Anexina -

Analysis Variable : PCT							
Fase	Cluster	N	N Miss	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
Diploides	1	6	0	3.71	4.76	0.00	11.90
	2	4	0	1.05	0.71	0.40	2.00
	3	2	1	2.27	3.21	0.00	4.55
Haploides	1	6	0	5.23	4.87	0.00	13.79
	2	4	0	33.36	18.09	22.58	60.26
	3	2	1	2.78	3.93	0.00	5.56
Profase	1	4	2	0.00	0.00	0.00	0.00
	2	4	0	9.90	15.90	0.00	33.33
	3	1	2	0.00	.	0.00	0.00
Sertoli	1	4	2	0.50	1.00	0.00	2.00
	2	3	1	0.00	0.00	0.00	0.00
	3	0	3
Zoides	1	6	0	0.99	2.11	0.00	5.26
	2	3	1	5.18	2.06	3.57	7.50
	3	3	0	14.51	2.63	12.00	17.24

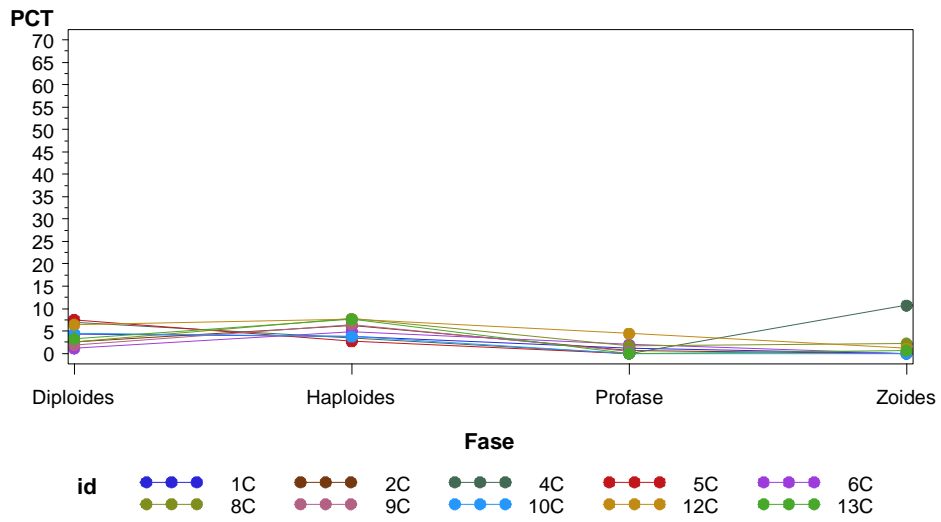
Fracció=Anexina +

Analysis Variable : PCT							
Fase	Cluster	N	N Miss	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
Diploides	1	9	0	10.63	5.72	4.08	20.00
	2	3	0	40.42	23.08	23.33	66.67
	3	2	0	2.18	3.08	0.00	4.36
Haploides	1	9	0	6.06	4.18	1.70	13.40
	2	3	0	7.65	5.75	4.19	14.29
	3	2	0	28.76	7.13	23.72	33.80
Profase	1	9	0	2.07	2.27	0.00	6.67
	2	2	1	0.00	0.00	0.00	0.00
	3	2	0	0.00	0.00	0.00	0.00
Sertoli	1	7	2	4.80	9.16	0.00	25.00
	2	0	3
	3	0	2
Zoides	1	8	1	4.00	3.53	0.00	11.21
	2	2	1	6.09	0.86	5.48	6.70
	3	1	1	5.77	.	5.77	5.77

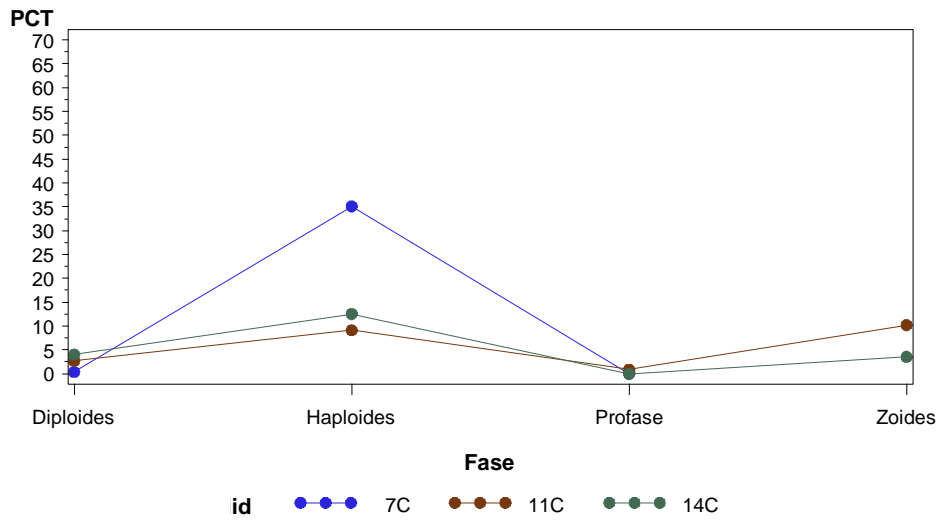


Perfils individuals:

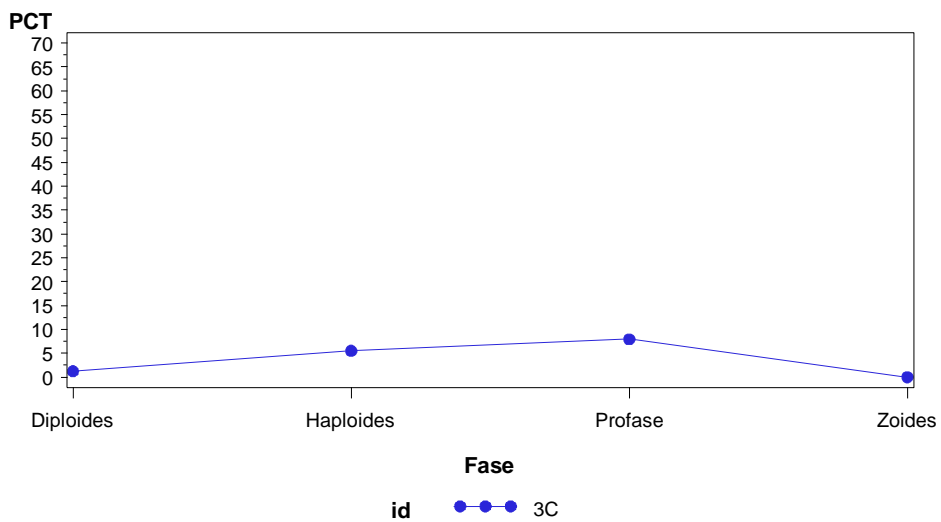
Control Cluster=1



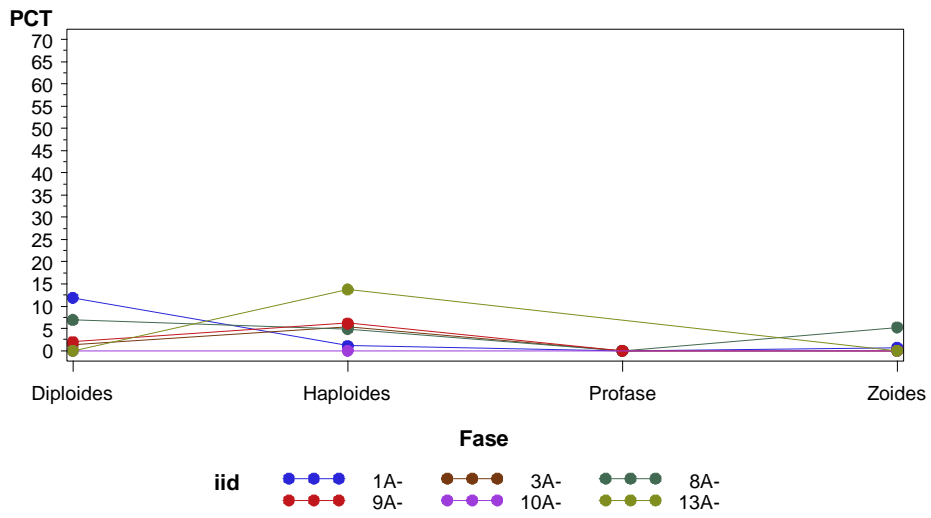
Control Cluster=2



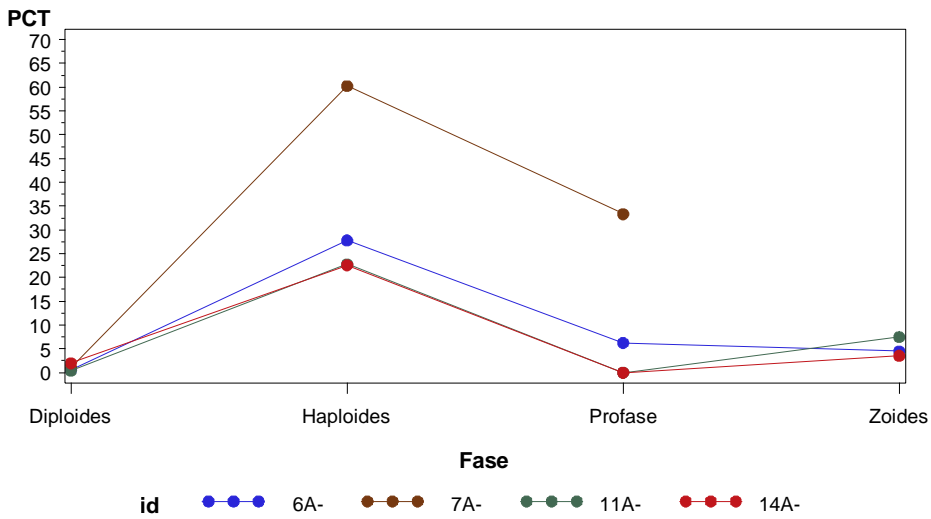
Control Cluster=3



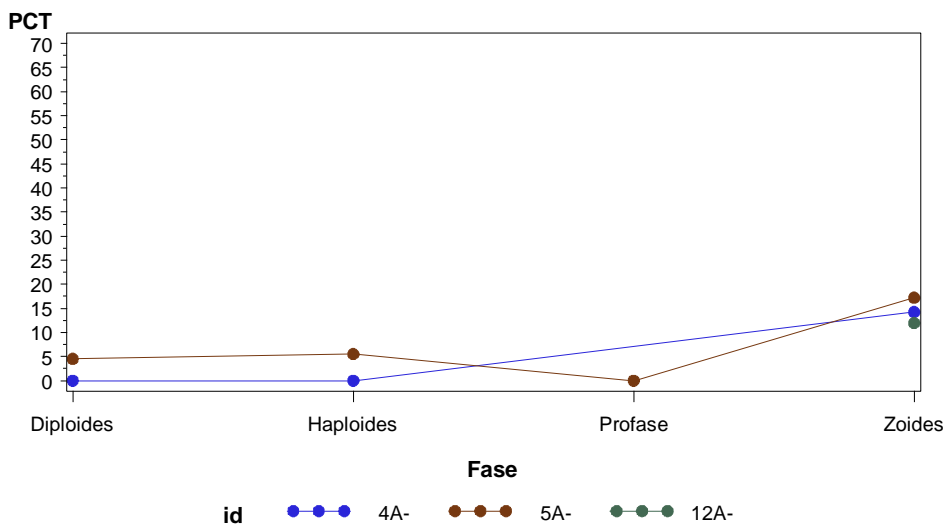
Anexina - Cluster=1



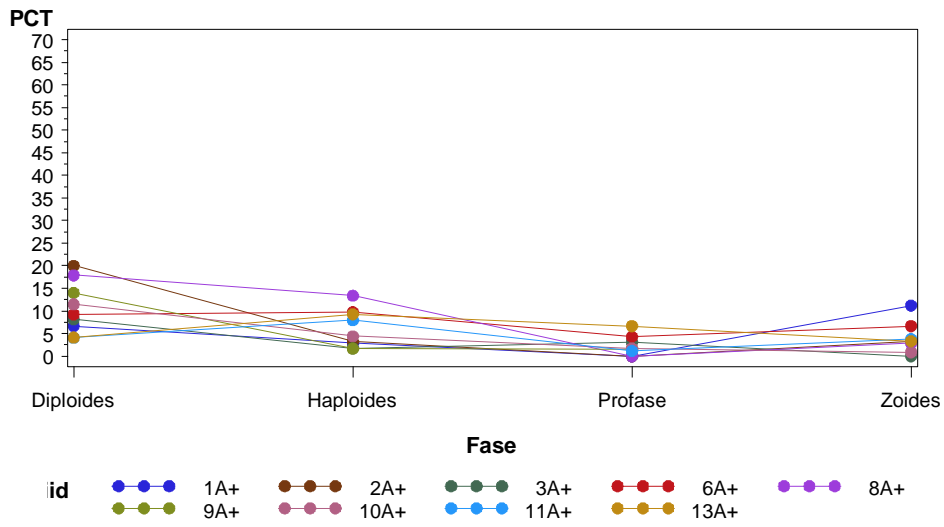
Anexina - Cluster=2



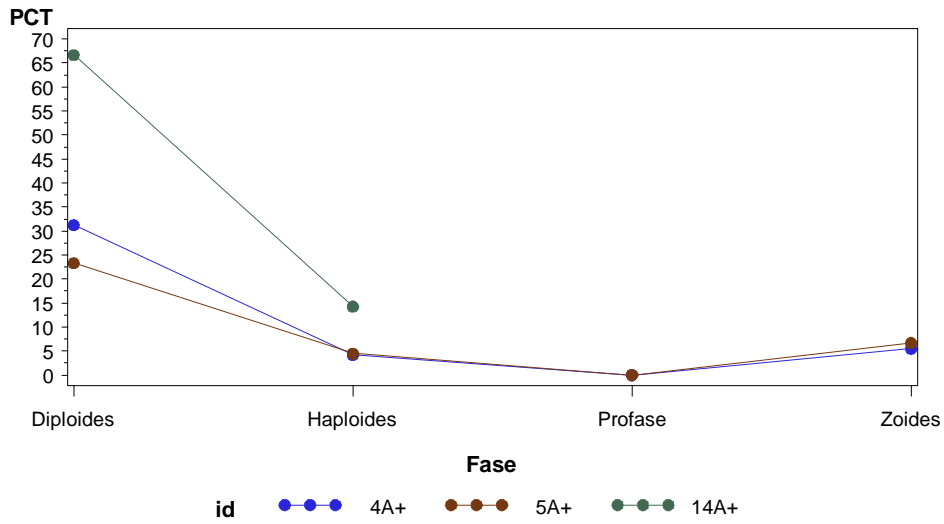
Anexina - Cluster=3



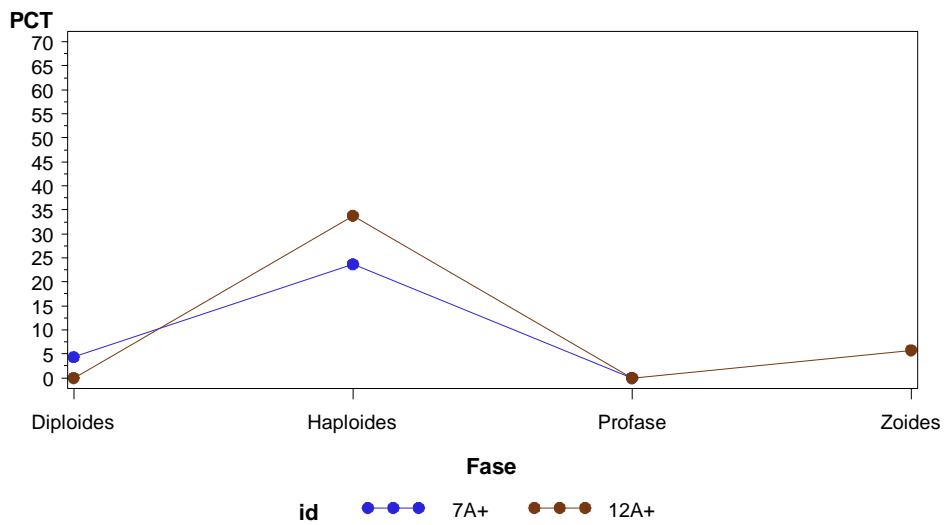
Anexina + Cluster=1



Anexina + Cluster=2



Anexina + Cluster=3



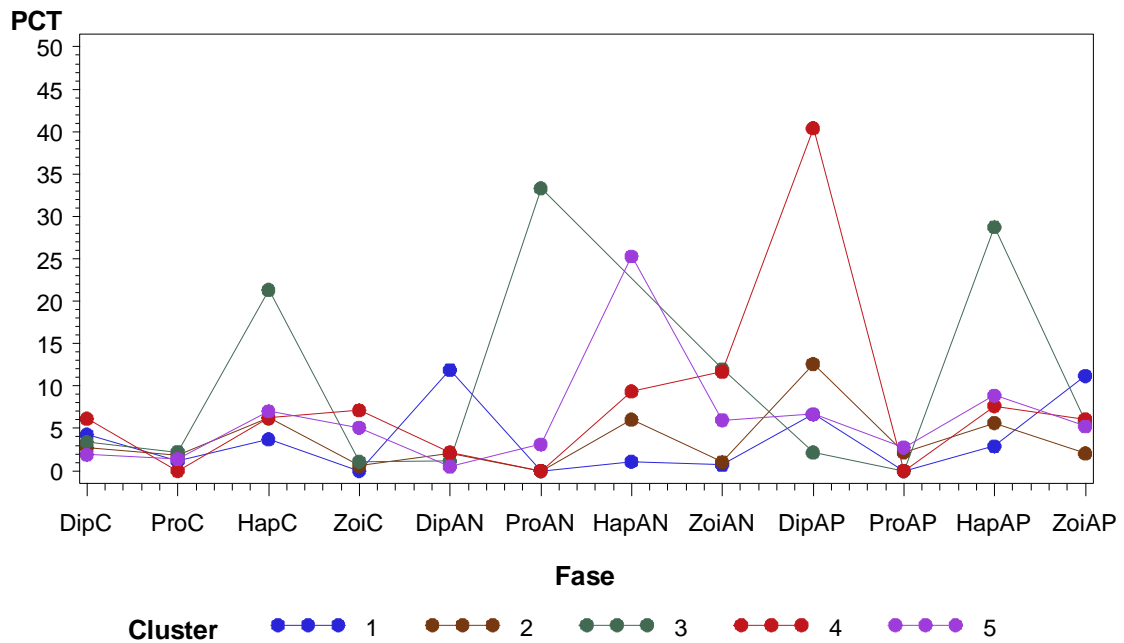
2.6 Anàlisi de clústers individual

2.6.1 Anàlisi amb tots els pacients

Clúster		
CLUSTER	Frequency	Cumulative Frequency
1	1	1
2	6	7
3	2	9
4	3	12
5	2	14

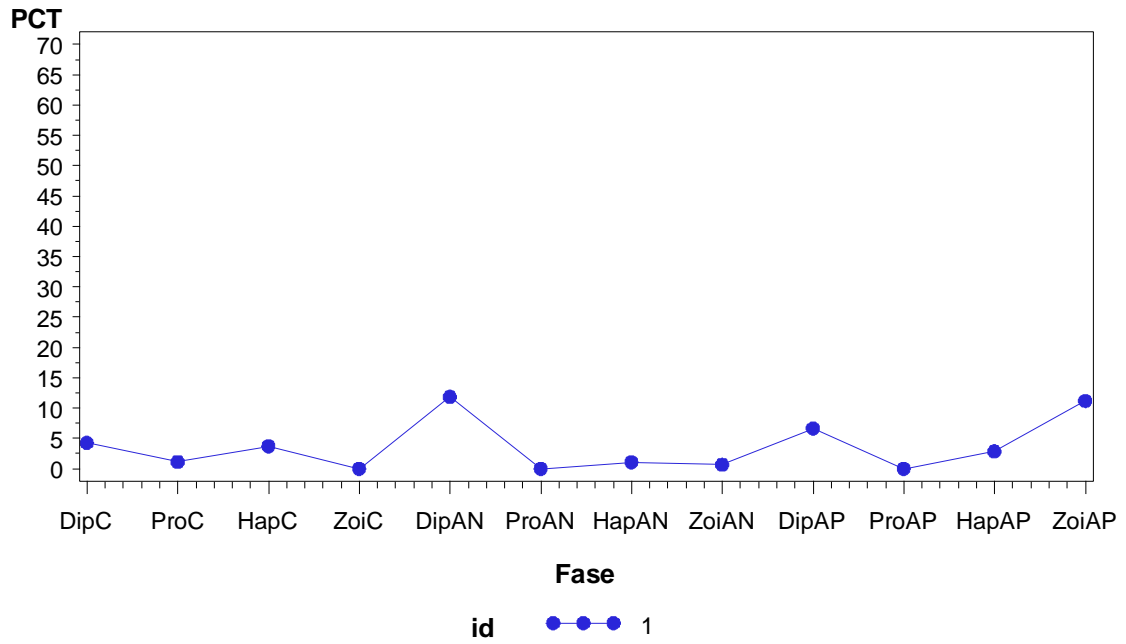
Clúster	Variable	N	Miss	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
1	DipC	1	0	4.30	.	4.30	4.30
	DipAN	1	0	11.90	.	11.90	11.90
	DipAP	1	0	6.67	.	6.67	6.67
	ProC	1	0	1.14	.	1.14	1.14
	ProAN	1	0	0.00	.	0.00	0.00
	ProAP	1	0	0.00	.	0.00	0.00
	HapC	1	0	3.73	.	3.73	3.73
	HapAN	1	0	1.09	.	1.09	1.09
	HapAP	1	0	2.90	.	2.90	2.90
	ZoiC	1	0	0.00	.	0.00	0.00
	ZoiAN	1	0	0.70	.	0.70	0.70
	ZoiAP	1	0	11.21	.	11.21	11.21
2	DipC	6	0	2.70	1.11	1.27	4.48
	DipAN	5	1	2.07	2.86	0.00	6.94
	DipAP	6	0	12.62	5.96	4.15	20.00
	ProC	6	0	1.80	3.08	0.00	7.96
	ProAN	3	3	0.00	0.00	0.00	0.00
	ProAP	6	0	2.19	2.49	0.00	6.67
	HapC	6	0	6.22	1.47	3.75	7.73
	HapAN	5	1	6.05	4.96	0.00	13.79
	HapAP	6	0	5.64	4.71	1.70	13.40
	ZoiC	5	1	0.57	0.96	0.00	2.22
	ZoiAN	5	1	1.05	2.35	0.00	5.26
	ZoiAP	5	1	2.07	1.53	0.00	3.31
3	DipC	2	0	3.41	4.30	0.37	6.45
	DipAN	1	1	1.16	.	1.16	1.16
	DipAP	2	0	2.18	3.08	0.00	4.36
	ProC	2	0	2.22	3.14	0.00	4.44
	ProAN	1	1	33.33	.	33.33	33.33
	ProAP	2	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	HapC	2	0	21.34	19.47	7.58	35.11
	HapAN	1	1	60.26	.	60.26	60.26
	HapAP	2	0	28.76	7.13	23.72	33.80
	ZoiC	1	1	1.10	.	1.10	1.10
	ZoiAN	1	1	12.00	.	12.00	12.00
	ZoiAP	1	1	5.77	.	5.77	5.77

4	DipC	3	0	6.17	1.87	4.04	7.51
	DipAN	3	0	2.18	2.28	0.00	4.55
	DipAP	3	0	40.42	23.08	23.33	66.67
	ProC	3	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	ProAN	2	1	0.00	0.00	0.00	0.00
	ProAP	2	1	0.00	0.00	0.00	0.00
	HapC	3	0	6.24	5.47	2.69	12.55
	HapAN	3	0	9.38	11.77	0.00	22.58
	HapAP	3	0	7.65	5.75	4.19	14.29
	ZoiC	2	1	7.14	5.05	3.57	10.71
	ZoiAN	3	0	11.70	7.19	3.57	17.24
	ZoiAP	2	1	6.09	0.86	5.48	6.70
5	DipC	2	0	1.91	1.16	1.08	2.73
	DipAN	2	0	0.52	0.17	0.40	0.64
	DipAP	2	0	6.67	3.66	4.08	9.26
	ProC	2	0	1.42	0.75	0.88	1.95
	ProAN	2	0	3.13	4.42	0.00	6.25
	ProAP	2	0	2.77	2.23	1.19	4.35
	HapC	2	0	7.03	2.99	4.92	9.15
	HapAN	2	0	25.30	3.53	22.81	27.80
	HapAP	2	0	8.88	1.27	7.98	9.77
	ZoiC	2	0	5.10	7.22	0.00	10.20
	ZoiAN	2	0	5.99	2.14	4.48	7.50
	ZoiAP	2	0	5.24	2.01	3.82	6.67

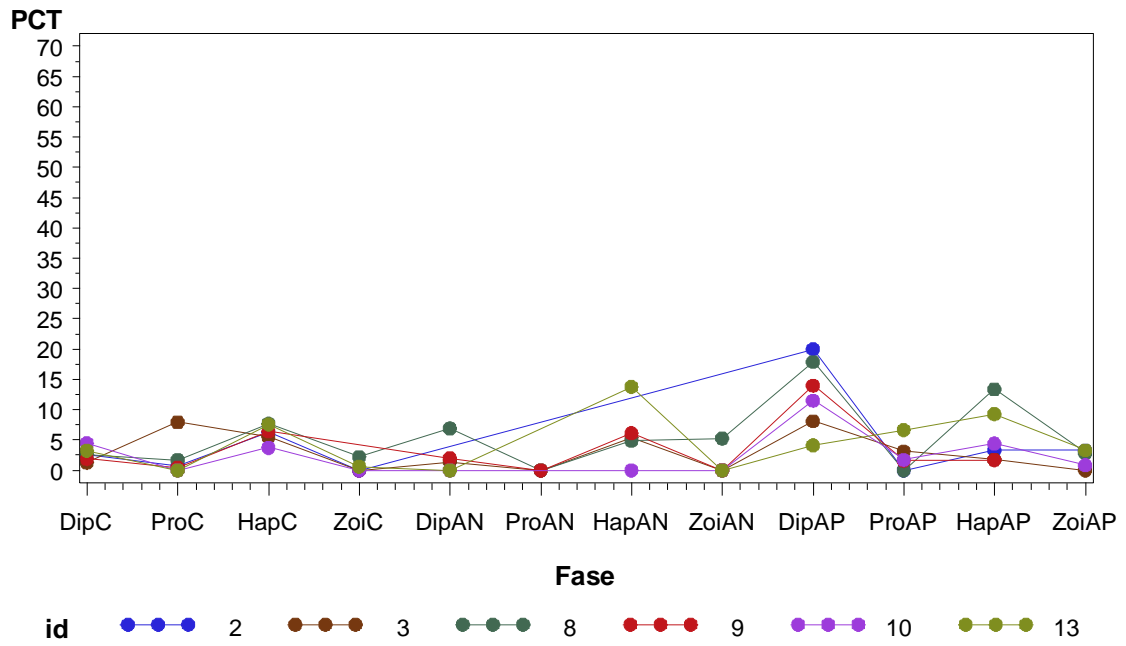


Perfils individuals:

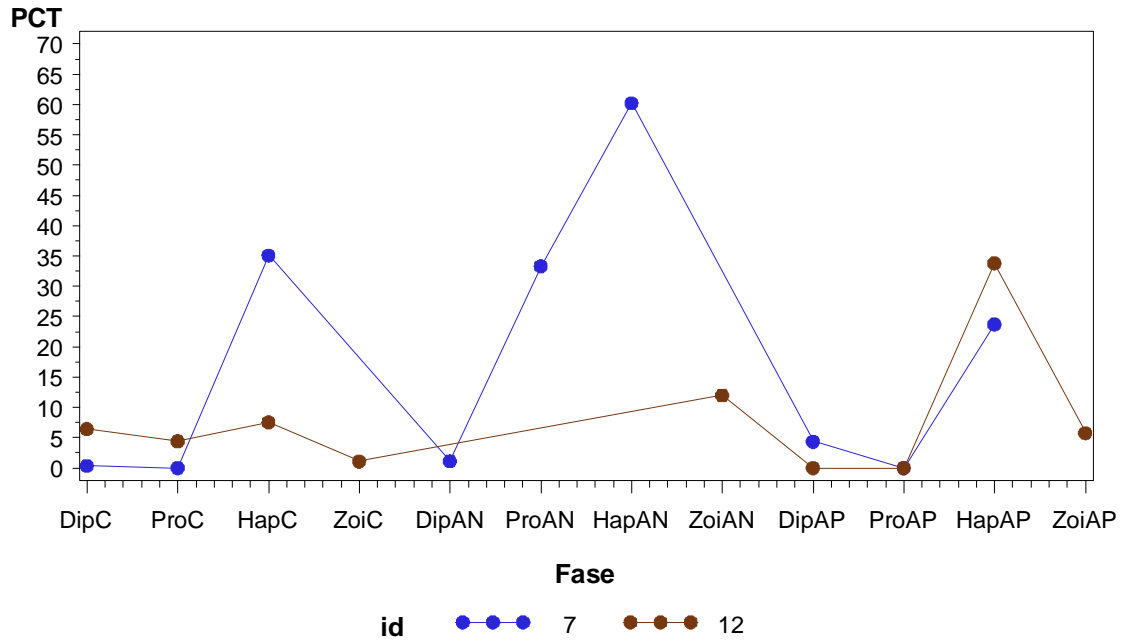
Clúster 1



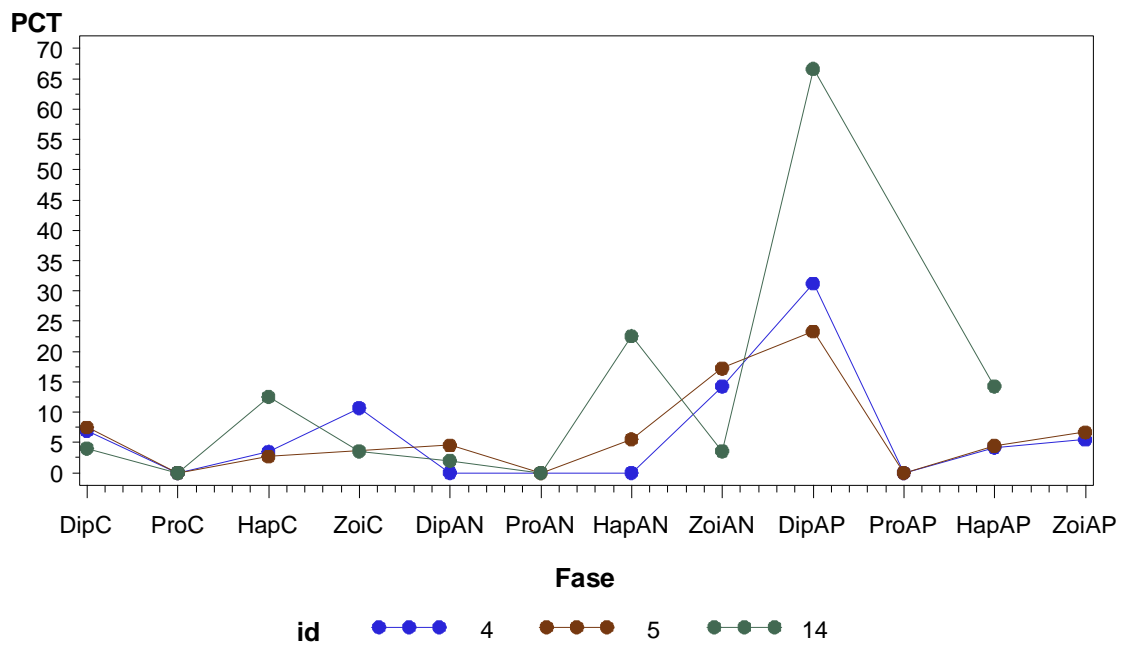
Clúster 2



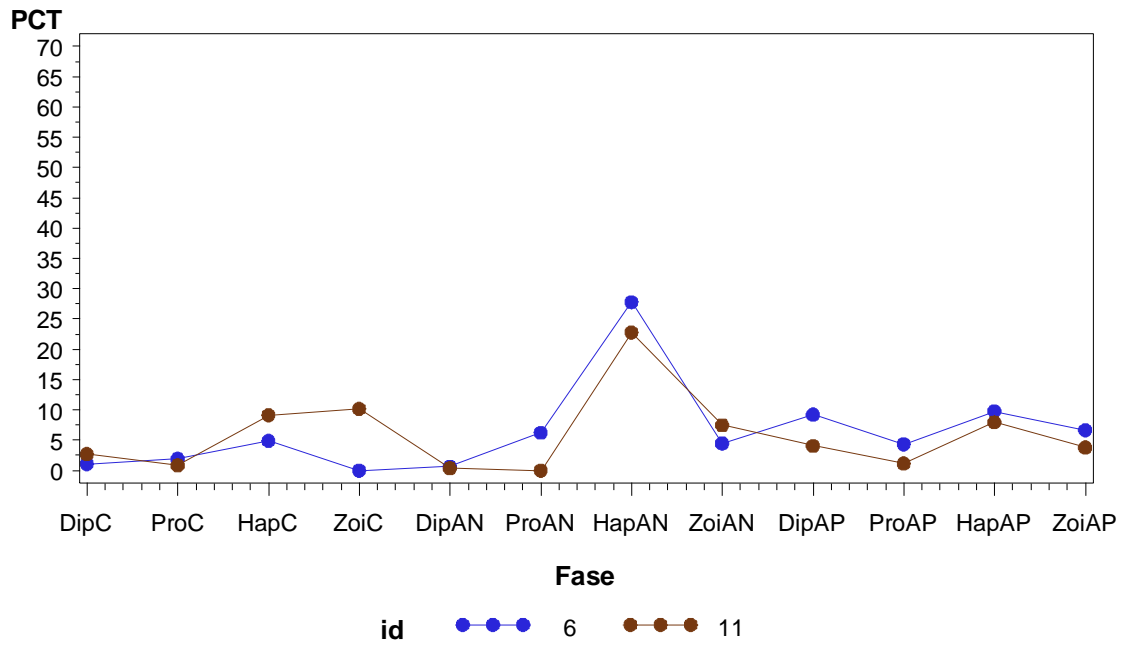
Clúster 3



Clúster 4



Clúster 5

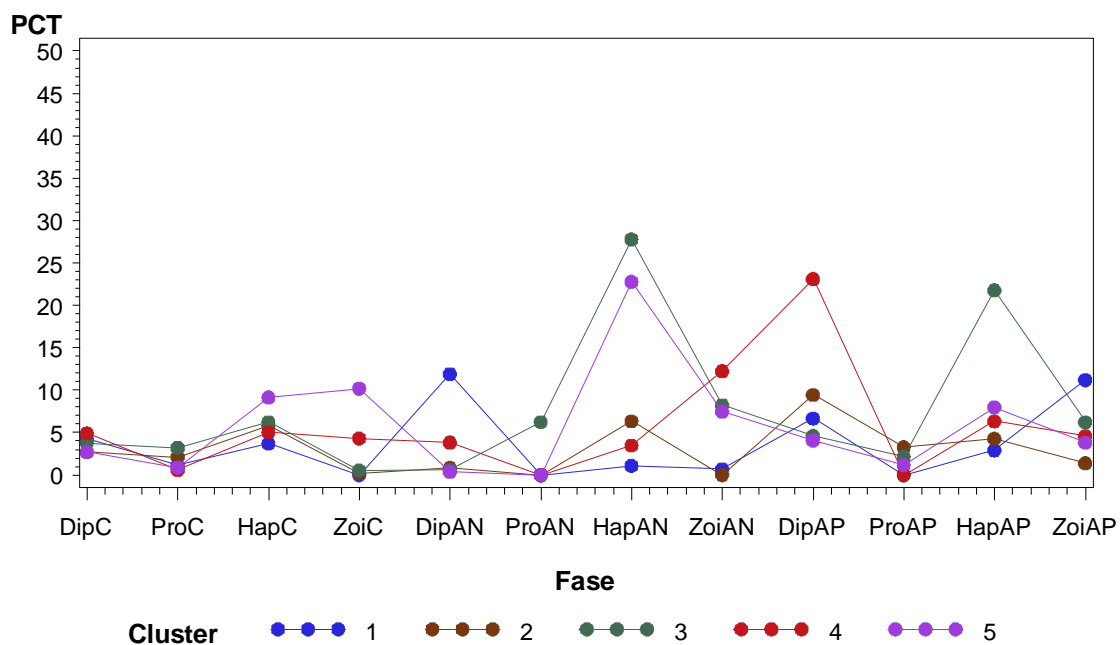


2.6.2 Anàlisi sense els pacients 7 i 14

Cluster		
CLUSTER	Frequency	Cumulative Frequency
1	1	1
2	4	5
3	2	7
4	4	11
5	1	12

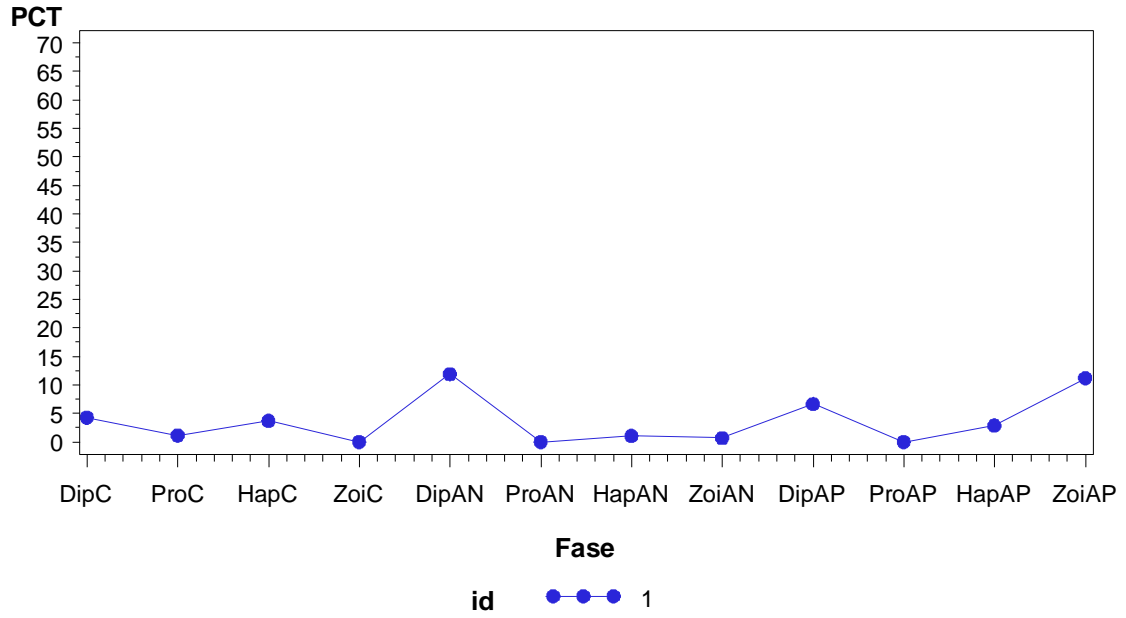
Cluster	Variable	N	Miss	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
1	DipC	1	0	4.30	.	4.30	4.30
	DipAN	1	0	11.90	.	11.90	11.90
	DipAP	1	0	6.67	.	6.67	6.67
	ProC	1	0	1.14	.	1.14	1.14
	ProAN	1	0	0.00	.	0.00	0.00
	ProAP	1	0	0.00	.	0.00	0.00
	HapC	1	0	3.73	.	3.73	3.73
	HapAN	1	0	1.09	.	1.09	1.09
	HapAP	1	0	2.90	.	2.90	2.90
	ZoiC	1	0	0.00	.	0.00	0.00
	ZoiAN	1	0	0.70	.	0.70	0.70
	ZoiAP	1	0	11.21	.	11.21	11.21
2	DipC	4	0	2.73	1.43	1.27	4.48
	DipAN	4	0	0.85	1.01	0.00	2.00
	DipAP	4	0	9.45	4.27	4.15	14.00
	ProC	4	0	2.10	3.91	0.00	7.96
	ProAN	2	2	0.00	0.00	0.00	0.00
	ProAP	4	0	3.28	2.36	1.59	6.67
	HapC	4	0	5.83	1.62	3.75	7.58
	HapAN	4	0	6.34	5.67	0.00	13.79
	HapAP	4	0	4.30	3.56	1.70	9.29
	ZoiC	3	1	0.21	0.37	0.00	0.63
	ZoiAN	4	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	ZoiAP	3	1	1.39	1.72	0.00	3.31
3	DipC	2	0	3.77	3.80	1.08	6.45
	DipAN	1	1	0.64	.	0.64	0.64
	DipAP	2	0	4.63	6.55	0.00	9.26
	ProC	2	0	3.20	1.77	1.95	4.44
	ProAN	1	1	6.25	.	6.25	6.25
	ProAP	2	0	2.17	3.07	0.00	4.35
	HapC	2	0	6.25	1.88	4.92	7.58
	HapAN	1	1	27.80	.	27.80	27.80
	HapAP	2	0	21.79	16.99	9.77	33.80
	ZoiC	2	0	0.55	0.78	0.00	1.10
	ZoiAN	2	0	8.24	5.32	4.48	12.00
	ZoiAP	2	0	6.22	0.63	5.77	6.67

4	DipC	4	0	4.93	2.67	2.62	7.51
	DipAN	3	1	3.83	3.53	0.00	6.94
	DipAP	4	0	23.12	5.86	17.90	31.25
	ProC	4	0	0.60	0.81	0.00	1.71
	ProAN	2	2	0.00	0.00	0.00	0.00
	ProAP	4	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	HapC	4	0	5.04	2.36	2.69	7.73
	HapAN	3	1	3.48	3.03	0.00	5.56
	HapAP	4	0	6.33	4.74	3.28	13.40
	ZoiC	3	1	4.31	5.65	0.00	10.71
	ZoiAN	3	1	12.26	6.24	5.26	17.24
	ZoiAP	4	0	4.58	1.81	2.88	6.70
5	DipC	1	0	2.73	.	2.73	2.73
	DipAN	1	0	0.40	.	0.40	0.40
	DipAP	1	0	4.08	.	4.08	4.08
	ProC	1	0	0.88	.	0.88	0.88
	ProAN	1	0	0.00	.	0.00	0.00
	ProAP	1	0	1.19	.	1.19	1.19
	HapC	1	0	9.15	.	9.15	9.15
	HapAN	1	0	22.81	.	22.81	22.81
	HapAP	1	0	7.98	.	7.98	7.98
	ZoiC	1	0	10.20	.	10.20	10.20
	ZoiAN	1	0	7.50	.	7.50	7.50
	ZoiAP	1	0	3.82	.	3.82	3.82

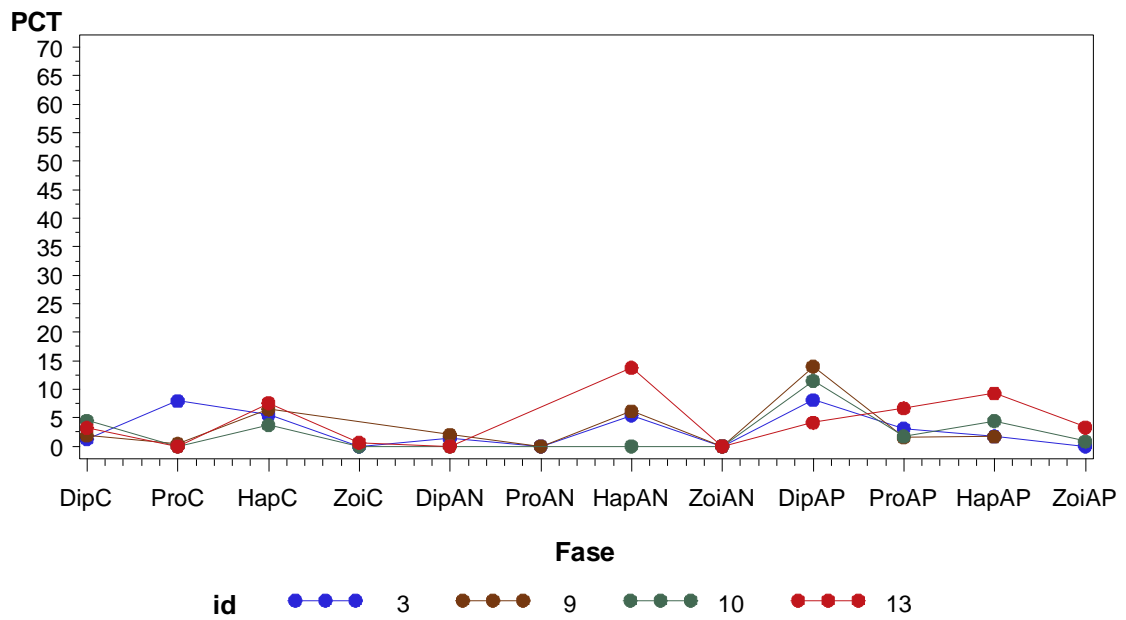


Perfils individuals:

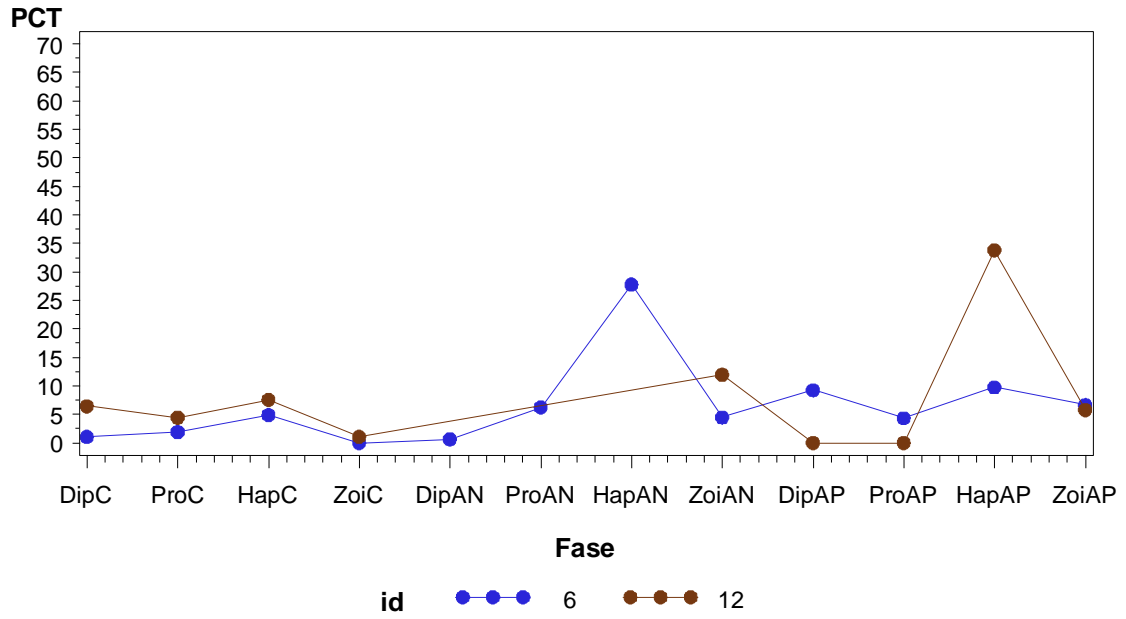
Cluster=1



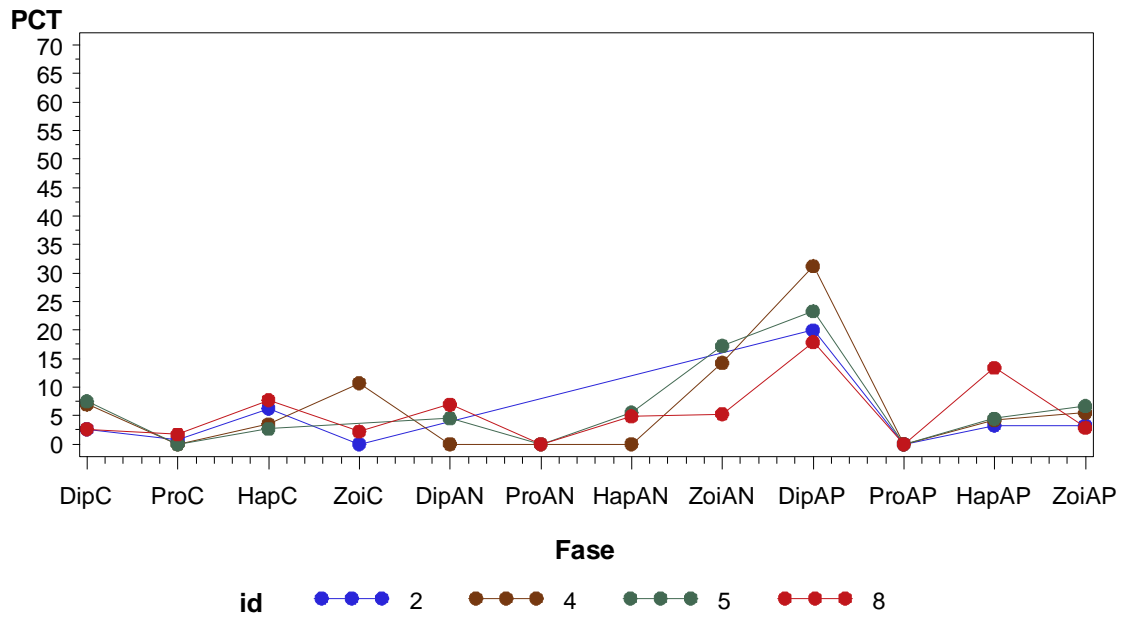
Cluster=2



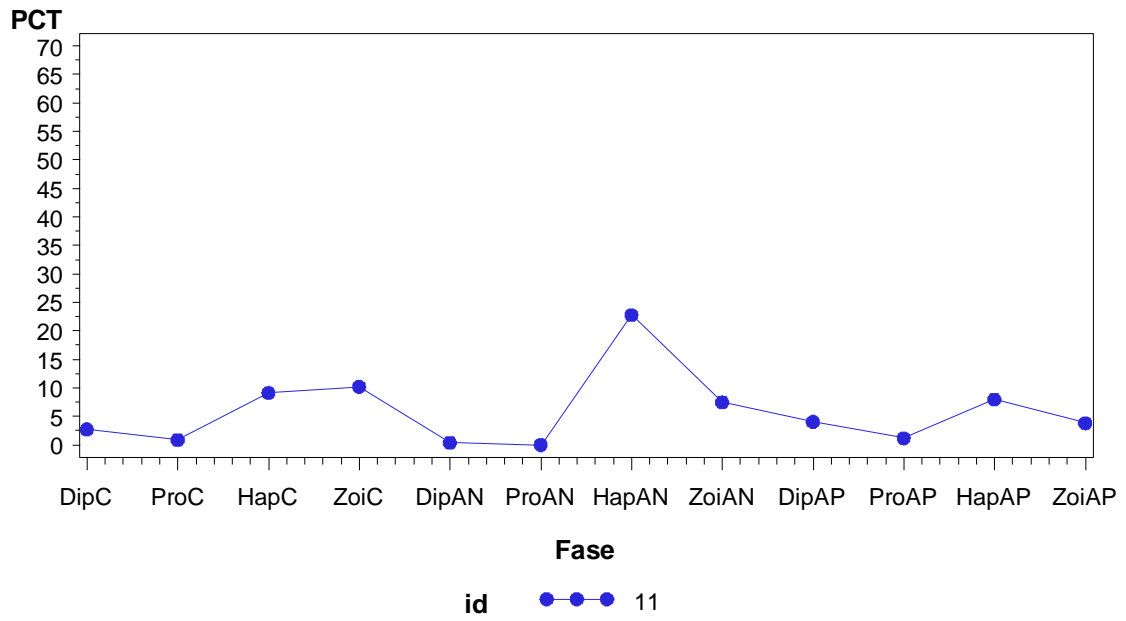
Cluster=3



Cluster=4



Cluster=5

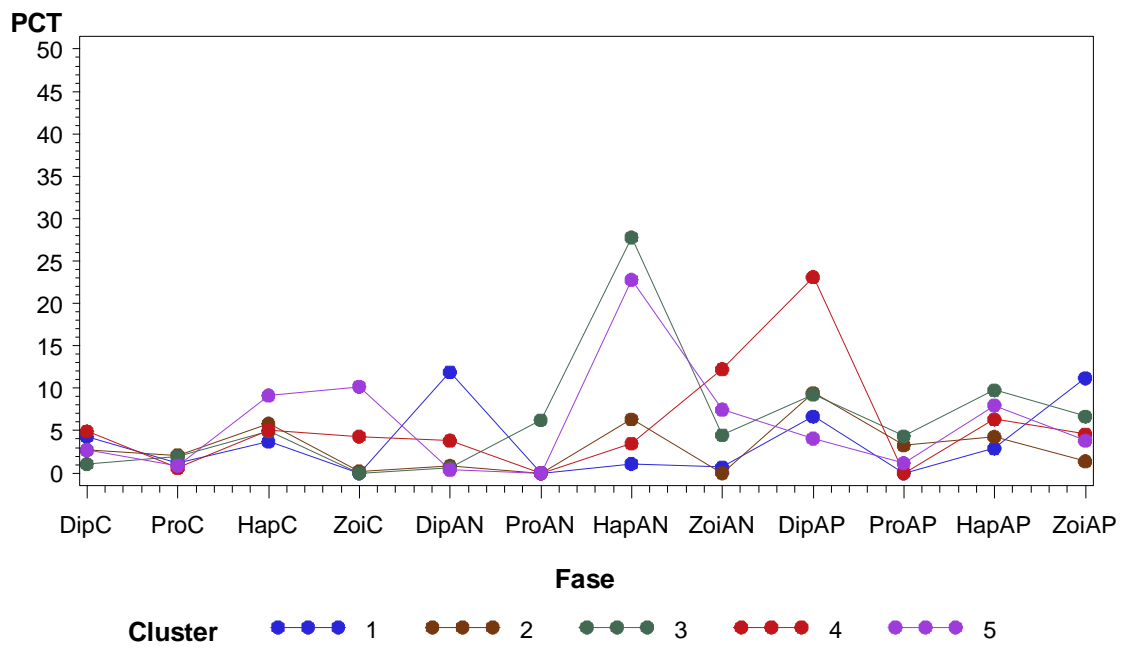


2.6.3 Anàlisi sense els pacients 7, 12 i 14

Clúster		
CLUSTER	Frequency	Cumulative Frequency
1	1	1
2	4	5
3	1	6
4	4	10
5	1	11

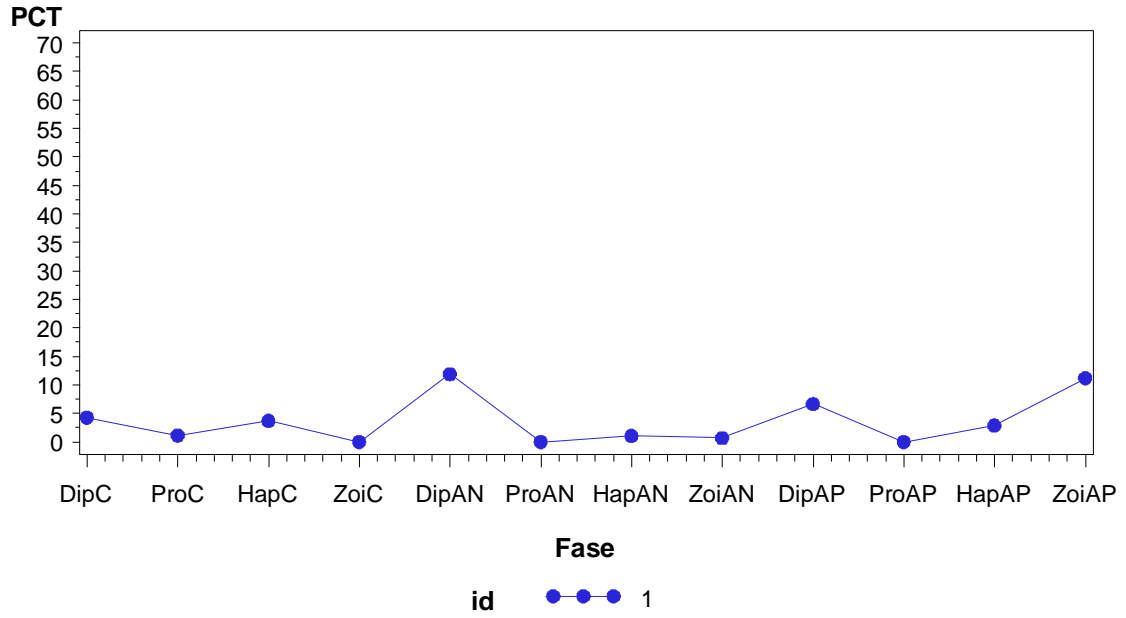
Cluster	Variable	N	N		Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
			Miss					
1	DipC	1	0		4.30	.	4.30	4.30
	DipAN	1	0		11.90	.	11.90	11.90
	DipAP	1	0		6.67	.	6.67	6.67
	ProC	1	0		1.14	.	1.14	1.14
	ProAN	1	0		0.00	.	0.00	0.00
	ProAP	1	0		0.00	.	0.00	0.00
	HapC	1	0		3.73	.	3.73	3.73
	HapAN	1	0		1.09	.	1.09	1.09
	HapAP	1	0		2.90	.	2.90	2.90
	ZoiC	1	0		0.00	.	0.00	0.00
	ZoiAN	1	0		0.70	.	0.70	0.70
	ZoiAP	1	0		11.21	.	11.21	11.21
2	DipC	4	0		2.73	1.43	1.27	4.48
	DipAN	4	0		0.85	1.01	0.00	2.00
	DipAP	4	0		9.45	4.27	4.15	14.00
	ProC	4	0		2.10	3.91	0.00	7.96
	ProAN	2	2		0.00	0.00	0.00	0.00
	ProAP	4	0		3.28	2.36	1.59	6.67
	HapC	4	0		5.83	1.62	3.75	7.58
	HapAN	4	0		6.34	5.67	0.00	13.79
	HapAP	4	0		4.30	3.56	1.70	9.29
	ZoiC	3	1		0.21	0.37	0.00	0.63
	ZoiAN	4	0		0.00	0.00	0.00	0.00
	ZoiAP	3	1		1.39	1.72	0.00	3.31
3	DipC	1	0		1.08	.	1.08	1.08
	DipAN	1	0		0.64	.	0.64	0.64
	DipAP	1	0		9.26	.	9.26	9.26
	ProC	1	0		1.95	.	1.95	1.95
	ProAN	1	0		6.25	.	6.25	6.25
	ProAP	1	0		4.35	.	4.35	4.35
	HapC	1	0		4.92	.	4.92	4.92
	HapAN	1	0		27.80	.	27.80	27.80
	HapAP	1	0		9.77	.	9.77	9.77
	ZoiC	1	0		0.00	.	0.00	0.00
	ZoiAN	1	0		4.48	.	4.48	4.48
	ZoiAP	1	0		6.67	.	6.67	6.67
4	DipC	4	0		4.93	2.67	2.62	7.51
	DipAN	3	1		3.83	3.53	0.00	6.94
	DipAP	4	0		23.12	5.86	17.90	31.25
	ProC	4	0		0.60	0.81	0.00	1.71
	ProAN	2	2		0.00	0.00	0.00	0.00
	ProAP	4	0		0.00	0.00	0.00	0.00
	HapC	4	0		5.04	2.36	2.69	7.73
	HapAN	3	1		3.48	3.03	0.00	5.56
	HapAP	4	0		6.33	4.74	3.28	13.40
	ZoiC	3	1		4.31	5.65	0.00	10.71
	ZoiAN	3	1		12.26	6.24	5.26	17.24
	ZoiAP	4	0		4.58	1.81	2.88	6.70

Cluster	Variable	N	N Miss	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
5	DipC	1	0	2.73	.	2.73	2.73
	DipAN	1	0	0.40	.	0.40	0.40
	DipAP	1	0	4.08	.	4.08	4.08
	ProC	1	0	0.88	.	0.88	0.88
	ProAN	1	0	0.00	.	0.00	0.00
	ProAP	1	0	1.19	.	1.19	1.19
	HapC	1	0	9.15	.	9.15	9.15
	HapAN	1	0	22.81	.	22.81	22.81
	HapAP	1	0	7.98	.	7.98	7.98
	ZoiC	1	0	10.20	.	10.20	10.20
	ZoiAN	1	0	7.50	.	7.50	7.50
	ZoiAP	1	0	3.82	.	3.82	3.82

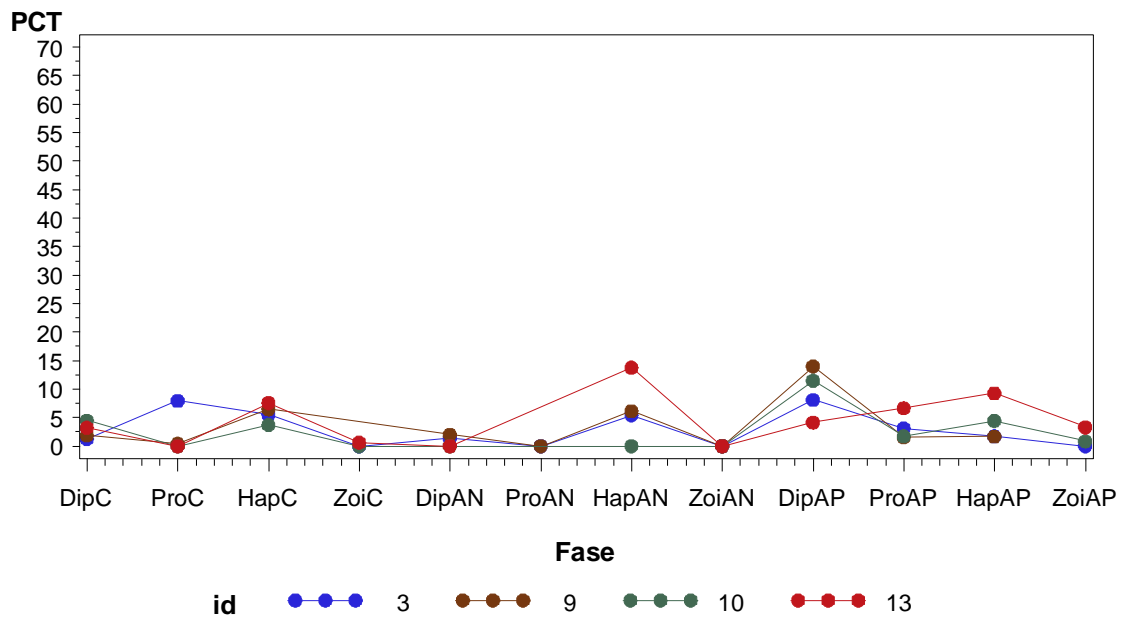


Perfils individuals:

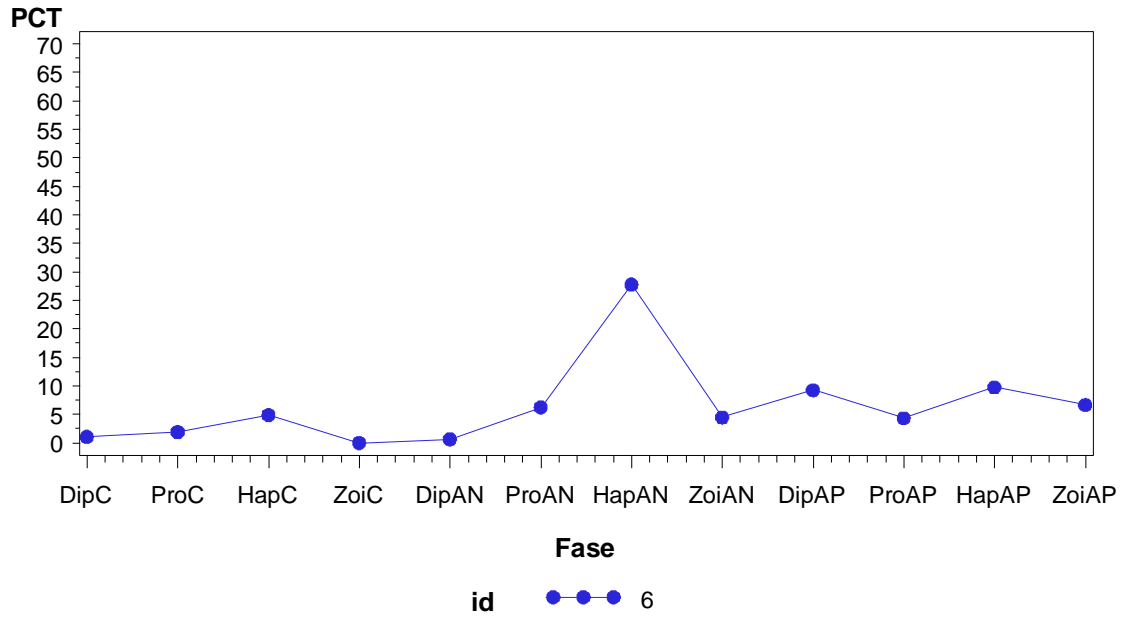
Cluster=1



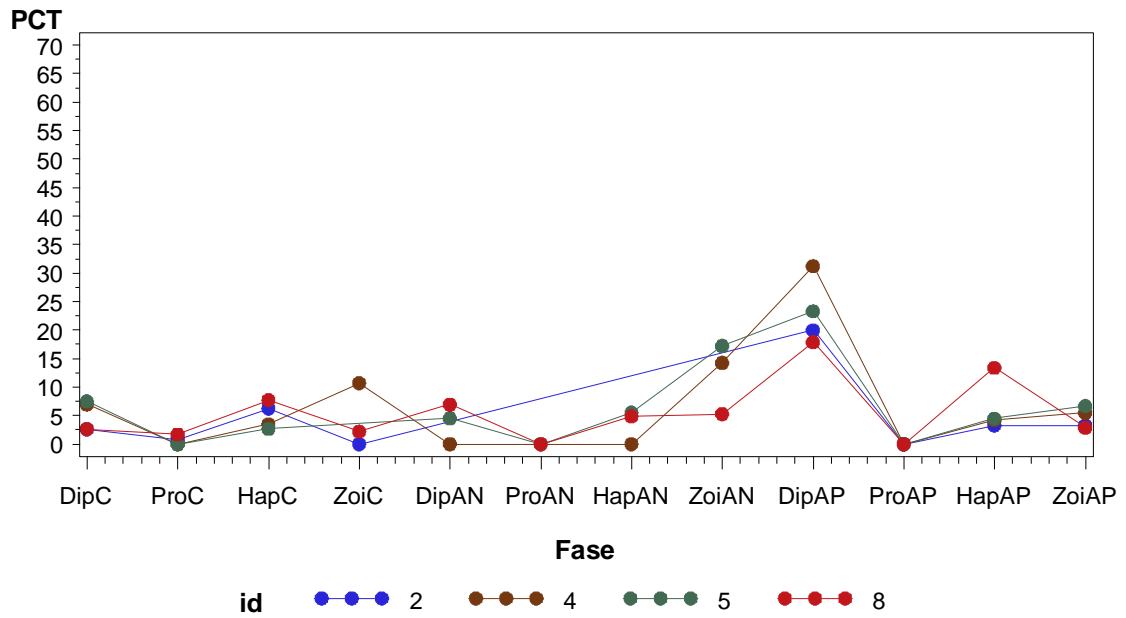
Cluster=2



Cluster=3



Cluster=4



Cluster=5

