



**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESIS DOCTORAL**  
**2017**

**ESTUDIO MOLECULAR DE LA MEIOSIS EN**  
**MAMÍFEROS**

**Alexandra Alemany Schmidt**





**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESIS DOCTORAL**  
**2017**

**Programa de Doctorado en Biotecnología, Genética y**  
**Biología Celular**

**ESTUDIO MOLECULAR DE LA MEIOSIS EN**  
**MAMÍFEROS**

**Alexandra Alemany Schmidt**

**Directora: Maria Oliver Bonet**

**Ponente: Bernhard Oliver Vögler**

**Doctora por la Universitat de les Illes Balears**





## **Universitat de les Illes Balears**

Dra. Maria Oliver Bonet, profesora associada de la Universitat Autònoma de Barcelona y investigadora en el departamento de I+D de la empresa Genosalut Balears SL

DECLARO:

Que la tesis doctoral que lleva por título "*Bases moleculares de la meiosis en mamíferos*", presentada por Alexandra Alemany Schmidt para la obtención del título de doctor, ha estado dirigida bajo mi supervisión.

Y para que quede constancia firmo el documento,

Dra. Maria Oliver Bonet (directora)

Palma de Mallorca, 12 de diciembre del 2016



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Conselleria de Educación, Cultura y Universidades que con el apoyo del Fondo Social Europeo, me dieron la oportunidad de realizar mi tesis doctoral con la ayuda de una beca predoctoral. Asimismo, agradecer al Hospital Son Espases, al Instituto de Investigación de Palma y a la Unidad de Investigación por permitirme realizar mi período doctoral en sus instalaciones.





## FINANCIACIÓN

Esta tesis ha sido posible gracias a la financiación de los proyectos

Fondo Investigación Sanitaria CP07/00258

Fondo Investigación Sanitaria PI08/1185

Este estudio también se ha beneficiado de una beca de la Conselleria de Educació, Cultura y Universidades, con el apoyo del Fondo Social Europeo (FPI09 43136283-J)

Invertim en el seu futur



Unió Europea  
Fons Social Europeu



**Govern de les Illes Balears**

Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats

Direcció General d'Universitats,

Recerca i Transferència del Coneixement



## LISTA DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Capilla, L. *et al.* Genetic recombination variation in wild Robertsonian mice: on the role of chromosomal fusions and Prdm9 allelic background. *Proc. Biol. Sci.* **281**, (2014).

Alemany-Schmidt, A. *et al.* Geographical genetic variability: a factor to consider when assessing clinical implications of PRDM9. *Mol. Genet. genomic Med.* **2**, 201–3 (2014).

Segura, J. *et al.* Evolution of recombination in eutherian mammals: insights into mechanisms that affect recombination rates and crossover interference. *Proc. Biol. Sci.* **280**, 20131945 (2013).

Vergés, L. *et al.* An exploratory study of predisposing genetic factors for DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *Scientific Reports.* (aceptado, pendiente de publicación)

Alemany-Schmidt, A. *et al.* TEX11 mutation detected by exome sequencing in an azoospermic male with meiotic arrest. *Human reproduction* (enviado para revisión)



## ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
ADB	Antibody Dilution Buffer
ALL	Acute Lymphoblastic Leukimia
AMCA	Aminomethylcoumarin
AR	Androgen Receptor
ARNi	ARN de interferencia
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3-related
ATRIP	ATR Interacting Protein
AZFa	Azoospermic Factor A
AZFb	Azoospermic Factor B
AZFc	Azoospermic Factor C
BPA	Bisphenol A
BRCA1	Breast Cancer Gene 1
BSA	Bovine Serum Albumine
C(3)G	Crossover Supressor on 3 of Gowen
CCNA1	Cyclin A1
CDK2	Cyclin Dependent Kinase 2
CESC1	Central Element Synaptonemal Complex Protein 1
CFP	Cyan Fluorescent Protein
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CHK1	Checkpoint Kinase 1
CHK2	Checkpoint Kinase 2
COs	Crossing Overs
cPAL™	combinatorial Probe-Anchor Ligation
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindol
DMC1	Disrupted Meiotic cDNA 1
DNMT3L	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3-like
DSBs	Double Strand Break
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EEG	Ecuaciones de Estimación Generalizadas

## Abreviatura

## Definición

eGFP	Enhanced Green Fluorescence Protein
EIF4G3	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 Gamma 3
EXO1	Exonuclease 1
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fst	Fixation index
GRCh37.p13	Genome Reference Consortium human37.p13
GWAS	Genome wide association studies
H2AX	Histone 2AX
HFS2	Heat Shock Factor 2
HR	Homologous Recombination
ICG	Inmunocitogenética
ICSI	Intracytoplasmatic Sperm Injection
IVF	In vitro fertilization
KRAB	Krüppel Associated Box
MDC1	Mediator of DNA Damage checkpoint 1
MDS	Multidimensional scaling
MEI1	Meiotic Double-Stranded Break Formation Protein
MLH1	MutL Homolog 1
MLH3	MutL Homolog 3
MRE11	Meiotic Recombination 11
MSCI	Meiotic Sex Chromosome Inactivation
MSH4	MutS Homolog 4
MSH5	MutS Homolog 5
MSUC	Meiotic silencing of unsynapsed chromatin
NBS1/NBN	Nibrin
nCO	Non Crossing Over
NGS	Next Generation sequencing
NOA	Non obstructive azoospermia
NUB1	Negative Regulator of ubiquitine-like proteins 1
OA	Obstructive Azoospermia
PAB	Pseudoautosomal boundary
PAR	Pseudoautosomic Region
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDZK1	PDZ Domain Containing 1
PFA	Paraformaldehyde

## Abreviatura

## Definición

PMS2	Postmeiotic Segregation Increased 2
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PRDM	Proline-Rich Domain
Prdm9	PR/SET domain 9
QTL	Quantitative Trait Loci
RAD21	Radiation Repair 21
RAD50-XRS2	Radiation Repair 50
RAD51	Radiation Repair 51
RAD54	Radiation Repair 54
REC8	Recombinant 8
RING	Really interesting New Gene
RNF212	Ring Finger Protein 212
RPA	Replication Protein A
SC	Synaptonemal Complex
SCC1	Sister Chromatid Cohesion 1
SCC3	Sister Chromatid Cohesion 3
SDSA	Synthesis Dependent Strand Annealing
SGS1-DNA2	Slow Growth Suppressor 1
SIAH1	Seven In Absentia Homolog 1
SMC1	Structural Maintenance of Chromosomes 1
SMC1 $\beta$	Structural Maintenance of Chromosomes 1 $\beta$
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPO11	Sporulation Specific Protein 11
SPO22	Sporulation Specific Protein 22
SSC	Saline-Sodium Citrate
ssDNA	Single Stranded DNA
STAG3	Stromal Antigen 3
SYCE1	Synaptonemal Complex Central Element protein 1
SYCE2	Synaptonemal Complex Central Element protein 2
SYCE3	Synaptonemal Complex Central Element protein 3
SYCP1	Synaptonemal Complex Protein 1
SYCP2	Synaptonemal Complex Protein 2
SYCP3	Synaptonemal Complex Protein 3
SYP-1	Synaptonemal Protein 1
TA	Temperatura ambiente

**Abreviatura****Definición**

TAE	Tris-Acetate-EDTA
TE	Tris-EDTA
TESE	Testicular Sperm Extraction
TEX11	Testis Expressed 11
TEX12	Testis Expressed 12
TOP2A	Topoisomerase II Alpha
TPR	Tetratricopeptide Repeat
TR	Texas Red
TRIP13	Thyroid Hormone Receptor Interactor 13
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol
TRITC	Tetramethylrhodamine
UGCG	UDP-Glucose Ceramide Glucosyltransferase
ZF	Zinc Finger
ZFCR	Zinc Finger Coding Repeat
ZFCRT	Zinc Finger Coding Repeat Type
ZHP-3	Zip Homologous Protein 3
Zip1p	Zinc Transporter Protein 1
Zip3	Zinc Transporter Protein 2



# ÍNDICE

## Índice general

RESUMEN .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
1.1. GAMETOGÉNESIS .....	9
1.1.1. <i>Espermatogénesis</i> .....	9
1.2. MEIOSIS.....	9
1.2.1. <i>Fases de la meiosis</i> .....	11
Profase I .....	12
Metafase I.....	13
1.3. EVENTOS MEIÓTICOS: RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y SINAPSIS .....	14
1.3.1. <i>La recombinación meiótica</i> .....	14
1.3.2. <i>Variación en la recombinación meiótica</i> .....	20
El gen PRDM9.....	20
El gen RNF212 .....	22
El gen TEX11.....	24
1.3.3. <i>Complejo sinaptonemal (SC)</i> .....	24
1.4. EL CUERPO SEXUAL .....	26
1.4.1. <i>La región PAR</i> .....	26
1.4.2. <i>Sinapsis del cuerpo sexual</i> .....	27
1.4.3. <i>Inactivación del cuerpo sexual</i> .....	28
1.5. INFERTILIDAD .....	29
1.5.1. <i>Causas de la infertilidad</i> .....	30
Microdeleciones en el cromosoma Y .....	31
Anomalías cromosómicas.....	31
Mutaciones genéticas más frecuentes.....	32
Mutaciones que afectan a la sinapsis y a la recombinación meiótica .....	32
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
3.1. ANÁLISIS INMUNOCITOGÉNÉTICO.....	43
3.1.1. <i>Material biológico</i> .....	43
3.1.2. <i>Materiales y reactivos</i> .....	43
3.1.3. <i>Metodología</i> .....	43
Obtención de núcleos meióticos .....	43
Inmunocitogenética.....	46
.....	50
3.2. ANÁLISIS DE LA RECOMBINACIÓN MEIÓTICA EN AUTOSOMAS.....	53

3.2.1. <i>Material biológico</i> .....	53
3.2.2 <i>Metodología</i> .....	54
3.3. ANÁLISIS DE LA SINAPSIS EN AUTOSOMAS.....	56
3.3.1. <i>Material biológico</i> .....	56
3.3.2 <i>Metodología</i> .....	56
SYCP1 y $\gamma$ H2AX en zonas asinapsadas.....	57
Análisis de la progresión de la profase I meiótica en gatos y perros .....	57
Análisis de la sinapsis en gatos .....	57
Análisis de la desinapsis en gatos .....	58
3.4. PRESENCIA DE MLH1 EN EL CUERPO SEXUAL.....	58
3.4.1. <i>Material biológico</i> .....	58
3.4.2. <i>Metodología</i> .....	58
3.5. PRESENCIA DE SYCP1 EN EL CUERPO SEXUAL .....	59
3.5.1. <i>Material biológico</i> .....	59
3.5.2. <i>Metodología</i> .....	60
3.6. MORFOLOGÍA DEL CUERPO SEXUAL EN GATOS Y PERROS .....	60
3.6.1. <i>Material biológico</i> .....	60
3.6.2. <i>Metodología</i> .....	60
3.7. ANÁLISIS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS .....	60
3.7.1. <i>Material biológico</i> .....	60
Humanos .....	60
Animales.....	62
3.7.2. <i>Metodología</i> .....	62
Extracción del ADN genómico a partir de sangre periférica.....	63
Extracción del ADN genómico a partir de biopsia testicular.....	63
Cuantificación .....	64
Amplificación.....	64
Amplificación de la región ZF del gen PRDM9 en humanos .....	64
Amplificación del exón ZF del gen PRDM9 en gatos.....	67
Amplificación del exón ZF del gen PRDM9 en perros .....	67
Amplificación del gen RNF212 en humanos .....	67
Amplificación de los genes TEX11, MSH5 y TOP2A en humanos .....	68
Electroforesis en geles de agarosa.....	68
Purificación de los fragmentos de PCR .....	68
Secuenciación .....	70
3.8. ANÁLISIS DEL EXOMA.....	71
3.8.1. <i>Material biológico</i> .....	71
3.8.2. <i>Metodología</i> .....	71
3.9 ESTADÍSTICA .....	74
3.9.1. <i>Meiosis: recombinación meiótica, asinapsis y estudio genético (PRDM9 y RNF212)</i> .....	74
3.9.2. <i>Estudio poblacional</i> .....	75

<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
4.1. RECOMBINACIÓN EN AUTOSOMAS .....	79
4.1.1. <i>Análisis de la recombinación meiótica y parámetros asociados</i> .....	79
MLH1: número y distribución .....	79
SCs: Longitud e interferencia.....	85
Correlación entre la longitud de los SCs y el número de foci de MLH1 .....	90
4.2 SINAPSIS EN AUTOSOMAS .....	94
4.2.1. <i>Anomalías sinápticas</i> .....	94
Presencia de SYCP1 y $\gamma$ H2AX en zonas asinapsadas.....	99
4.2.2. <i>Características del proceso sináptico en la especie Felis catus</i> .....	100
Características sinápticas .....	100
Inicio y progresión de la sinapsis en Felis catus .....	105
Iniciación y progresión de la desinapsis en Felis catus.....	107
4.3.4. <i>Características sinápticas en perros</i> .....	111
4.4. ANÁLISIS DEL CUERPO SEXUAL: MORFOLOGIA, ESTADIOS DE PAQUITENO, RECOMBINACIÓN Y SINAPSIS .....	111
4.4.1. <i>Morfología del cuerpo sexual durante el paquiteno de gatos y perros</i> .....	111
4.4.2. <i>Estadios del paquiteno</i> .....	114
4.4.3. <i>MLH1 en el cuerpo sexual</i> .....	115
4.4.4. <i>SYCP1 en el cuerpo sexual durante el paquiteno</i> .....	119
4.5. GENÉTICA .....	125
4.5.1. <i>PRDM9</i> .....	125
Humanos .....	125
Identificación de variantes en todos los individuos analizados .....	125
Variantes de PRDM9 en la población control y en padres transmisores de microdelociones de novo.....	129
Variantes de PRDM9 en la población control y en individuos infértiles .....	129
Análisis poblacional de PRDM9 .....	129
Relación de las variantes de PRDM9 con la tasa de recombinación .....	131
Gatos .....	133
Identificación de variantes de PRDM9 en gatos .....	133
Relación de las variantes de PRDM9 según su longitud con la tasa de recombinación .....	133
Perros .....	135
Identificación de variantes de PRDM9 en perros .....	135
4.5.2. <i>RNF212</i> .....	135
4.5.3. <i>Influencia conjunta de PRDM9 y RNF212</i> .....	136
4.6. CASO 114 .....	136
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>139</b>
5.1. ANÁLISIS DE LA MEIOSIS Y SU RELACIÓN CON LA INFERTILIDAD .....	141

5.1.1 Recombinación meiótica e infertilidad.....	141
Relación de la recombinación con la infertilidad .....	141
5.1.1.2 Relación de la sinapsis con la infertilidad .....	146
5.1.2. <i>Genética e infertilidad</i> .....	149
5.2. ANÁLISIS DE LA RECOMBINACIÓN MEIÓTICA EN MAMÍFEROS.....	151
5.2.1. <i>Variabilidad interindividual y entre especies en los procesos de recombinación meiótica</i> .....	151
MLH1 .....	151
Longitud de los SCs autosómicos.....	156
Interferencia.....	159
Localización de los foci de MLH1 en mamíferos.....	161
Correlación entre la longitud de los SCs y el número de foci de MLH1 .....	163
5.2.2. <i>Influencia de PRDM9 y RNF212 sobre la tasa de recombinación Influencia de PRDM9</i> .....	164
Influencia de RNF212 .....	165
Influencia conjunta de PRDM9 y RNF212 .....	166
5.3. PROCESOS SINÁPTICOS EN MAMÍFEROS .....	168
5.3.1 <i>Anomalías sinápticas en autosomas</i> .....	168
5.3.2. <i>Características de la sinapsis en autosomas</i> .....	171
Presencia de SYCP1 en regiones asinapsadas .....	171
Ausencia de SYCP1 en las regiones teloméricas.....	171
El proceso de sinapsis y desinapsis en los gatos .....	172
Sinapsis en perros .....	174
5.3.4. <i>La recombinación y sinapsis del cuerpo sexual en mamíferos</i> .....	175
Morfología del cuerpo sexual.....	175
Presencia de SYCP1 en el cuerpo sexual XY .....	175
MLH1 en el cuerpo sexual .....	176
5.4 ANÁLISIS POBLACIONAL DE PRDM9.....	177
5.4.1. <i>Diversidad alélica de PRDM9</i> .....	177
Análisis de la población balear .....	178
PRDM9 y enfermedad .....	181
5.5 ANÁLISIS DEL EXOMA DE UN PACIENTE INFÉRIL .....	182
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>185</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>189</b>

## Índice de figuras

Figura 1.1. La espermatogénesis en mamíferos.....	10
Figura 1.2. Estadios de la profase meiótica .....	13
Figura 1.3. Formación y procesamiento inicial de los DSBs. ....	16
Figura 1.4. Vías de recombinación .....	17
Figura 1.5. Los tres modelos de control de la interferencia a nivel cromosómico .....	19

Figura 1.6. Estructura de la proteína PRDM9. ....	21
Figura 1.7. PRDM9 y nucleosomas .....	22
Figura 1.8. Estructura de la proteína RNF212 .....	23
Figura 1.9. Estructura de TEX11.....	24
Figura 1.10. Estructura del complejo sinaptonemal. ....	25
Figura 1.11. Morfologías del cuerpo sexual observadas durante el paquiteno en humanos. ....	26
Figura 1.12. Localización de la región PAR en diferentes especies de mamíferos.....	27
Figura 1.13. Tamaño y contenido genético de la región PAR en diferentes especies de mamíferos .....	28
Figura 3.1. Esquema del procesamiento para la obtención de núcleos meióticos.....	46
Figura 3.2. Esquema del proceso de inmunocitogenética .....	47
Figura 3.3. Inmunocitogenética en núcleos de gato.....	50
Figura 3.4. Inmunocitogenética en núcleos de gato.....	51
Figura 3.5. Inmunocitogenética en núcleos de gato.....	52
Figura 3.6. Inmunocitogenética en núcleos de perro .....	53
Figura 3.7. Funcionamiento de la plataforma Complete Genomics. ....	73
Figura 4.1. Media y desviación típica del número de foci de MLH1 por núcleo en los individuos estudiados. ....	80
Figura 4.2. Valor medio de foci de MLH1 según la etapa del paquiteno en humanos y gatos del presente estudio .....	83
Figura 4.3. Distribución de foci de MLH1 en los autosomas de humanos .....	84
Figura 4.4. Distribución de los foci de MLH1 en los autosomas de gatos.....	85
Figura 4.5. Correlación entre el número de foci de MLH1 y la longitud total de los SCs autosómicos en humanos (SCs agrupados según el número de foci de MLH1) .....	91
Figura 4.6. Correlación entre el número de foci de MLH1 y la longitud total de los SCs autosómicos en gatos (SCs agrupados según el número de foci de MLH1) .....	93
Figura 4.7. MSUC en humanos.....	96
Figura 4.8. Núcleos poliploides en humanos .....	96
Figura 4.9. MSUC en gatos .....	98
Figura 4.10. Núcleos con cuadrivalentes en gatos. ....	99
Figura 4.11. MSUC en perros .....	99
Figura 4.12. SYCP1, SYCP3 y $\gamma$ H2AX en regiones asinapsadas.....	100
Figura 4.13. Agregado de SYCP3 en diferentes etapas de la profase I en gatos .....	102
Figura 4.14. Protuberancias esféricas en las regiones teloméricas de los SCs.....	102
Figura 4.15. Localización de los foci de MLH1 durante la desinapsis.....	103
Figura 4.16. Análisis de la presencia de un foco de MLH1 en los extremos de las zonas asinapsadas...	104
Figura 4.17. Localización de la proteína SYCP3 durante la metafase I en gatos .....	104
Figura 4.18. Morfologías observadas en el inicio de sinapsis en cromosomas metacéntricos en gatos...	105
Figura 4.19. Morfologías observadas en el inicio de sinapsis en cromosomas submetacéntricos en gatos .....	106
Figura 4.20. Morfologías observadas en el inicio de la sinapsis en cromosomas acrocéntricos en gatos. ....	107
Figura 4.21. Fases de la desinapsis en gatos.....	108
Figura 4.22. Morfologías observadas durante la desinapsis en cromosomas no acrocéntricos en gatos.	109
Figura 4.23. Morfologías observadas durante la desinapsis en cromosomas acrocéntricos en gatos.....	110

Figura 4.24. Morfología del cuerpo sexual en el paquiteno inicial en gatos .....	112
Figura 4.25. Morfología del cuerpo sexual en el paquiteno medio en gatos .....	113
Figura 4.26. Morfología del cuerpo sexual en el paquiteno tardío en gatos.....	113
Figura 4.27. Porcentaje de células en cada etapa del paquiteno en los humanos analizados .....	114
Figura 4.28. Porcentaje de células en cada etapa del paquiteno en los gatos analizados. ....	115
Figura 4.29. Relación entre la frecuencia de células con un foco de MLH1 en el par XY y el número medio de foci de MLH1 por célula. A: humanos; B: gatos; C: perros. ....	118
Figura 4.30. SYCP1 en el cuerpo sexual durante el paquiteno en humanos. ....	119
Figura 4.31. SYCP1 en el cuerpo sexual en dos individuos control.....	120
Figura 4.32. SYCP1 en el cuerpo sexual durante el paquiteno en gatos.....	121
Figura 4.33. SYCP1 en el cuerpo sexual durante el paquiteno en perros .....	122
Figura 4.34. Presencia de SYCP1 en el cuerpo sexual en TB1 dependiendo de la presencia/ausencia de MLH1 en el par XY.....	123
Figura 4.35. Distribución de SYCP1 sólo en aquellos pares XY con punto de MLH1.....	124
Figura 4.36. SYCP1 y MLH1 en el cuerpo sexual durante el paquiteno en humanos.....	124
Figura 4.37. Secuencia de los ZFCRT de PRDM9 descritos hasta la fecha .....	126
Figura 4.38. Secuencia de aminoácidos de los ZFCRT de PRDM9 .....	127
Figura 4.39. Ejemplo de células finales, que muestran la variación de la extensión de la sinapsis en diferentes núcleos.....	138
Figura 5.1. Defectos sinápticos en el individuo HC1.....	148
Figura 5.2. Relación de la longitud media de los SCs por célula con porcentajes de células en diferentes estadios en cada individuo.....	158
Figura 5.3. MDS de las distancias genéticas .....	181

## Índice de tablas

Tabla 1.1. Datos meióticos de estudios realizados en mamíferos .....	11
Tabla 1.2. Comparación del número de DSBs y COs, y proporción de COs interferentes en diferentes organismos .....	17
Tabla 1.3. Datos sobre la interferencia para diversas especies de mamíferos .....	18
Tabla 1.4. Análisis seminal. ....	31
Tabla 1.5. Genes involucrados en recombinación y sinapsis y su relación con problemas de fertilidad en modelo ratón. ....	35
Tabla 3.1. Reactivos y material para el procesamiento de las biopsias testiculares .....	44
Tabla 3.2. Soluciones para el procesamiento de las biopsias testiculares .....	44
Tabla 3.3. Solución hipotónica de extracción.....	45
Tabla 3.4. Otras soluciones .....	45
Tabla 3.5. Reactivos y material para inmunocitogenética.....	47
Tabla 3.6. Soluciones para inmunocitogenética .....	48
Tabla 3.7. Anticuerpos primarios empleados en inmunocitogenética .....	49
Tabla 3.8. Anticuerpos secundarios empleados en inmunocitogenética.....	49
Tabla 3.9. Número de núcleos analizados por individuo para el análisis de la recombinación meiótica.....	54
Tabla 3.10. Número de núcleos analizados por individuo para el análisis de la sinapsis .....	56

Tabla 3.11. Número de núcleos analizados por individuo para el análisis de la presencia de MLH1 en el cuerpo sexual.....	59
Tabla 3.12. Reactivos y material para la extracción de ADN genómico.....	62
Tabla 3.13. Reactivos y material para la amplificación de ADN genómico .....	64
Tabla 3.14. Oligonucleótidos empleados para amplificación y secuenciación.....	65
Tabla 3.15. Mezcla de la reacción de PCR para la amplificación de la región ZF del gen PRDM9 .....	66
Tabla 3.16. Programas de las reacciones de PCR .....	66
Tabla 3.17. Mezcla de la reacción de PCR para amplificación de la región ZF del gen PRDM9 en gatos y perros.....	67
Tabla 3.18. Mezcla de la reacción de PCR para amplificación del gen RNF212, TEX11, MSH5 y TOP2A 68	
Tabla 3.19. Soluciones para la electroforesis en geles de agarosa .....	68
Tabla 3.20. Reactivos y material para la purificación de los fragmentos de PCR .....	69
Tabla 4.1. Análisis del porcentaje de SCs según número de foci de MLH1 (1, 2, 3, 4, 5, 6) en cada individuo y media .....	81
Tabla 4.2. Análisis del porcentaje de SCs según número de foci de MLH1 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) en cada individuo y media .....	82
Tabla 4.3. Subestadios. Comparaciones por pares .....	83
Tabla 4.4. Longitud media de los SCs por núcleo según la etapa del paquiteno en humanos y gatos .....	87
Tabla 4.5. Longitud media de los SCs por núcleo según la etapa del paquiteno en humanos y gatos. Comparaciones por pares.....	87
Tabla 4.6. Distancias interfocales para SCs con el mismo número de foci de MLH1 en gatos .....	88
Tabla 4.7. Distancias interfocales para SCs con el mismo número de foci de MLH1 en humanos .....	89
Tabla 4.8. Interferencia por célula según la etapa del paquiteno en humanos y gatos.....	89
Tabla 4.9. Frecuencia de núcleos con defectos sinápticos clasificados según defectos .....	94
Tabla 4.10. Frecuencia de núcleos con defectos sinápticos clasificados según subestadio .....	95
Tabla 4.11. Frecuencia de núcleos con defectos sinápticos clasificados según defectos .....	97
Tabla 4.12. Análisis de la sinapsis de los cromosomas metacéntricos en gatos .....	106
Tabla 4.13. Análisis de la sinapsis de los cromosomas submetacéntricos en gatos .....	107
Tabla 4.14. Análisis de la sinapsis de los cromosomas acrocéntricos en gatos .....	107
Tabla 4.15. Análisis de la desinapsis de los cromosomas metacéntricos y submetacéntricos en gatos. .	110
Tabla 4.16. Análisis de la desinapsis de los cromosomas acrocéntricos en gatos .....	111
Tabla 4.17. Análisis de la presencia de un foco de MLH1 en el cuerpo sexual en los individuos de este estudio .....	116
Tabla 4.18. Análisis de la presencia de un foco de MLH1 en el cuerpo sexual en gatos y perros.....	117
Tabla 4.19. Análisis de la presencia de un foco de MLH1 en el cuerpo sexual en los subestadios del paquiteno en humanos y gatos.....	118
Tabla 4.20. Alelos PRDM9.....	128
Tabla 4.21. Frecuencia alélicas de PRDM9 en la población control y poblaciones de estudio.....	130
Tabla 4.22. Frecuencias alélicas de PRDM9 en las poblaciones estudiadas .....	131
Tabla 4.23. PRDM9 y tasa de recombinación en humanos. Comparaciones por pares .....	132
Tabla 4.24. PRDM9 y tasa de recombinación en humanos. Medias.....	133
Tabla 4.25. PRDM9 y tasa de recombinación en gatos. Comparaciones por pares .....	134
Tabla 4.26. PRDM9 y tasa de recombinación en gatos. Medias. ....	134
Tabla 4.27. RNF212 y tasa de recombinación en humanos. Medias.....	135

Tabla 4.28. RNF212 y tasa de recombinación en humanos. Comparaciones por pares .....	136
Tabla 4.29. PRDM9 y RNF212 y tasa de recombinación en humanos. Estimaciones de los parámetros	136
Tabla 5.1. Infertilidad y parámetros de recombinación. Medias .....	142
Tabla 5.2. Infertilidad y parámetros de recombinación. Comparaciones por pares .....	142
Tabla 5.3. Recombinación media y rango de foci de MLH1 en diferentes estudios inmunocitogenéticos en humanos .....	144
Tabla 5.4. Análisis de la presencia de un foco de MLH1 en el cuerpo sexual en diferentes estudios inmunocitogenéticos en humanos.....	145
Tabla 5.5. Datos sobre anomalías sinápticas disponibles en la literatura .....	147
Tabla 5.6. Parámetros de recombinación en las tres especies del presente estudio.....	151
Tabla 5.7. Cariotipo de las especies de mamíferos .....	154
Tabla 5.8. Datos de la tasa de recombinación meiótica en diversas especies de mamíferos .....	155
Tabla 5.9. Longitud media de los SCs por célula en mamíferos .....	157
Tabla 5.10. Comparativa entre humanos y gatos de la media del análisis del porcentaje de SCs según número de foci de MLH1 Porcentaje de SCs con 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 foci de MLH1.....	160
Tabla 5.11. MSUC .....	170
Tabla 5.12. Valores de significación (P) de las comparaciones entre pares de poblaciones (FST).....	180



## RESUMEN

En la presente tesis se han analizado los procesos de sinapsis y recombinación en tres especies de mamíferos: humanos, gatos y perros. Para ello, se ha utilizado la técnica de inmunocitogenética, la cual ha permitido determinar los valores cuantitativos y las características cualitativas de dichos procesos.

Los resultados obtenidos muestran similitudes, más acentuadas entre humanos y gatos, y también particularidades notables, como la presencia de un reservorio de proteína SYCP3 y los procesos de sinapsis y de desinapsis de los gatos. Además, los resultados han permitido establecer que la variabilidad inter e intraindividual observada en todos los parámetros analizados es común en las tres especies. Otras similitudes observadas son la influencia de la morfología cromosómica sobre el número de *foci* de MLH1 por bivalente, la tendencia a alcanzar el máximo de recombinación en paquiteno medio y la ausencia de proteína SYCP1 en las regiones subtelo méricas. Este rasgo se halló más acentuado en gatos, y está probablemente relacionado con la ausencia de picos de recombinación en dichas regiones y una distribución más uniforme de la misma a lo largo de los brazos cromosómicos. Además, en gatos se detectó que el efecto inhibitorio del centrómero sobre la recombinación no es tan acentuado como en humanos. En conjunto, ambas características podrían relacionarse con los valores menores de interferencia observados en esta especie.

Por lo que respecta al análisis del cuerpo sexual, éste reveló una morfología característica para cada una de las especies analizadas, cambiante a lo largo del paquiteno en humanos y gatos, y siempre lineal en perros. Además, se detectó presencia de proteína SYCP1 más allá de la región PAR en las tres especies. En humanos y gatos, se detectó una mayor cantidad de proteína SYCP1 en los estadios iniciales de paquiteno. Dicha cantidad disminuyó progresivamente a lo largo de los siguientes subestadios, hasta desaparecer en paquiteno tardío.

Se detectaron anomalías sinápticas en las tres especies, aunque la incidencia de los diferentes tipos de anomalías descritos en el presente estudio (asinapsis, *gaps* y MSUC) varió entre especies. Así, en humanos, las anomalías más frecuentes fueron *gaps* y asinapsis, mientras que en gatos y perros la anomalía más frecuente fue MSUC. Según alcanza nuestro conocimiento, ésta es la primera vez que se describe este fenómeno en individuos sin alteraciones cromosómicas de poblaciones salvajes.

Además, debido al papel relevante que se les ha atribuido recientemente en la literatura, se analizaron los genes *PRDM9* y *RNF212* y su asociación con la tasa de

recombinación. Los resultados obtenidos, tanto en humanos como en gatos, confirman una relación compleja entre los genotipos de *PRDM9* y la tasa de recombinación, que parece estar determinada por la longitud de los alelos, por el estado de homocigosidad o heterocigosidad de los mismos y por efectos de dominancia. Los resultados obtenidos permitieron demostrar una relación del genotipo de *RNF212* (SNP rs3796619) con la tasa de recombinación. En los individuos de este estudio, cada copia del alelo T, en comparación con el alelo C, supuso una disminución media de la tasa de recombinación de 132,5 cM.

En el caso de *PRDM9* también se estudió su posible relación con problemas de fertilidad y síndromes de *novo*. Para ello, se analizaron las variantes alélicas de *PRDM9* en población control, en pacientes infértiles y en padres de pacientes portadores de alteraciones cromosómicas. Los resultados no detectaron una asociación significativa en ningún caso. No obstante, durante este análisis, se detectó una elevada variabilidad alélica en las poblaciones analizadas: 13 nuevos alelos y siete nuevos tipos de repeticiones codificantes de dedos de zinc. Estos resultados indicaban una mayor diversidad de *PRDM9* a nivel poblacional que la descrita en la literatura. Para analizar en mayor profundidad dicha diversidad, se procedió al genotipado de diferentes poblaciones humanas y a su comparación con otras poblaciones descritas en la literatura. Se observó que las poblaciones mediterráneas (Mallorca, Menorca, Ibiza y Marruecos) ocupan una posición intermedia entre los dos extremos (norte-centro de Europa y África) de la clina genética de *PRDM9*, de acuerdo con su posición geográfica y con otros resultados de estudios genéticos basados en otros marcadores.

Debido a la asociación de anomalías meióticas con problemas en la fertilidad, en el análisis realizado en humanos se incluyó la comparación de los parámetros de sinapsis y de recombinación entre una población control y dos poblaciones infértiles (OA y NOA). Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre las poblaciones. No obstante, el análisis inmunocitogenético realizado en uno de los pacientes NOA (i14) mostró claras similitudes fenotípicas con otros descritos en la literatura. Este hecho llevó a sospechar de un defecto común en la meiosis de los pacientes que compartían el mismo fenotipo meiótico. Ante la posibilidad de que este defecto tuviese un origen genético, se analizó el exoma de dicho paciente. Los resultados obtenidos identificaron el gen *TEX11* como posible candidato principal del bloqueo meiótico y los genes *MSH5*, *TOP2A* y *NBN* como candidatos asociados.

## RESUM

En la present tesi s'han analitzat els processos de sinapsi i recombinació en tres espècies de mamífers: humans, moixos i cans. Per a això, s'ha utilitzat la tècnica d'immunocitogenètica, la qual ha permès determinar els valors quantitius i les característiques qualitatives d'aquests processos.

Els resultats obtinguts mostren similituds, més accentuades entre humans i moixos, i també particularitats notables, com la presència d'un reservori de proteïna SYCP3 i els processos de sinapsi i de desinapsi dels moixos. A més, els resultats han permès establir que la variabilitat inter i intraindividual observada en tots els paràmetres analitzats és comú a les tres espècies. Altres similituds observades són la influència de la morfologia cromosòmica sobre el nombre de *foci* de MLH1 per bivalent, la tendència a aconseguir el màxim de recombinació en paquitè mitjà i l'absència de proteïna SYCP1 a les regions subtelomèriques. Aquest tret es va trobar més accentuat en moixos, i està probablement relacionat amb l'absència de pics de recombinació en aquestes regions i una distribució més uniforme al llarg dels braços cromosòmics. A més, en moixos es va detectar que l'efecte inhibidor del centròmer sobre la recombinació no és tan accentuat com en humans. En conjunt, les dues característiques podrien relacionar-se amb els valors menors d'interferència observats en aquesta espècie.

Pel que fa a l'anàlisi del cos sexual, aquest va revelar una morfologia característica per a cadascuna de les espècies analitzades, canviant al llarg del paquitè en humans i moixos, i sempre lineal en cans. A més, es va detectar presència de proteïna SYCP1 més enllà de la regió PAR a les tres espècies. En humans i moixos, es va detectar una major quantitat de proteïna SYCP1 en els estadis inicials de paquitè. L'esmentada quantitat va disminuir progressivament al llarg dels següents subestadis, fins a desaparèixer en paquitè tardà.

Es van detectar anomalies sinàptiques en les tres espècies, encara que la incidència dels diferents tipus d'anomalies descrits en el present estudi (asinapsi, *gaps* i MSUC) va variar entre espècies. Així, en humans, les anomalies més freqüents van ser *gaps* i asinapsi, mentre que en moixos i cans l'anomalia més freqüent va ser MSUC. Segons arriba el nostre coneixement, aquesta és la primera vegada que es descriu aquest fenomen en individus sense alteracions cromosòmiques de poblacions salvatges.

A més, a causa del paper rellevant que se'ls ha atribuït recentment a la literatura, es van analitzar els gens *PRDM9* i *RNF212* i la seva associació amb la taxa de recombinació. Els resultats obtinguts, tant en humans com en moixos, confirmen una relació complexa

entre els genotips de *PRDM9* i la taxa de recombinació, que sembla estar determinada per la longitud dels al·lels, per l'estat de homozigositat o heterozigositat dels mateixos i per efectes de dominància. Els resultats obtinguts van permetre demostrar una relació del genotip d'*RNF212* (SNP rs3796619) amb la taxa de recombinació. En els individus d'aquest estudi, cada còpia de l'al·lel T, en comparació amb l'al·lel C, va suposar una disminució mitjana de la taxa de recombinació de 132,5 cM.

En el cas de *PRDM9* també es va estudiar la seva possible relació amb problemes de fertilitat i síndromes de *novo*. Per a això, es van analitzar les variants al·lèliques de *PRDM9* en població control, en pacients infèrtils i en pares de pacients portadors d'alteracions cromosòmiques. Els resultats no van detectar una associació significativa en cap cas. No obstant això, durant aquesta anàlisi es va detectar una elevada variabilitat al·lèlica a les poblacions analitzades: 13 nous al·lels i set nous tipus de repeticions codificants de dits de zinc. Aquests resultats indicaven una major diversitat de *PRDM9* a nivell poblacional que la descrita a la literatura. Per analitzar amb més profunditat aquesta diversitat, es va procedir al genotipatge de diferents poblacions humanes i a la seva comparació amb altres poblacions descrites a la literatura. Es va observar que les poblacions mediterrànies (Mallorca, Menorca, Eivissa i el Marroc) ocupen una posició intermèdia entre els dos extrems (nord-centre d'Europa i Àfrica) de la clina genètica de *PRDM9*, d'acord amb la seva posició geogràfica i amb altres resultats d'estudis genètics basats en altres marcadors.

A causa de l'associació d'anomalies meiòtiques amb problemes en la fertilitat, en l'anàlisi realitzada en humans es va incloure la comparació dels paràmetres de sinapsi i de recombinació entre una població control i dues poblacions infèrtils (OA i NOA). Els resultats obtinguts no van mostrar diferències significatives entre les poblacions. No obstant això, l'anàlisi immunocitogenètic realitzat en un dels pacients NOA (i14) va mostrar clares similituds fenotípiques amb altres descrits a la literatura. Aquest fet va portar a sospitar d'un defecte comú a la meiosi dels pacients que compartien el mateix fenotip meiòtic. Davant la possibilitat que aquest defecte tingués un origen genètic, es va analitzar l'exoma d'aquest pacient. Els resultats obtinguts van identificar el gen *TEX11* com a possible candidat principal del bloqueig meiòtic i els gens *MSH5*, *TOP2A* i *NBN* com a candidats associats.

## ABSTRACT

In this thesis, we have analyzed the synapsis and recombination processes in three species of mammals: humans, cats and dogs. For this purpose, we have used the immunocytogenetic technique, which allows the determination of the quantitative values and the qualitative characteristics of these processes.

The obtained results show similarities, more noticeable between humans and cats, as well as remarkable particularities in cats, such as the presence of an SYCP3 protein reservoir and the synapsis and desynapsis processes. Besides, the results have allowed to determine that the observed inter- and intraindividual variability in all analyzed parameters is common to the three species. Other observed similarities are the influence of chromosomal morphology on the number of MLH1 *foci* per bivalent, the tendency to reach the maximum recombination in middle pachytene and the absence of SYCP1 protein in the subtelomeric regions. This feature was found to be more prominent in cats, and is probably related to the absence of recombination peaks in these regions and a more even distribution along the chromosome arms. Moreover, in cats the inhibitory effect of the centromere on recombination is not as strong as in humans. Together, both characteristics could be related to the lower interference values observed in this species.

Regarding the analysis of the sex body, it showed a characteristic morphology in each of the analyzed species, variable along the pachytene in humans and cats, and always linear in dogs. In addition, the presence of SYCP1 protein was detected beyond the PAR region in the three species. In humans and cats, a greater amount of SYCP1 protein was detected in the early stages of pachytene. This amount decreased progressively along the following stages, until disappearing in late pachytene.

Synaptic anomalies were detected in all three species, although the incidence of the different types of anomalies described in the present study (asynapsis, gaps and MSUC) varied between species. Thus, in humans, the most frequent anomalies were gaps and asynapsis, whereas in cats and dogs the most frequent anomaly was MSUC. As far as we know, this is the first time this phenomenon has been described in individuals without chromosomal alterations in wildtype populations.

In addition, due to the relevant role recently attributed to *PRDM9* and *RFN212* in the literature, both genes and their association with the recombination rate were analyzed. The results, both in humans and cats, confirm a complex relationship between the *PRDM9* genotypes and the recombination rate, which appears to be determined by the length of the alleles, by the status of homozygosity or heterozygosity of the same and by

dominance effects. The obtained results allowed demonstrating a relation of the *RNF212* genotype (SNP rs3796619) with the recombination rate. In the individuals in this study, each copy of the T allele, compared to the C allele, resulted in a mean decrease in the recombination rate of 132.5 cM.

In the case of *PRDM9*, its possible relationship with fertility problems and *de novo* syndromes was also studied. For this, the allelic variants of *PRDM9* were analyzed in the control population, infertile patients and parents of patients with chromosomal alterations. The results did not detect a significant association in any case. However, during this analysis a high allelic variability was detected in the analyzed populations: 13 new alleles and 7 new types of zinc finger coding repeats. These results indicated a greater diversity of *PRDM9* at the population level than the one described in the literature. In order to analyze this diversity in greater depth, we proceeded to the genotyping of different human populations and to their comparison with other populations described in the literature. It was observed that Mediterranean populations (Mallorca, Menorca, Ibiza and Morocco) occupy an intermediate position between the two extremes (north-central Europe and Africa) of the genetic clade of *PRDM9*, according to their geographical position and other genetic studies results based on other markers.

Due to the association of meiotic abnormalities with fertility problems, the analysis in humans included a comparison of the synapsis and recombination parameters between a control population and two infertile populations (OA and NOA). The results did not show significant differences between the populations. However, the immunocytogenetic analysis performed in one of the NOA patients (i14) showed clear phenotypic similarities with others described in the literature. This fact led to the suspicion of a common defect in the meiosis of patients who shared the same meiotic phenotype. In view of the possibility that this defect had a genetic origin, the exome of the aforementioned patient was analyzed. The results obtained identified the *TEX11* gene as a possible main candidate of the meiotic arrest and the *MSH5*, *TOP2A* and *NBN* genes as associated candidates

# 1. INTRODUCCIÓN





## 1.1. GAMETOGÉNESIS

La gametogénesis es el proceso que comprende la formación de los gametos, es decir, de las células haploides ( $n$ ) destinadas a la reproducción sexual.

Durante la gametogénesis tienen lugar la recombinación, sinapsis y la segregación meiótica de cromosomas homólogos. Estos procesos son clave para asegurar la transmisión de una dotación genética única y particular a la descendencia y todos ellos se desarrollan bajo un control estricto que evita la aparición de alteraciones que puedan repercutir en el desarrollo del futuro embrión.

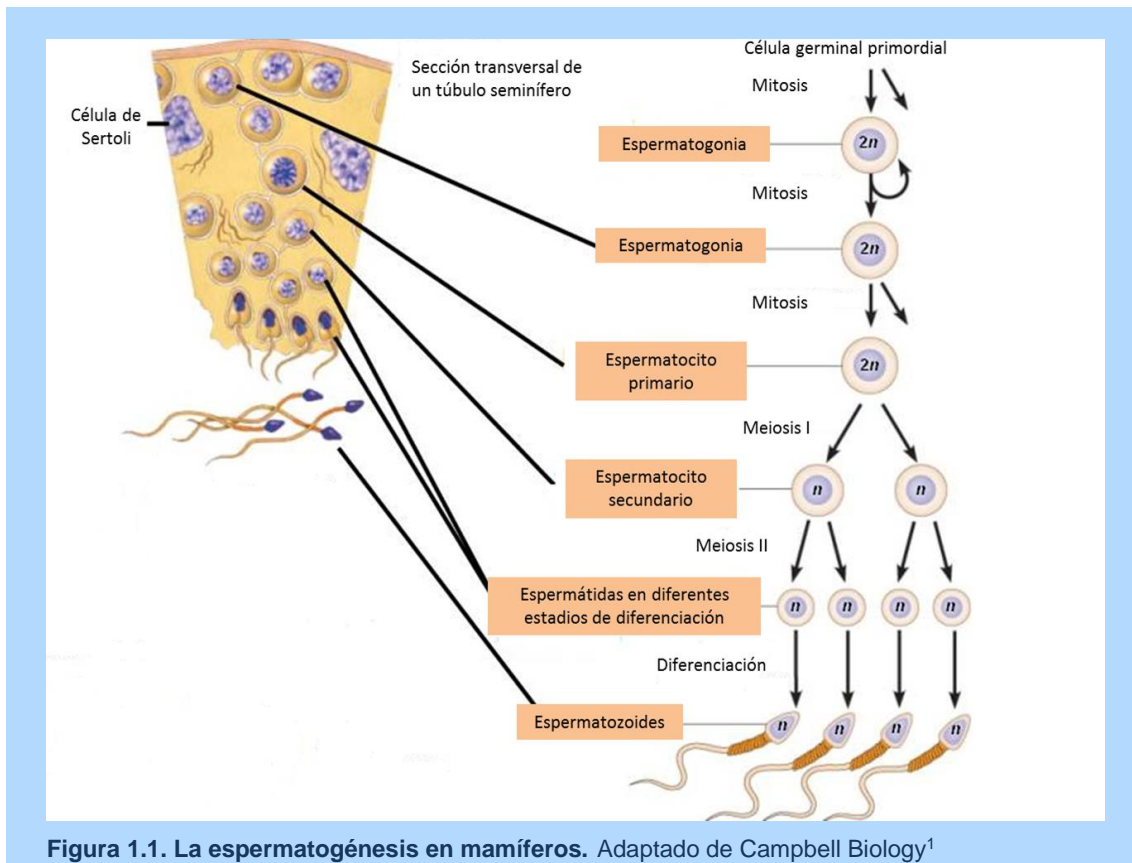
### 1.1.1. Espermatogénesis

En individuos del sexo masculino, la gametogénesis recibe el nombre de espermatogénesis. La espermatogénesis es un proceso complejo que se puede separar en tres fases: proliferativa, meiótica y de diferenciación. Es decir, la espermatogénesis se inicia mediante la proliferación por división mitótica de las espermatogonias, continúa con la división meiótica de los espermatocitos y culmina en la producción de espermatozoides móviles gracias a toda una serie de procesos de maduración post-meióticos.

La espermatogénesis tiene lugar en el interior de los túbulos seminíferos, estructuras altamente organizadas que contienen una diversidad de células que se hallan en diferentes fases del proceso meiótico. Dichas células forman estratos visibles histológicamente: las espermatogonias están situadas cerca de la lámina basal, en la parte más externa del tubo seminífero; a continuación encontramos espermatocitos primarios, secundarios, espermátidas y finalmente, ya próximos al lumen central, los espermatozoides. En mamíferos, los individuos de sexo masculino poseen al nacer una población de espermatogonias que se dividen mitóticamente para auto-renovarse y para dar lugar a células destinadas a la meiosis. La primera división meiótica genera dos espermatocitos, que se dividen inmediatamente para dar lugar a cuatro espermátidas que madurarán hasta convertirse en espermatozoides durante un proceso de diferenciación celular conocido como espermiogénesis (**Figura 1.1**).

## 1.2. MEIOSIS

La meiosis es un tipo de división celular íntimamente ligado a la gametogénesis en eucariotas superiores, cuya finalidad es la reducción del número cromosómico de diploide a haploide (es decir, de  $2n$  a  $n$ ) en el núcleo de los gametos.



Los datos citológicos y genéticos publicados hasta el momento sugieren que la meiosis evolucionó a partir de la mitosis<sup>2</sup> o de forma paralela a ella<sup>3</sup>. Las diferencias entre ambos tipos de división celular se resumen en cuatro pasos exclusivos de la meiosis: 1) apareamiento de cromosomas homólogos, 2) recombinación entre cromátidas no hermanas durante el apareamiento, 3) supresión de la separación de las cromátidas hermanas durante la primera división meiótica y 4) ausencia de replicación durante la segunda división meiótica<sup>2</sup>.

Tanto la necesidad de crear roturas de doble cadena de ADN (*DSBs*, *Double Strand Breaks*) como los eventos necesarios para el apareamiento de cromosomas homólogos y la formación de entrecruzamientos (*COs*, *Crossing Overs*) pueden considerarse adaptaciones biológicas para la reproducción sexual que evolucionaron a partir de mecanismos (procarióticos y eucarióticos) de detección y reparación de daños del ADN en células somáticas<sup>4</sup>. Este hecho explicaría, en parte, que el proceso meiótico esté muy conservado a nivel evolutivo. De manera amplia y general, este proceso se inicia tras una replicación pre-meiótica del ADN (célula  $4n$ ) y genera cuatro células haploides ( $n$ ) mediante dos procesos de división: meiosis I, caracterizada por la separación de los pares de cromosomas homólogos, y meiosis II, caracterizada por la separación de las

cromátidas hermanas. La fase más característica de la meiosis I es la profase, durante la cual los cromosomas homólogos se unen a través del complejo sinaptonemal (SC, *Synaptonemal Complex*) y llevan a cabo la recombinación meiótica. La profase I está a su vez dividida en cuatro etapas definidas por configuraciones y estructuras cromosómicas discernibles al microscopio óptico: el inicio de la recombinación y el apareamiento de los cromosomas homólogos (leptoteno y zigoteno), la sinapsis y el final de la recombinación (paquiteno) y la desinapsis y visualización de los quiasmas (diploteno). Los cambios en la estructura cromosómica que se pueden observar a lo largo de las diferentes etapas se deben a variaciones en la estructura de la cromatina (modificaciones de las histonas, complejos remodeladores de la cromatina, cohesinas, condensinas) que influyen en el ensamblaje y desensamblaje de complejos multiproteicos que afectan a la dinámica de los cromosomas (**Figura 1.2**).

**Tabla 1.1. Datos meióticos de estudios realizados en mamíferos**

Especie	2n	FNa	Foci MLH1	Interferencia	Longitud SCs
Ratón <sup>5</sup>	40	38	22,9	70	163,7
Cerdo <sup>6</sup>	38	60	32,0	67,5	190,3
Musaraña <sup>7</sup>	21-25	40	21,9	42-55	142,8
Caballo <sup>8</sup>	64	88	50,1	ND	254,6
Gato <sup>9</sup>	38	68	42,5	47	249,9
Perro <sup>10</sup>	78	76	40,0	60	246,0
Humano <sup>11</sup>	46	78	49,8	68	297,9

FNa: número diploide de brazos autosómicos. ND: no disponible

En mamíferos, la meiosis se ha estudiado de forma detallada principalmente en humanos y en el organismo modelo ratón. Existen varios estudios, menos exhaustivos, en gatos, perros, cerdos, caballos y musarañas (**Tabla 1.1**). Dichos estudios están centrados casi exclusivamente en el análisis de la recombinación y parámetros asociados tales como interferencia o distribución de los *foci* de recombinación en los SCs y apenas ofrecen una descripción del proceso meiótico.

### 1.2.1. Fases de la meiosis

Antes del inicio de la profase I y tal y como se ha comentado anteriormente, durante la fase S del último ciclo celular pre-meiótico tiene lugar la replicación del ADN. Al finalizar dicha replicación, en humanos, encontramos en el núcleo de la espermatogonia 46 cromosomas formados por dos cromátidas hermanas que están unidas por cohesinas.

Algunas de estas cohesinas, como REC8 y STAG3, son específicas de meiosis y son capaces de colaborar en los procesos de sinapsis y recombinación, y a la vez adaptarse a una de las particularidades de la división meiótica, la supresión de la separación de las cromátidas hermanas durante la primera división meiótica<sup>12-15</sup>.

### Profase I

#### Leptoteno

Durante el leptoteno la cromatina empieza a condensarse. En esta fase también tiene lugar el alineamiento inicial entre cromosomas homólogos, basado en la búsqueda de homología, y la formación de los elementos axiales a partir de cohesinas y proteínas específicas que constituirán el llamado complejo sinaptonemal. Entre ellas, la proteína SYCP3 (**Figura 1.2**) o las cohesinas mencionadas en el apartado anterior. En dicha búsqueda intervienen mecanismos no del todo descifrados, entre los que se encuentran interacciones entre dúplices de ADN, interacciones entre ADN y proteínas en centros especializados de apareamiento, interacciones entre centrómeros y heterocromatina centromérica e interacciones entre telómeros y los conocidos como territorios cromosómicos (dominios del núcleo ocupados por un par de cromosomas homólogos). Todos estos mecanismos implican un aumento de las interacciones físicas entre homólogos que llevan al apareamiento y finalmente a la sinapsis de los mismos<sup>16</sup>.

Este proceso inicial de alineamiento y en consecuencia los dos que siguen (apareamiento y sinapsis) pueden ser dependientes (*S. cerevisiae*, *A. thaliana*, mamíferos) o independientes (*D. melanogaster*, *C. elegans*) de la formación de DSBs<sup>17</sup>.

#### Zigoteno

En el zigoteno continúa la condensación de la cromatina, los homólogos siguen alineándose y se establece la unión de los elementos axiales mediante la aparición de un elemento central, constituido mayoritariamente por la proteína SYCP1 (**Figura 1.2**), para formar los SCs<sup>18</sup>. Este proceso, que está rigurosamente controlado y que presenta poca variación entre individuos, recibe el nombre de sinapsis cromosómica. Se inicia en las zonas distales y se extiende hacia los centrómeros, los cuales actúan como barrera a la propagación de la sinapsis<sup>19</sup>.

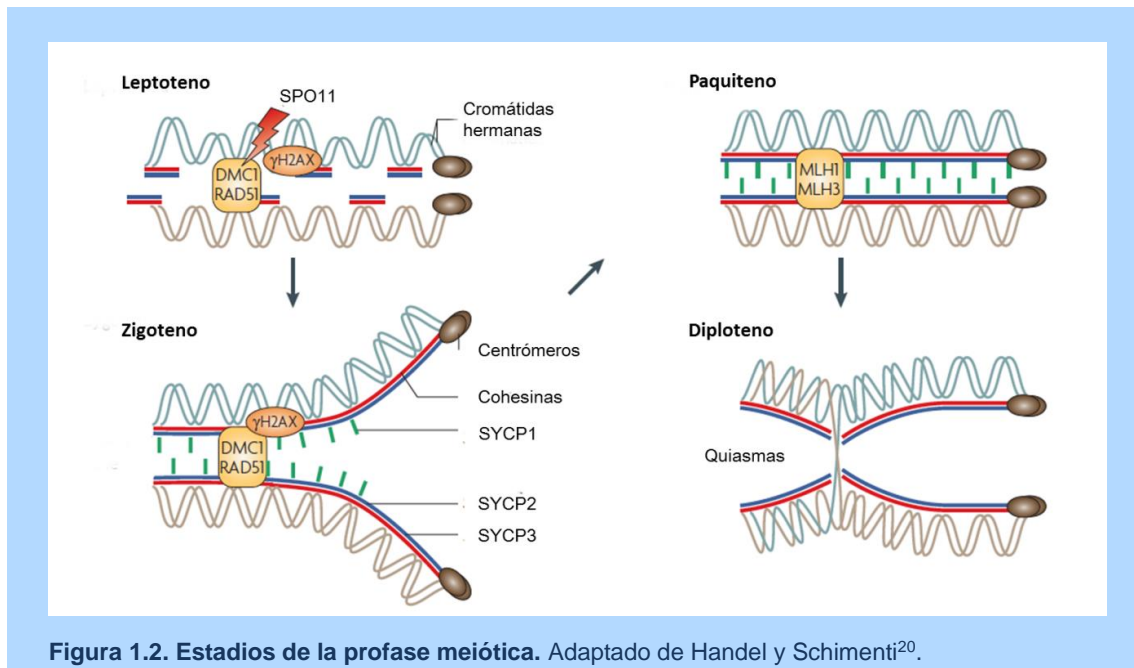


Figura 1.2. Estadios de la profase meiótica. Adaptado de Handel y Schimenti<sup>20</sup>.

### Paquiteno

Al llegar a la fase de paquiteno, todos los cromosomas homólogos han completado ya la sinapsis. Las figuras meióticas formadas por la unión de dos homólogos reciben el nombre de bivalentes. Es durante esta etapa cuando finaliza el proceso de reparación de los DSBs (Figura 1.2). A lo largo del paquiteno se observa además la presencia del cuerpo sexual, una figura meiótica que se forma como consecuencia de la falta de homología, excepto en la región pseudoautosómica (PAR, *Pseudoautosomic Region*) entre el cromosoma X y el cromosoma Y.

### Diploteno-diacinesis

La cromatina continúa con el proceso de condensación, alcanzándose el grado de compactación máximo en la siguiente fase, metafase I. Los homólogos se separan debido a la desorganización del complejo sinaptonemal y degradación de proteínas asociadas (entre ellas SYCP1) y quedan unidos únicamente por los quiasmas (expresión citológica de las zonas de CO) (Figura 1.2). Dependiendo del número de quiasmas, el bivalente adopta diferentes conformaciones.

### Metafase I

Los bivalentes se sitúan sobre la placa ecuatorial y los centrómeros de cada par de homólogos se orientan hacia polos opuestos. Debido a que la supresión de la separación de las cromátidas hermanas durante la primera división meiótica es uno de

los factores clave de la meiosis, las cromátidas hermanas quedan orientadas hacia el mismo polo. La membrana nuclear desaparece y se forma el huso.

En ratones se detectan restos de SYCP3 y cohesinas en las zonas pericentroméricas durante esta fase<sup>21</sup>.

### 1.3. EVENTOS MEIÓTICOS: RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y SINAPSIS

Tal y cómo se ha visto en el apartado anterior, durante la profase I tienen lugar los procesos de recombinación y sinapsis entre cromosomas homólogos. Diversos estudios han demostrado la importancia de dichos eventos en el proceso meiótico y su relación con posibles afectaciones en la fertilidad del individuo<sup>22</sup>.

#### 1.3.1. La recombinación meiótica

La recombinación meiótica se inicia con la formación de DSBs, catalizada por la proteína SPO11 (**Figura 1.3**)<sup>23–28</sup>. Recientemente, se ha descubierto que en humanos y ratones la localización de los DSBs viene determinada en un elevado porcentaje de los casos por la presencia de una secuencia de 13 nucleótidos en el ADN que es reconocida por la proteína PRDM9<sup>29</sup>.

Los eventos que se suceden tras la generación de los DSBs persiguen su reparación. Las células disponen de diferentes mecanismos de reparación y la decisión sobre qué mecanismo se utiliza depende principalmente de dos factores: el tipo celular y la etapa del ciclo celular<sup>30</sup>. En el caso de las células meióticas, la vía de reparación principal de los DSBs es la recombinación homóloga (*HR, Homologous Recombination*).

En la mayoría de organismos, la detección inicial de los DSBs corre a cargo de dos proteínas quinasas emparentadas y altamente conservadas: ATM y ATR, dos de los actores principales del punto de control en la respuesta al daño al ADN (**Figura 1.3**)<sup>31</sup>. El papel de ATM y ATR en la respuesta al daño al ADN es similar en meiosis y mitosis, si bien existen diferencias, sobre todo relacionadas con la formación de DSBs y el inicio del ensamblaje del SC<sup>17,32</sup>.

La proteína ATM se une al ADN con la ayuda del complejo MRE, formado por MRE11-RAD50-XRS2/NBS1, el cual se encarga, entre otros aspectos, de la regulación de la resección de los extremos 5' por parte de exonucleasas como EXO1 o SGS1-DNA2 (**Figura 1.3**)<sup>33–36</sup>. Esta resección dejará expuestos los extremos 3', a los cuales se unirá la proteína RPA, y que actuarán posteriormente como cebadores en la síntesis del ADN

(Figura 1.3). RPA juega un papel esencial en la estabilización y la eliminación de las estructuras secundarias de ADN de cadena simple (*ssDNA*, *Single Stranded DNA*)<sup>37</sup>. La estabilización del *ssDNA* mediada por RPA permite que se le una la proteína ATR a través de ATRIP<sup>38</sup> y la posterior unión de RAD51/DMC1, si bien en este aspecto la contribución de RPA es dual ya que es a la vez requisito y barrera (Figura 1.3)<sup>39-42</sup>. La formación del filamento RAD51-*ssDNA* está controlada por un equilibrio entre proteínas mediadoras, que promueven el ensamblaje, y helicasas anti-recombinogénicas, que favorecen el desensamblaje. Modificaciones post-translacionales sobre estos factores influyen sobre ambas posibilidades<sup>42</sup>. La activación completa de ATR requiere el reclutamiento del complejo 9-1-1, que es cargado independientemente en las uniones *ssDNA*-dúplex<sup>38</sup>. Una vez activas, las quinasas ATM y ATR fosforilan un gran número de sustratos entre los que se encuentran la histona H2AX y las quinasas CHK1 y CHK2<sup>43</sup>.

Durante la sinapsis, el filamento de RAD51 inicia la búsqueda de homología (en las células meióticas el molde escogido es una de las cromátidas del cromosoma homólogo) y la invasión de cadena del ADN, generando una estructura conocida como D-loop. Para realizar dichas funciones cuenta con la ayuda de la proteína RAD54, la cual contribuye a la estabilización del filamento de RAD51, a la formación del D-loop y a la transición desde el proceso de invasión del ADN hacia el proceso de síntesis de ADN al disociar RAD51 del heterodúplex<sup>44</sup>. A nivel citológico, las invasiones de cadena y los D-loops son visibles en forma de nódulos de recombinación tempranos. Los nódulos de recombinación fueron identificados inicialmente como estructuras ovoidales de alta densidad electrónica asociados a los SCs<sup>45</sup>. A lo largo de los siguientes años se observó mediante técnicas de inmunofluorescencia que existían tres tipos de nódulos: tempranos, de transición y tardíos. Estos nódulos permiten seguir el proceso de reparación y se diferencian en su composición proteica<sup>46</sup>. RAD51 y DMC1, dos enzimas de reparación del ADN, son representantes de los nódulos tempranos.

En los nódulos de transición se encuentran la proteína RPA y el heterodímero MSH4-MSH5, el cual estabiliza el producto intermedio de la recombinación homóloga<sup>47</sup> y a su vez es estabilizado por la proteína RNF212<sup>48</sup>. El número máximo de puntos de MSH4 en humanos y ratones se alcanza hacia el final del zigoteno y es similar al de RPA<sup>49,50</sup>. El heterodímero MLH1-MLH3 es el componente de los nódulos tardíos y alcanza el número máximo en el paquíteno medio<sup>51</sup>.



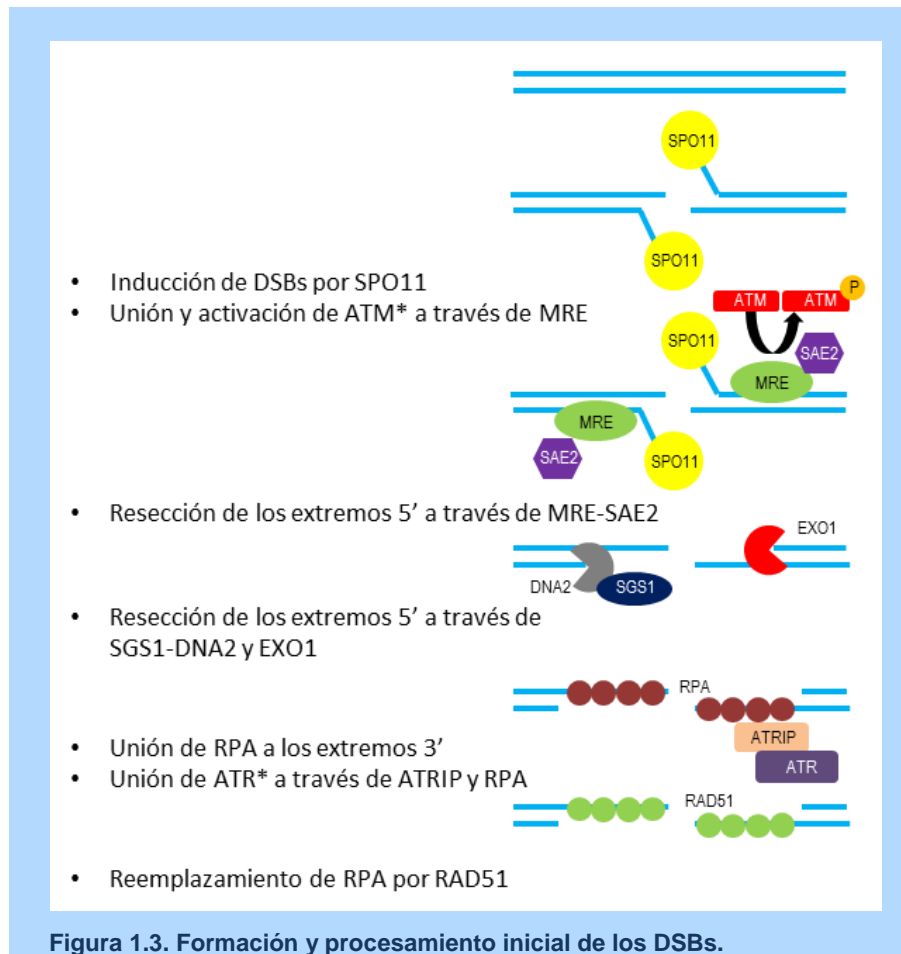
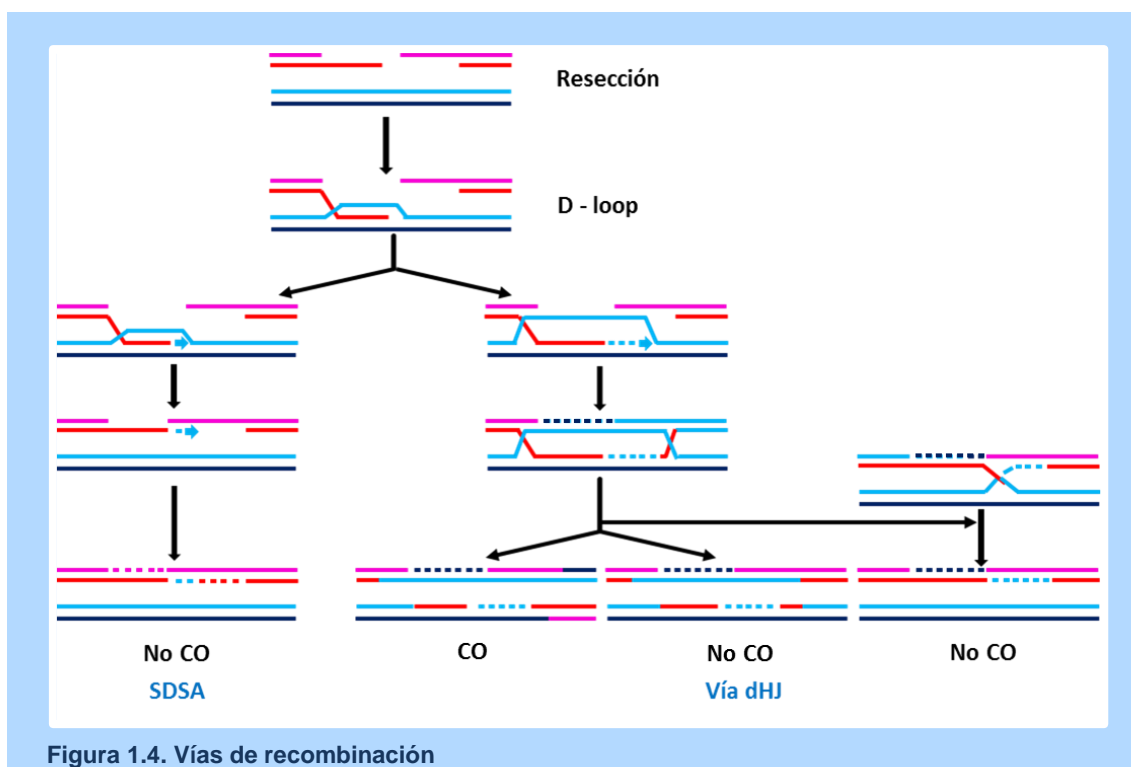


Figura 1.3. Formación y procesamiento inicial de los DSBs.

El D-loop es el punto de partida para las subvías de resolución de los DSBs en HR propuestas hasta el momento. Estas subvías comprenden la resolución en forma de CO o de no CO (nCO, *non Crossing Over*) a través de la formación de las uniones de Holliday<sup>52</sup> y la resolución en forma de nCO a través del mecanismo de unión de cadena dependiente de síntesis (SDSA, *Synthesis-Dependent Strand Annealing*) (Figura 1.4)<sup>53</sup>. Cada una de las posibles vías requiere de proteínas y enzimas específicos<sup>54-57</sup>. La existencia de estas tres vías es posible gracias a que la vía de la HR se sirve de intermediarios metaestables y reversibles que se hallan regulados de forma positiva y negativa para permitir una flexibilidad en cuanto al resultado (CO o nCO), la adaptación a los imprevistos y la recuperación de los productos intermediarios no deseados<sup>30</sup>.

A nivel citogenético molecular, la resolución de los DSBs en CO se asocia a la aparición a finales de zigoteno e inicios de paquíteno de la proteína MLH3, que se une a los nódulos de transición formados por MSH4-MSH5<sup>47,58,59</sup>. Esta proteína forma un nuevo heterodímero con MLH1, y ambas se depositan sobre los SCs, formando los nódulos tardíos y alcanzando su número más elevado en el paquíteno medio<sup>51</sup>.





El número de *foci* de MLH3/MLH1 es inferior (alrededor de 50 de media en humanos varones) al de MSH4/MSH5 (número máximo de alrededor de 190 *foci* a final del zigoteno), y se corresponde con aquellos DSBs que son reparados para generar COs y madurar posteriormente en quiasmas<sup>60-65</sup>. De hecho, en la mayoría de organismos tan sólo un pequeño porcentaje de los DSBs iniciales es reparado de tal forma que se produzca un intercambio genético; es decir, el número inicial de DSBs sobrepasa considerablemente el número final de COs (Tabla 1.2)<sup>66</sup>.

Tabla 1.2. Comparación del número de DSBs y COs, y proporción de COs interferentes en diferentes organismos

Organismo	Número DSBs	Número COs	Relación DSBs/CO	% CO interferentes
<i>S. cerevisiae</i>	160 (10)	90 (5,6)	1,8	75-85%
<i>M. musculus</i>	400 (20)	26 (1,3)	15	75-85%
<i>A. thaliana</i>	300 (60)	10 (2)	25-30	75-85%
<i>Sordaria</i>	58 (8,3)	21 (3)	2,8	75-85%
<i>D. melanogaster</i>	22 (5,5)	5 (1,2)	4,4	ND
<i>C. elegans</i>	10,5 (2,1)	5 (1)	2,1	100%
<i>S. pombe</i>	>57 (>19)	45 (15)	>1,1	0%

ND: No hay datos. Adaptada de Serrentino y Borde<sup>66</sup>

La formación de un CO viene determinada por la actuación de dos mecanismos posiblemente relacionados: interferencia y homeostasis<sup>67</sup>. El fenómeno de la interferencia se describió por primera vez el año 1916<sup>68</sup>. La definición de interferencia responde a la observación de que un evento de recombinación situado en una región cromosómica reduce la probabilidad de nuevas recombinaciones en regiones adyacentes. Hasta el momento, se ha observado en todas las especies de mamíferos estudiadas, si bien presenta valores considerablemente divergentes entre ellas, que van desde 42% en musarañas hasta 70% en ratones (**Tabla 1.3**).

**Tabla 1.3. Datos sobre la interferencia para diversas especies de mamíferos**

Especie	Interferencia (%)
Ratón <sup>5</sup>	70
Cerdo <sup>6</sup>	67,5
Musaraña <sup>7</sup>	42-55
Visón <sup>69</sup>	47
Muntíaco <sup>70</sup>	39,7
Gato <sup>9</sup>	47
Perro <sup>10</sup>	60
Humano <sup>71</sup>	68

Actualmente, se han propuesto tres modelos diferentes que intentan explicar este fenómeno, aunque no existen observaciones empíricas que favorezcan en particular a ninguno de ellos (**Figura 1.5**):

1) Modelo del estrés mecánico. Este modelo, propuesto por Kleckner y col., establece que la reestructuración de los cromosomas meióticos debida al ensamblaje del complejo sinaptonemal ocasiona tensiones mecánicas que únicamente pueden ser resueltas en regiones donde se encuentran los DSBs. La liberación de la tensión se traduce en la formación de un CO y también en la propagación de esta relajación a lo largo del cromosoma en ambas direcciones a partir del CO<sup>72</sup>.

2) Modelo de polimerización. Este modelo propone que la propagación del efecto inhibitor de un CO se realiza a partir de la polimerización de moléculas (no descritas en el modelo), las cuales desplazan las proteínas de recombinación presentes en los nódulos de recombinación cercanos. Mediante dicha polimerización se asegura que cualquier nódulo de recombinación temprano o de transición que se sitúe al alcance de

este efecto sea resuelto como nCO. La intensidad de la inhibición disminuye con la distancia respecto al CO establecido<sup>73</sup>.

3) Modelo de contaje. Este último modelo sugiere que existe una maquinaria celular de contaje, que se desplaza a lo largo del cromosoma y que es la que decide el destino de los nódulos de transición<sup>74</sup>.

Los motivos para la existencia de la interferencia no están claros. Entre las posibles causas, se postula que COs demasiado cercanos puedan influir negativamente sobre la segregación de cromosomas durante la meiosis, de manera que la existencia de interferencia suponga una ventaja selectiva<sup>75</sup>. Otra hipótesis sugiere que la interferencia en sí no es ventajosa, sino sólo un efecto secundario de otro mecanismo, aún desconocido, que actúa durante la meiosis<sup>75</sup>.

La homeostasis es el fenómeno que asegura que un número fijo del total de DSBs sea destinado a la formación de COs. Su existencia viene respaldada por la observación hecha en diferentes organismos de que una reducción inicial del número de DSBs no está asociada a una reducción del número de CO, el cual se mantiene constante<sup>76,77</sup>.

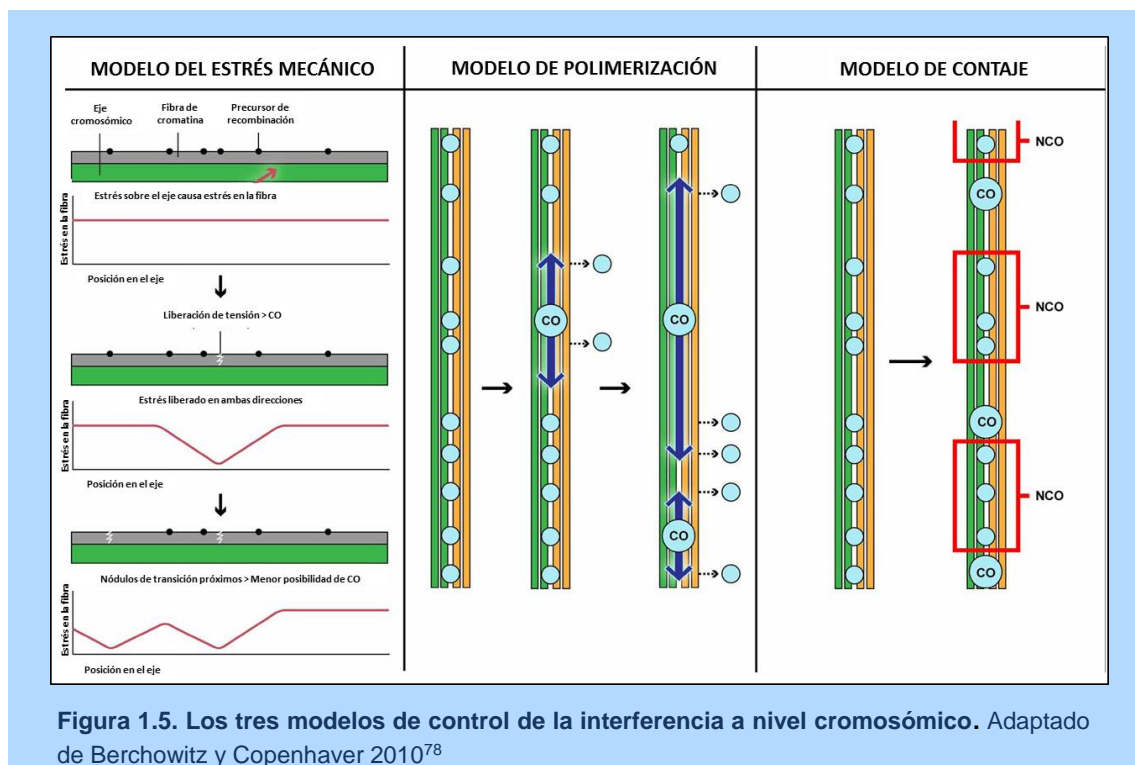


Figura 1.5. Los tres modelos de control de la interferencia a nivel cromosómico. Adaptado de Berchowitz y Copenhagen 2010<sup>78</sup>

### 1.3.2. Variación en la recombinación meiótica

La influencia de la genética sobre la tasa de recombinación se ha demostrado en estudios realizados en modelo ratón<sup>29,79-83</sup>. Koehler y col. fueron los primeros en observar la variabilidad de la tasa de recombinación en tres cepas diferentes de ratón y en proponer la influencia del *background* genético sobre la misma<sup>79</sup>. En otro estudio posterior, los autores detectaron una variación heredable considerable entre los machos híbridos F2 inter-subespecíficos de un cruce entre la cepa CAST/EiJ (*M. m. castaneus*) y PWD/PhJ (*M. m. musculus*). Gran parte de la variabilidad hallada entre los individuos F2 y los individuos F0 se atribuyó a ocho *loci* de carácter cuantitativo (**QTL**, *Quantitative Trait Loci*) con efecto moderado a grande, incluyendo dos *loci* transgresivos en el cromosoma X<sup>80</sup>.

Diversos estudios han demostrado que la tasa de COs presenta una gran variación interindividual<sup>84,85</sup>. En humanos, dicha variabilidad ha sido atribuida, en parte, a componentes genéticos heredables tales como inv17q21.31<sup>86</sup>, *PRDM9*<sup>29</sup>, *RNF212*<sup>87</sup> o *TEX1*<sup>83</sup>.

### El gen *PRDM9*

La distribución de los eventos de recombinación, tanto COs como nCOs, a lo largo del genoma no es aleatoria. Existen regiones con una elevada tasa de recombinación, conocidas como *hotspots*<sup>88,89</sup>, y otras con una tasa baja, llamadas *coldspots*. En humanos se han identificado 23.000 *hotspots* de 1-2 kb de longitud y separados aproximadamente por 50-100 kb<sup>90-92</sup>. Estos *hotspots* exhiben diferente actividad y están situados en regiones génicas e intergénicas. La evidencia acumulada apunta a que los *hotspots* son regiones con una mayor frecuencia de formación de DSBs y que la proteína PRDM9 juega un papel importante en su especificación en ratones, humanos y cerdos<sup>29,93</sup>.

PRDM9 es un miembro de la familia PRDM, una subfamilia de las proteínas con dominio SET.

El gen *PRDM9* se identificó por primera vez como un factor de transcripción que se expresa sólo en ovarios y testículos, y que controla epigenéticamente la iniciación de la meiosis<sup>94</sup>. Unos años más tarde, *PRDM9* se describió como el gen responsable de esterilidad híbrida entre subespecies de ratón doméstico *Mus musculus musculus* y *Mus musculus domesticus*<sup>95</sup>, siendo el único gen de especiación conocido hasta ahora en vertebrados<sup>96-98</sup>.

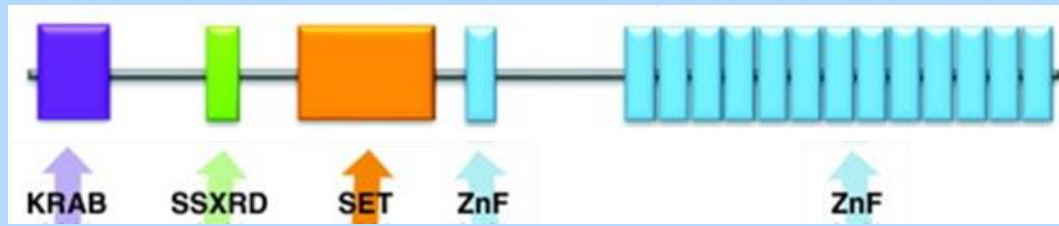


Figura 1.6. Estructura de la proteína PRDM9. Dominios más destacados de la proteína. Adaptado de Ponting<sup>97</sup>

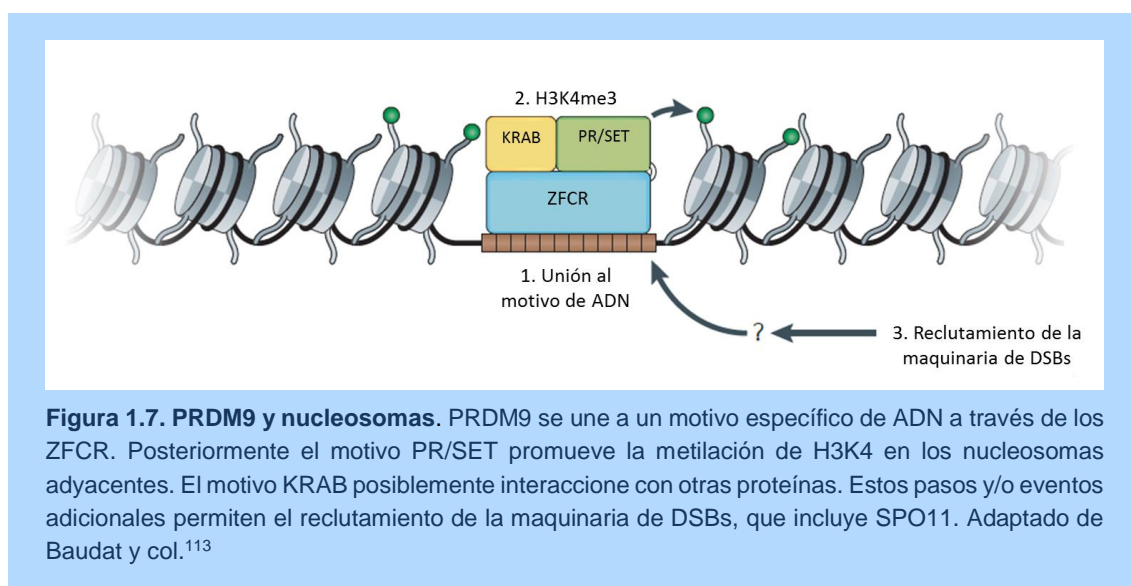
La estructura de la proteína PRDM9 se detalla en la [Figura 1.6](#). Posee un dominio KRAB N-terminal, seguido de un dominio SSX, un dominio SET con actividad H3K4 y H3K36 trimetilasa<sup>99</sup> y un *array* de dedos de zinc (*ZF*, *Zinc Finger*) altamente polimórfico en humanos, cuyo número de variantes descritas supera ya las 50<sup>29,100-105</sup>. Los polimorfismos hacen referencia a los cambios de base única (*SNP*, *Single Nucleotide Polymorphism*) que se hallan en las secuencias codificadoras de dedos de zinc (*ZFCRT*, *Zinc Finger Coding Repeat Type*), al número de ZFCRTs (de 8 a 18 en las variantes alélicas descritas hasta ahora en humanos) y a la posición de los ZFCRTs en el *array*. Los SNPs están situados principalmente en las posiciones que codifican los aminoácidos responsables de la unión específica al ADN (coordenadas -1, 3 y 6 de la hélice alfa) y en menor medida en la región de unión entre dedos de zinc adyacentes. Dichos SNPs están sometidos a una fuerte selección positiva<sup>98,106,107</sup>.

Por lo que respecta a su función en la meiosis, en los artículos más recientes la remodelación de la cromatina resultante de la trimetilación del residuo H3K4 se ha asociado más a una activación de los *hotspots* que a un efecto regulador sobre la transcripción. Es por ello que PRDM9 se ha convertido en un regulador clave en el reconocimiento de los mismos, y que toda la investigación asociada a su efecto sobre la expresión de otros genes ha pasado a un segundo plano.

Las primeras evidencias indirectas sobre dicho control de los *hotspots*, basadas en aproximaciones bioinformáticas y experimentos *in vitro*, han sido sustituidas por otras ya más precisas tanto en humanos como en ratones. En el año 2010 dos grupos de investigación<sup>29,108</sup> determinaban que el alelo más común de *PRDM9* en la población europea es capaz de unirse *in vitro* a una secuencia consenso de 13 bp presente en un 41% de los *hotspots* identificados en europeos<sup>109</sup>. Posteriormente, los resultados obtenidos en diferentes estudios demostraban diferencias en la distribución de eventos de recombinación entre individuos con diferentes alelos de *PRDM9*<sup>29,101,102,110</sup>, entre subespecies de ratón<sup>29,82</sup> y entre especies cercanas como los chimpancés y los

humanos<sup>108,111</sup>. Así por ejemplo, en uno de los estudios recientes más reveladores sobre la función de PRDM9, los autores describieron cómo en dos líneas congénicas de ratón que se diferenciaban únicamente en el número de repeticiones de ZFCRT de dicho gen (9 repeticiones vs. 13 repeticiones), los *hotspots* activados en cada caso diferían entre sí en aprox. el 99% (a la resolución de 400 bp)<sup>82</sup>.

En cuanto al posible mecanismo de actuación de PRDM9, Baker y col. demostraron que la unión de PRDM9 reorganiza activamente la cromatina en un patrón asimétrico que crea una región extensa libre de nucleosomas<sup>112</sup>. Los autores concluyeron que esta modificación en los nucleosomas crea un ambiente permisivo que primero dirige la localización de los DSBs (situados en el centro de la región libre de nucleosomas) y posteriormente define los límites de la migración de las uniones de Holliday. (**Figura 1.7**).



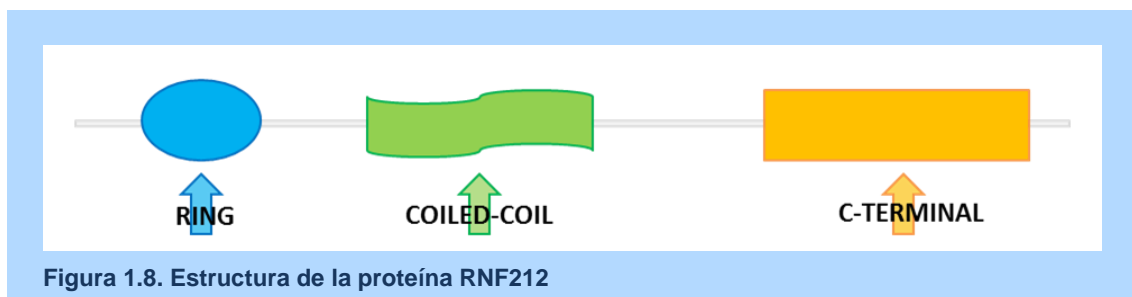
**Figura 1.7. PRDM9 y nucleosomas.** PRDM9 se une a un motivo específico de ADN a través de los ZFCR. Posteriormente el motivo PR/SET promueve la metilación de H3K4 en los nucleosomas adyacentes. El motivo KRAB posiblemente interactúe con otras proteínas. Estos pasos y/o eventos adicionales permiten el reclutamiento de la maquinaria de DSBs, que incluye SPO11. Adaptado de Baudat y col.<sup>113</sup>

Finalmente, debido a su papel fundamental en la recombinación meiótica, en los últimos años se han asociado variaciones en la secuencia de *PRDM9* con diferentes patologías de origen meiótico: infertilidad<sup>114,115</sup>, enfermedades genómicas *de novo*<sup>101,103,116</sup> y leucemia infantil<sup>104</sup>.

### El gen *RNF212*

La proteína RNF212 muestra una elevada homología con las proteínas meióticas Zip3 (*S. cerevisiae*) y ZHP-3 (*C. elegans*). Todas estas proteínas están caracterizadas por una estructura tripartita: un dominio RING (clase de enzimas E3 ligasa) en posición N-terminal, una región central de 50-100 aminoácidos con una configuración *coiled-coil* y una región C-terminal rica en serina (**Figura 1.8**)<sup>48</sup>.

Los primeros estudios sobre RNF212 asociaron esta proteína con una variación en la tasa de recombinación en humanos<sup>87,117,118</sup> y ganado<sup>119</sup>. En el estudio de Kong y col., tres SNPs en el gen *RNF212* (rs3796619, rs1670533 y rs2045065) presentaron una asociación significativa con la variación de la tasa de recombinación en humanos, tanto en hombres como en mujeres. No obstante, los tres SNPs presentaron efectos opuestos en ambos sexos. Por ejemplo, para el SNP rs3796619, el alelo T se asoció con una tasa de recombinación baja en hombres, pero elevada en mujeres. Fue también dicho SNP el que presentó la asociación más fuerte con la tasa de recombinación en hombres, resultando cada copia del alelo T, en comparación con el alelo C, en una disminución de la tasa de recombinación de 70,7 cM. Estos resultados iniciales que indicaban una relación entre variantes del gen *RNF212* y la tasa de recombinación en humanos, fueron corroborados en los estudios posteriores de Chowdhury y Fledel-Alon<sup>117,118</sup>. En el primero de estos estudios, *RNF212* fue uno de los seis *loci* asociados con fenotipos de recombinación, junto con una inversión en el cromosoma 17q21.31 y otros cuatro genes (*KIAA1462*, *PDZK1*, *UGCG* y *NUB1*). En el segundo, se replicó la asociación de *RNF212* y la inversión en el cromosoma 17q21.31, y también la de *PRDM9* con dicha variación de la recombinación.



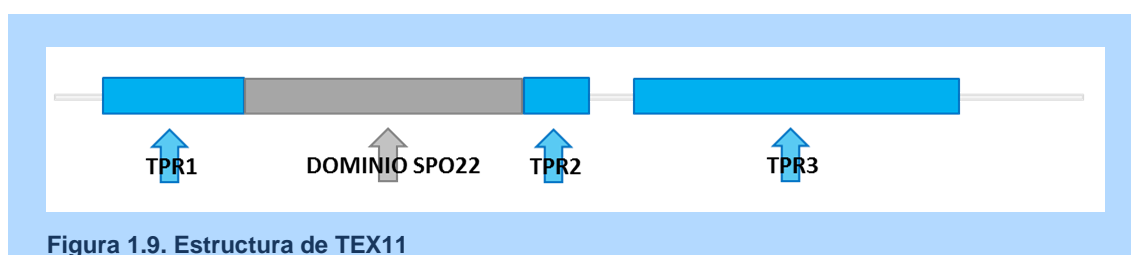
Mediante análisis inmunocitogenético Reynolds y col. demostraron que RNF212 es un factor esencial para la formación de COs durante la meiosis en mamíferos<sup>48</sup>. Según las observaciones realizadas en este estudio, en los ratones macho *Rnf212 knockout* no se encuentran células posteriores a anafase I en los testículos y las hembras adultas son infértiles a pesar de tener un gran número de ovocitos. Tanto en ovocitos como en espermatocitos de ratón, la proteína RNF212 aparece por primera vez en la transición de leptoteno a zigoteno, específicamente en las zonas de inicio de sinapsis. El número de asociaciones entre el SC y RNF212 aumenta a medida que progresa la sinapsis, quedando no obstante excluida de las regiones no sinapsadas. Durante el paquiteno inicial, RNF212 se visualiza como puntos a lo largo de los SCs (una media de 107 *foci* por célula, según estos mismos autores). En espermatocitos se observa una pérdida

precipitada de RNF212 tras el paquiteno inicial, de manera que en el paquiteno medio sólo se observan uno o dos *foci* por complejo sinaptonemal, los cuales desaparecen en el paquiteno tardío<sup>48</sup>.

Como se ha mencionado anteriormente, el modelo aceptado en la actualidad sobre la recombinación homóloga implica que la decisión sobre el método de reparación de los DSBs tiene lugar tras la formación de los D-loops. Si la decisión implica la reparación en forma de COs, se forman estructuras metaestables (los nódulos de recombinación) que permiten la consecución del intercambio homólogo, mientras que en la vía de los nCOs tiene lugar el desensamblaje de los D-loops y la unión de los extremos DSB mediante el proceso llamado SDSA<sup>30</sup>. El estudio realizado por Reynolds y col. demostró que la proteína RNF212 estabiliza de manera selectiva factores de recombinación que se hallan en dichas estructuras metaestables, tales como el dímero MSH4-MSH5, facilitando la resolución de los DSBs hacia la vía de los COs<sup>48</sup>.

### El gen *TEX11*

*TEX11* es un gen situado en el cromosoma X y expresado sólo en células germinales<sup>120,121</sup>. El papel de la proteína *TEX11* se describió por primera vez en el año 2008, cuando Yang y col. determinaron su interacción con SYCP2 para formar *foci* discretos sobre los SCs en los estadios de zigoteno y paquiteno. En estos *foci* también colocaliza con RPA pero no con DMC1 ni MLH1<sup>122</sup>, hecho que sugiere que es un componente de los nódulos de transición. La interacción con SYCP2 y la colocalización con RPA indican que posiblemente juegue un papel importante tanto en la iniciación como en el mantenimiento de la sinapsis y la formación de los COs, siendo tal vez un nexo de unión entre ambos procesos. La proteína presenta tres regiones TPR y un motivo específico de meiosis SPO22 (Figura 1.9)<sup>123</sup>.

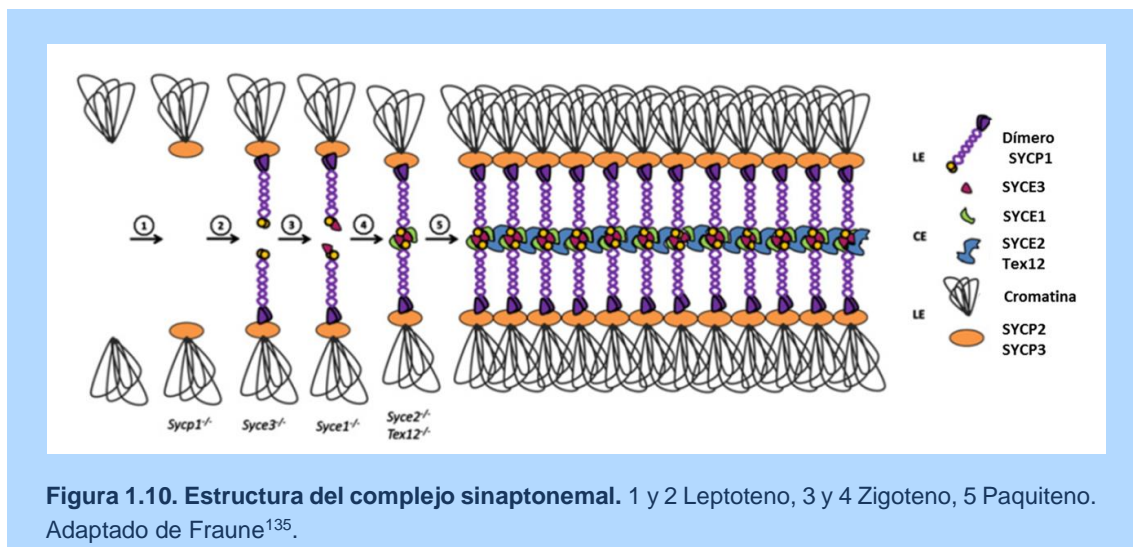


### 1.3.3. Complejo sinaptonemal (SC)

El SC es una estructura en forma de cremallera compuesta principalmente por proteínas específicas de meiosis y constituye el marco estructural que permite la recombinación.



Su ensamblaje empieza en el leptoteno con la formación de los elementos axiales (futuros elementos laterales) cuyos componentes principales son SYCP3<sup>124</sup> y SYCP2<sup>125</sup> (Figura 1.10). Al igual que en otros aspectos, la meiosis utiliza proteínas involucradas en el mantenimiento dinámico de los cromosomas meióticos, como las cohesinas, para la formación del SC. Las cohesinas juegan un papel esencial en el ensamblaje de los elementos axiales, desde levaduras<sup>13</sup>, pasando por *C. elegans*<sup>126</sup> hasta mamíferos<sup>127</sup> y algunos miembros del complejo han sido reemplazados por parálogos específicos de meiosis. Así por ejemplo, en mamíferos, el complejo formado por SCC1/RAD21 es sustituido en muchos organismos por REC8<sup>12,13,21,128,129</sup>, SCC3 por STAG3<sup>14</sup> y SMC1 por SMC1β<sup>130</sup>. Las principales funciones de los elementos axiales/laterales (cohesinas, SYCP2, SYCP3) son promover la condensación de los cromosomas, participar en el apareamiento y la sinapsis entre homólogos, intervenir en la reparación de DSBs, controlar la distribución de los puntos de recombinación meiótica y permitir la correcta estructuración del elemento central<sup>131–134</sup>.



Durante el zigoteno, los elementos axiales se alinean según homología e inician la sinapsis. Como consecuencia de ello se empieza a definir la estructura del SC maduro. En esta estructura, los elementos axiales devienen elementos laterales, los cuales se mantienen unidos por la región central formada por los elementos transversales y el elemento central<sup>136</sup>. Se han identificado los componentes de los elementos transversales en diferentes especies: Zip1p en *S. cerevisiae*<sup>137</sup>, SYCP1 en mamíferos<sup>138</sup>, C(3)G en *D. melanogaster*<sup>139</sup> y SYP-1 en *C. elegans*<sup>140</sup>. A pesar de las diferencias observadas a nivel de secuencia, estas proteínas comparten determinadas características estructurales como son el dominio *coiled-coil* en el centro de la molécula

flanqueado por grandes dominios globulares<sup>138</sup>. Dentro de la estructura del SC, estos elementos transversales forman dímeros paralelos mediante la unión de los dominios *coiled-coil*; los dominios C-terminales están situados junto a los elementos laterales; los dominios N-terminales de dímeros opuestos interactúan de forma antiparalela en el centro del SC<sup>18,141</sup>, formando el elemento central junto con SYCE1<sup>142</sup>, SYCE2<sup>142</sup>, SYCE3<sup>143</sup> y TEX12<sup>144</sup> (**Figura 1.10**). La localización de las proteínas junto con las interacciones proteicas observadas entre ellas sugieren que SYCP1, SYCE1 y SYCE3 actúan conjuntamente y son esenciales para la iniciación de la sinapsis, mientras que SYCE2 y TEX12 forman un complejo separado y promueven la propagación de sinapsis pero no son esenciales para su iniciación<sup>145</sup>.

### 1.4. EL CUERPO SEXUAL

Debido a la diferencia de tamaño y de secuencia de ADN, los cromosomas sexuales de las especies heterogaméticas suponen un reto para un proceso meiótico que se basa en el apareamiento entre homólogos y la recombinación. Las estrategias adoptadas para resolver este problema varían entre los diferentes grupos de animales y dicha variabilidad la encontramos incluso en mamíferos.

En la mayoría de los mamíferos, durante la meiosis I los cromosomas X e Y se encuentran en un territorio nuclear especializado, el cuerpo sexual<sup>146</sup>. Esta región o territorio nuclear que contiene los cromosomas sexuales se caracteriza por la represión de la transcripción y de la recombinación homóloga<sup>147</sup>. En algunas especies, además, se observa como el cuerpo sexual va adoptando diversas morfologías a lo largo del paquiteno, hecho que permite clasificar esta etapa de la profase I en paquiteno inicial, medio y tardío (**Figura 1.11**)<sup>148,149</sup>.

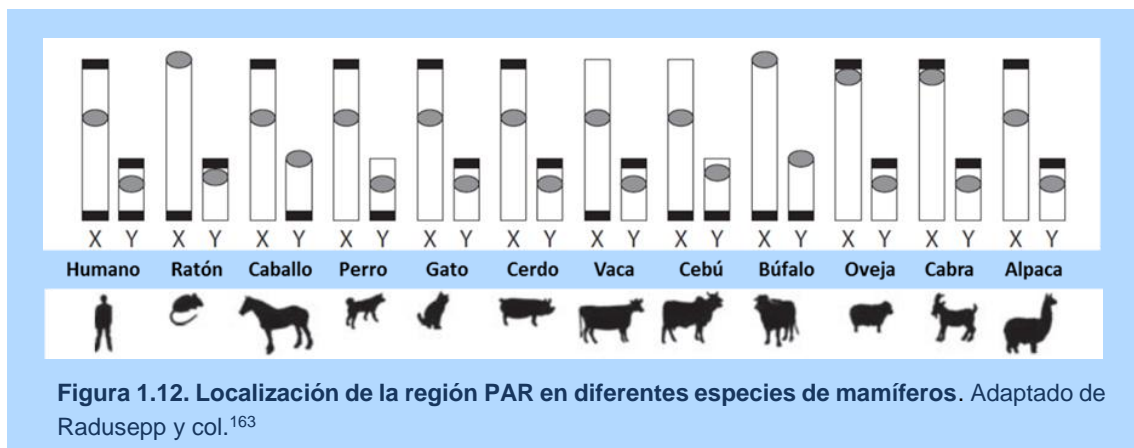


**Figura 1.11. Morfologías del cuerpo sexual observadas durante el paquiteno en humanos.**  
Rojo: SYCP3, verde: MLH1, azul: CEN. Adaptado de Codina-Pascual y col.<sup>149</sup>

#### 1.4.1. La región PAR

La única región del cuerpo sexual que escapa al fenómeno del silenciamiento transcripcional es la región PAR. Esta región, presente en placentarios y ausente en marsupiales, es la única que presenta homología de secuencia entre los cromosomas

X e Y <sup>150-155</sup> y por lo tanto está involucrada en el apareamiento, la recombinación y la segregación de los cromosomas sexuales durante la meiosis del sexo heterogamético. Se localiza en la zona terminal de dichos cromosomas, tanto en humanos como en la mayoría de especies domésticas: perros<sup>156,157</sup>, caballos<sup>158,159</sup>, cerdos<sup>160</sup>, gatos<sup>161,162</sup> (Figura 1.12).

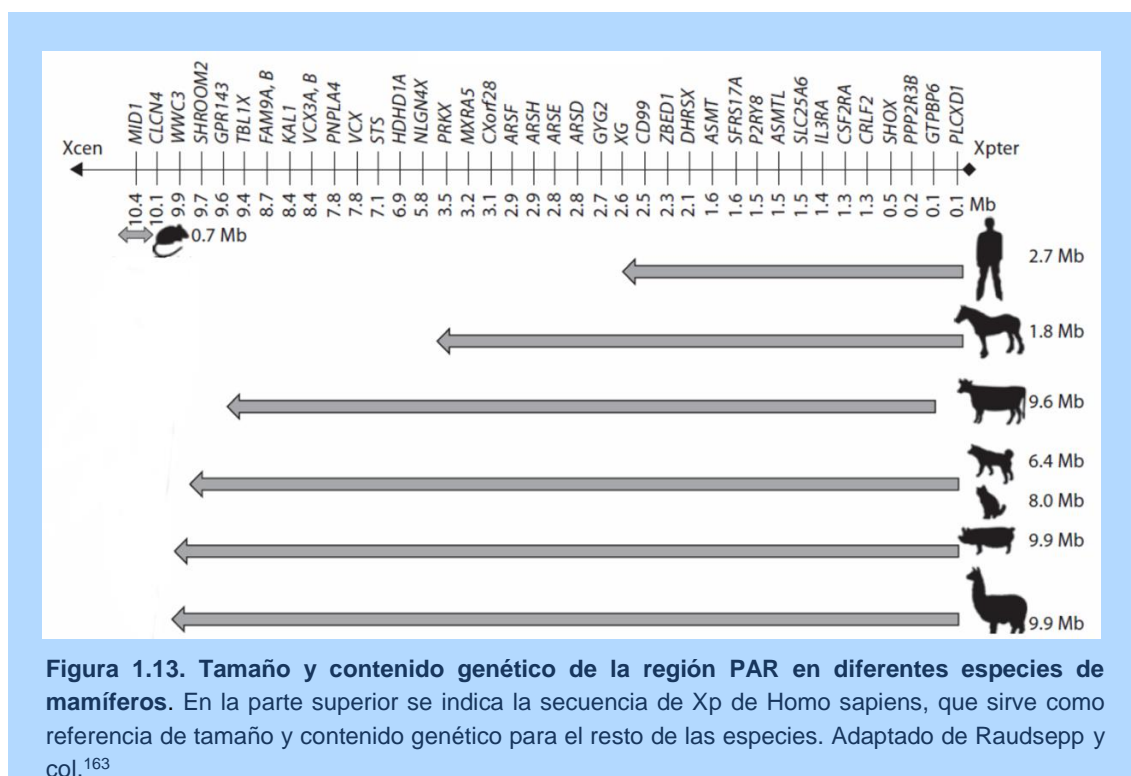


El tamaño y contenido genético de la región PAR es diferente entre las especies (Figura 1.13). El límite entre la región PAR y la región limítrofe pseudoautosómica (PAB, *Pseudoautosomal Boundary*) es una zona a lo largo de la cual disminuye la homología de secuencia entre los cromosomas X e Y, cesa la recombinación y empiezan las regiones específicas para cada uno de los cromosomas. Esta región PAB está caracterizada por la inserción de transposones<sup>164-166</sup>.

#### 1.4.2. Sinapsis del cuerpo sexual

Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, en los placentarios los cromosomas sexuales están unidos por la región PAR. En ratones y en humanos se ha confirmado la presencia del elemento transversal (SYCP1) en dicha región, confirmando que el proceso de sinapsis se realiza también en esta zona<sup>167,168</sup>. En ratones<sup>169</sup> y en perros<sup>170</sup> también se ha observado la presencia de SYCP1 en las regiones externas a la región PAR de los cromosomas sexuales. Este hecho ha sido atribuido a áreas de autosinapsis entre secuencias repetitivas a lo largo de los ejes no apareados de los cromosomas X e Y<sup>170,171</sup> o a las conformaciones particulares que adoptan los elementos laterales de los cromosomas sexuales, por ejemplo aquellas zonas en las que dichos elementos parecen separarse en filamentos discernibles mediante microscopía electrónica<sup>146,172,173</sup>(del Mazo and Gil-Alberdi 1986), y que contribuyen como marco

estructural para la deposición de SYCP1<sup>174</sup>. No obstante, en humanos no se ha observado la presencia del elemento transversal fuera de la región PAR<sup>171</sup>.



### 1.4.3. Inactivación del cuerpo sexual

El proceso de silenciamiento de la transcripción de los cromosomas sexuales durante la meiosis I de la espermatogénesis se conoce como inactivación meiótica de los cromosomas sexuales (*MSCI, Meiotic Sex Chromosome Inactivation*) y está mediado por la remodelación a gran escala de la cromatina de los cromosomas X e Y<sup>175,176</sup>. En los últimos años se ha descubierto que MSCI es una manifestación de un mecanismo meiótico de silenciamiento general conocido como silenciamiento meiótico de cromatina no sinapsada (*MSUC, Meiotic Silencing of Unsynapsed Chromatin*)<sup>177-180</sup>. Este mecanismo fue descrito por primera vez en *N. crassa* por Shiu y col.<sup>181</sup> y su existencia se ha demostrado en nemátodos y mamíferos<sup>175,180</sup>, se postula en aves<sup>182-184</sup> y parece estar ausente en levaduras, moscas y, al menos, algunas especies de plantas<sup>175</sup>.

Desde su descubrimiento, su función se ha asociado al reconocimiento de regiones de heterología para prevenir en última instancia la recombinación entre regiones ectópicas y entre cromosomas no homólogos. A pesar de compartir la misma finalidad, los efectores de este silenciamiento varían considerablemente entre los organismos. En ratones y humanos, el MSUC depende de BRCA1<sup>180</sup>, MDC1<sup>185</sup> y la fosforilación de la

histona H2AX<sup>186</sup>, hecho que ha llevado a pensar que este mecanismo es una realidad una adaptación de los mecanismos somáticos de reparación del ADN. En nemátodos<sup>175</sup> y *N. crassa*<sup>181</sup> requiere componentes de la vía del ARN de interferencia (ARNi), y en este último organismo actúa a nivel post-transcripcional.

Hasta hace poco, los errores en la sinapsis asociados con infertilidad se atribuían a la acción de puntos que controlan el progreso del proceso meiótico y llevan a la detención del proceso o a la eliminación de las células afectadas. A nivel de la gametogénesis, las consecuencias de dichos errores en la sinapsis son más graves en los mamíferos macho que en las hembras<sup>187</sup>. En machos causan subfertilidad o infertilidad (apoptosis en paquitenio o metafase I)<sup>188</sup> mientras que en hembras la fertilidad parece normal, pero la vida reproductiva es más corta<sup>189</sup>. Este hecho se relaciona con puntos de control menos eficientes durante la meiosis femenina<sup>190,191</sup>. No obstante, tanto la detención del proceso como las diferentes consecuencias observadas en ambos sexos también se pueden explicar por las diferentes consecuencias que tiene un fallo de MSUC, dependiendo tanto de su alcance como del sexo, si bien en hembras su papel es dual. Por norma general, errores leves de asinapsis asociados con MSUC llevan a una detención de la meiosis, porque el silenciamiento puede afectar a genes esenciales para el normal desarrollo de la misma. No obstante, errores graves de asinapsis tienen consecuencias diferentes en los dos sexos, que parecen estar relacionados con la cantidad de proteínas involucradas en el silenciamiento disponibles en la célula. En casos de asinapsis extensa, parece ser que no existe un reservorio suficiente de proteínas involucradas en MSUC para hacer frente a la demanda. En hembras este hecho puede hasta resultar beneficioso para el progreso de la meiosis, pues tal vez no se silencian genes cuyos productos son indispensables para dicho proceso<sup>192</sup>. No obstante, en machos un fallo en MSUC implica obligatoriamente también un fallo en MSCI, lo que lleva a la apoptosis de las células, seguramente por el efecto deletéreo que tiene la expresión de genes de los cromosomas X e Y sobre la espermatogénesis<sup>193,194</sup>. Este silenciamiento sería por lo tanto un mecanismo esencial que controla la progresión de la meiosis, la calidad de los gametos y que serviría como defensa contra aneuploidías.

### 1.5. INFERTILIDAD

La infertilidad es una enfermedad multifactorial que afecta aproximadamente a un 15% de las parejas en edad reproductiva<sup>195</sup>. En un 40% de los casos, las causas de la infertilidad son atribuibles al varón<sup>196</sup>. Puede definirse como la incapacidad de conseguir o completar un embarazo tras un período de un año de mantener relaciones sexuales sin medidas anticonceptivas. Existen múltiples causas para explicar el origen de la

infertilidad y en la literatura se encuentran varios tipos de clasificación dependiendo del enfoque de dichas causas.

Al igual que otras enfermedades multifactoriales, en su aparición intervienen tanto factores medioambientales como anomalías y/o variantes genéticas y/o epigenéticas, hecho que dificulta considerablemente la determinación de su etiología. Una revisión del año 2007<sup>197</sup> indicaba que el origen genético se había podido identificar en aproximadamente un 15% de los individuos infértiles. No obstante, cabe esperar que este porcentaje aumente en los próximos años, ya que el análisis minucioso de los datos existentes junto con los avances tecnológicos, especialmente en métodos de secuenciación de nueva generación (NGS, *Next Generation Sequencing*), en *arrays* de expresión, en el uso de ratones transgénicos<sup>198</sup> y en estudios de asociación del genoma completo (GWAS, *Genome Wide Association Studies*), posiblemente lleve a determinar el origen genético de casos de infertilidad clasificados actualmente como idiopáticos.

### 1.5.1. Causas de la infertilidad

Si bien las causas de la infertilidad son muy variadas, algunos artículos las clasifican de acuerdo con las siguientes categorías: producción defectuosa de gametos (los problemas que desembocarán en la infertilidad se pueden originar en cualquiera de las fases de la espermatogénesis y ovogénesis), obstrucción del tracto reproductivo, inflamación o disfunción inmunológica y alteraciones sexuales<sup>199</sup>.

En el caso de los varones, se calcula que aproximadamente la mitad de los casos de infertilidad se deben a la producción defectuosa de espermatozoides: bloqueo completo de la espermatogénesis, bajo número de espermatozoides, motilidad, morfología y/o función anormales de los mismos<sup>195</sup>. Estas anomalías se relacionan con una serie de fenotipos que se encuentran habitualmente en los pacientes infértiles (**Tabla 1.4**), y en la mayoría de los casos no existe información sobre el origen de las mismas.

En las últimas décadas, diferentes grupos de investigación han centrado sus trabajos en la relación entre anomalías genéticas e infertilidad. Las causas genéticas mejor documentadas de la infertilidad masculina incluyen las microdeleciones en el cromosoma Y<sup>200</sup>, las anomalías cromosómicas<sup>201</sup> y las mutaciones del gen *CFTR*<sup>202</sup>.

Tabla 1.4. Análisis seminal.

Nombre	Descripción
Oligozoospermia	Concentración de espermatozoides <math><15 \times 10^6/\text{ml}</math>; número total de espermatozoides <math><30 \times 10^6/\text{ml}</math>
Astenozoospermia	<math><32\%</math> espermatozoides progresivamente móviles
Teratozoospermia	<math><4\%</math> espermatozoides morfológicamente normales
Oligo-asteno-teratozoospermia	Anomalías en los tres parámetros
Azoospermia	Ausencia de espermatozoides en el eyaculado
Criptozoospermia	Espermatozoides ausentes en preparación fresca, pero observados en pellet centrifugado
Aspermia	Ausencia de eyaculado
Leucospermia	>math>1 \times 10^6/\text{ml}</math> leucocitos en el eyaculado

Nomenclatura empleada según la Organización Mundial de la Salud (2010)

### Microdeleciones en el cromosoma Y

El cromosoma Y contiene genes esenciales para la espermatogénesis y el desarrollo correcto de las gónadas masculinas. Las microdeleciones en el cromosoma Y son la causa genética principal de infertilidad, con una prevalencia del 10-15% en los casos de azoospermia no obstructiva (NOA, *Non Obstructive Azoospermia*) y un 5-10% en los casos de oligospermia severa<sup>203</sup>.

Existen tres regiones en el brazo largo del cromosoma Y (Yq) que se han definido como 'loci de espermatogénesis': AZFa, AZFb y AZFc<sup>204</sup>. Las deleciones completas en la región AZFa se asocian con la ausencia de células germinales<sup>205,206</sup>, las deleciones en la región AZFb provocan un bloqueo de la espermatogénesis en los espermatoцитos primarios<sup>206</sup>, y las deleciones de la región AZFc presentan un fenotipo más variable<sup>207</sup>.

### Anomalías cromosómicas

Las anomalías cromosómicas son relativamente comunes en humanos y se encuentran entre las causas genéticas más frecuentes de infertilidad, de abortos espontáneos recurrentes y de nacimiento de descendencia afectada<sup>208-211</sup>. La frecuencia de anomalías cromosómicas somáticas en hombres infértiles varía desde un 3% en los casos de infertilidad leve hasta un 19% en los casos de NOA<sup>212</sup>. Las anomalías cromosómicas se clasifican en numéricas y estructurales



### Anomalías numéricas

Los individuos con un cariotipo 47, XYY o síndrome de Klinefelter representan la aneuploidía más frecuente en pacientes varones infértiles, con una incidencia del 0,3%, que es entre 3-5 veces superior a la descrita en la población general<sup>213</sup>.

Los pacientes con el síndrome de Klinefelter o variaciones en mosaico de dicho síndrome presentan una espermatogénesis comprometida, con oligozoospermia severa o azoospermia. El bloqueo de la espermatogénesis suele suceder en las fases iniciales de la meiosis<sup>214</sup>, aunque se ha descrito que un porcentaje bajo puede presentar espermatozoides en el eyaculado<sup>197</sup>.

### Anomalías estructurales

Las anomalías cromosómicas estructurales más frecuentes en humanos son las translocaciones robertsonianas, las translocaciones recíprocas y las inversiones. La presencia de cromosomas derivativos altera el apareamiento y la segregación de los cromosomas homólogos durante la meiosis<sup>59,215-219</sup>. Como consecuencia, se pueden producir gametos portadores de anomalías cromosómicas, hecho que aumenta el riesgo de abortos o descendencia afectada. Paralelamente, el proceso de la gametogénesis masculina también puede perturbarse y ocasionar una reducción en el número de gametos (oligospermia), o incluso su ausencia total (azoospermia)<sup>218</sup>.

### Mutaciones genéticas más frecuentes

Las mutaciones más frecuentes en individuos con problemas de fertilidad son las que afectan al gen *CFTR*. Dichas mutaciones son responsables de la fibrosis quística, y una de sus manifestaciones es la ausencia de los conductos deferentes en los testículos. Entre un 60 y un 90% de los casos de pacientes infértiles con ausencia de los conductos deferentes son portadores de dicha mutación<sup>220</sup>.

Las mutaciones en el gen *AR*, situado en el cromosoma X, causan una variedad de defectos conocidos colectivamente como síndrome de insensibilidad androgénica. Su producto, el receptor de andrógenos, juega un papel muy importante en la progresión meiótica y, posiblemente, en la formación de espermátidas redondas<sup>221</sup>. Mutaciones en *AR* causan azoospermia<sup>222</sup> y afectan al 2% de la población de pacientes infértiles<sup>223</sup>.

### Mutaciones que afectan a la sinapsis y a la recombinación meiótica

En la década de los ochenta, varios estudios asociaron la presencia de ciertas anomalías sinápticas con la infertilidad que padecían los pacientes analizados<sup>224-226</sup>.



Entre las anomalías sinápticas descritas en estos trabajos se encontraron *gaps* (discontinuidades a lo largo del complejo sinaptonemal), asinapsis o *splits* (elementos laterales no unidos por elemento central o bucles) y complejos irregulares (elementos laterales que están unidos de forma irregular por el elemento central a lo largo de toda su longitud). Estudios posteriores en humanos y también en modelo ratón, han confirmado que la presencia de errores en la sinapsis se relaciona con apoptosis de espermatoцитos en fase de paquiteno o de metafase I, con la consecuente afectación en la fertilidad del individuo<sup>194</sup>. El grado de dicha afectación incrementa proporcionalmente según se aumenta el grado de asinapsis<sup>227</sup>.

La recombinación meiótica es necesaria para asegurar la correcta segregación de los cromosomas homólogos en la meiosis I y para generar variabilidad. En ratones y otros modelos animales se ha observado que tanto una reducción de la tasa de recombinación<sup>133,228</sup> como una localización incorrecta de estos puntos<sup>229</sup> están asociadas a un aumento de la no disyunción de los cromosomas homólogos en la anafase I, generando gametos con aneuploidías. Ambos tipos de defectos también han sido asociados con aneuploidías en humanos: reducción de la recombinación<sup>230</sup> y variación en la localización de estos puntos<sup>231,232</sup>. Casos extremos en la reducción de la recombinación se han asociado también con casos de azoospermia en algunos pacientes<sup>233,234</sup>.

En las últimas décadas, varios estudios han asociado la presencia de mutaciones en genes responsables de estos procesos con infertilidad, en modelo animal y también en humanos<sup>235</sup>. La Tabla 1.5 presenta un resumen de los diferentes estudios y los genes implicados en recombinación y sinapsis cuya mutación se ha asociado a infertilidad o esterilidad en modelo animal.

Hasta el momento, son pocos los estudios realizados en humanos que hayan encontrado mutaciones causales en algunos de los genes mencionados en la [Tabla 1.5](#). No obstante, la presencia de fenotipos meióticos similares en algunos pacientes azoospermicos, como el que se describe posteriormente en nuestro estudio, sugieren la presencia de mutaciones causales y mínimamente recurrentes<sup>236–239</sup>. Así por ejemplo, en el estudio de Miyamoto y col. se describe una mutación del gen *SYCP3* como la probable causa de azoospermia en dos individuos infértiles. La mutación descrita generaba un codón de stop prematuro, resultando en una proteína con poca afinidad por la proteína normal que interfería en la formación de las fibras de SYCP3<sup>239</sup>. Los ratones macho *knockout* para *Sycp3* son infértiles y presentan un bloqueo en el zigoteno (momento en el cual se forman los elementos axiales)<sup>133</sup>.

En el caso concreto del gen *PRDM9*, los ratones *knockout* para dicho gen son infértiles (ambos sexos) debido a problemas de apareamiento de homólogos y formación del cuerpo sexual<sup>94</sup>. En humanos, dos artículos determinaron la presencia de polimorfismos de base única en este gen asociados con azoospermia NOA<sup>114,115</sup>. La implicación de *PRDM9* en infertilidad podría deberse tanto a mutaciones tanto en la región codificante como no codificante que alteraran sus funciones como a la existencia de variantes polimórficas asociadas a una baja tasa de recombinación<sup>81</sup>.

En lo referente a la relación del gen *TEX11* con infertilidad, en el estudio realizado por Yang y col. en modelo ratón la pérdida de *TEX11* causó asinapsis cromosómica y formación reducida de COs, resultando en la eliminación de los espermatozoides en paquiteno y anafase I<sup>122</sup>. En otro estudio del mismo año, los autores observaron que los ratones eran fértiles y que sólo presentaban problemas en la reparación de los DSBs y la regulación de COs<sup>121</sup>. Estas divergencias de fenotipos entre ambos estudios se deben posiblemente a la eficacia diferencial del gen *knockout* (alelo nulo vs. hipomórfico). En el primero de los estudios, los investigadores delecionaron 27 de los 30 exones del gen<sup>122</sup>, mientras que en el segundo tan sólo delecionaron el exón 3<sup>121</sup>. Posteriormente, este gen se ha asociado con rasgos de fertilidad masculina en bueyes<sup>240,241</sup>, cerdos<sup>242</sup> y humanos<sup>83,123</sup>. En este último organismo, los dos estudios publicados hasta el momento han determinado que mutaciones hemizigóticas de *TEX11* son una causa común de bloqueo meiótico y azoospermia en hombres infértiles<sup>83,123</sup>. Además, un estudio posterior de Yang y col. observó que los niveles de *TEX11* modulan la tasa de recombinación en ambos sexos<sup>83</sup>. Por ello, los autores propusieron que diferentes niveles de expresión de *TEX11* o sustituciones únicas de aminoácidos pueden contribuir a las diferentes tasas de recombinación entre sexos y entre individuos, y que por lo tanto alelos *TEX11* de baja expresión podrían ser una causa genética de la infertilidad en humanos

Tabla 1.5. Genes involucrados en recombinación y sinapsis y su relación con problemas de fertilidad en modelo ratón.

Gen	Función	Fenotipo	Fertilidad
Spo11	Formación de DSBs	Formación de DSBs e inicio de recombinación defectuosos	*, +
Mei1	Formación de DSBs	Formación de DSBs e inicio de recombinación defectuosos	*, +
Atm	Detección y reparación de DSBs	Sinapsis defectuosa y fragmentación cromosómica	*, +
Dmc1	Recombinación meiótica	Sinapsis defectuosa	*, +
γH2AX	Ensamblaje de complejos de reparación de DSBs	Bloqueo meiótico en paquitenio	*, #
Trip13	Recombinación meiótica y reparación de DSBs	Reparación de DSBs defectuosa	*, +
Mlh1	Reparación mismatch	Recombinación meiótica defectuosa	*, +
Mlh3	Reparación mismatch	Sinapsis defectuosa	*, +
Pms2	Reparación mismatch	Sinapsis defectuosa	*
Msh4	Reparación mismatch	Sinapsis defectuosa	*, +
Msh5	Reparación mismatch	Sinapsis y formación de SCs defectuosas	*, +
Exo1	Reparación mismatch	Pérdida dinámica de quiasmas y apoptosis	*, +
Cdk2	Regulación del ciclo celular	Bloqueo meiótico en profase I y atrofia de testículos y ovarios	*, +
Ccna1	Regulación del ciclo celular	Bloqueo meiótico en profase I y aumento de apoptosis de células germinales	*
Fkbp6	Sinapsis de cromosomas homólogos	Bloqueo meiótico en paquitenio	*
Psmc3ip	Sinapsis de cromosomas homólogos	Bloqueo meiótico	*, +
Dnmt3l	Metilación del ADN	Bloqueo meiótico y defectos epigenéticos	*
Siah1	Ubiquitinación y degradación proteica	Bloqueo meiótico en profase I	*, #
Prdm9	Determinación y activación <i>hotspots</i>	Sinapsis y formación del cuerpo sexual defectuosos	*, +
Rec8	Formación SC	SCs defectuosos	*, +
Rnf212	Estabilización nódulos recombinación	Bloqueo meiótico	*, +
Sycp1	Ensamblaje SC, recombinación y formación del cuerpo sexual	Sinapsis defectuosa	*, +
Sycp2	Ensamblaje SC y sinapsis	Sinapsis defectuosa	*, #
Sycp3	Formación elementos laterales/axiales, SC y sinapsis	Elementos laterales/axiales y sinapsis defectuosos	*, #
Syce1	Reparación de DSBs	Reparación de DSBs defectuosa	*, +
Syce2	Formación SC, recombinación y reparación de DSBs	Sinapsis y formación del cuerpo sexual defectuosos	*, +
Smc1b	Segregación de cromosomas	Cohesión de cromátidas hermanas y sinapsis defectuosos	*, +
Eif4g3	Regulación de la traducción	Bloqueo meiótico	*
Tex11	Iniciación y mantenimiento de la sinapsis y formación de los COs	Bloqueo meiótico	*

\*: Infertilidad masculina, +: Infertilidad femenina, #: Fertilidad reducida en hembras. Adaptado de Jamsai <sup>235</sup>



## **2. OBJETIVOS**



## HIPÓTESIS

La hipótesis general del presente trabajo establece que el análisis genético e inmunocitogenético de la meiosis aporta información sobre los procesos meióticos de recombinación y sinapsis, además de ayudar a determinar problemas en la fertilidad en determinados pacientes. Esta hipótesis general se desglosa en los siguientes apartados:

1. Anomalías en los procesos meióticos de recombinación y sinapsis pueden ocasionar alteraciones que afecten a la fertilidad del individuo y a la probabilidad de transmisión de síndromes *de novo* a la descendencia. Dichas anomalías podrían ser causadas por mutaciones en genes involucrados en dichos procesos, tales como el gen *PRDM9*.
2. La comparación de los procesos de recombinación y sinapsis entre diferentes especies de mamíferos puede ayudar a conocer mejor ambos procesos.

## OBJETIVOS

1. Identificar mediante técnicas de inmunocitogenética alteraciones en los procesos de recombinación y asinapsis que estén asociadas con problemas en la fertilidad.
2. Determinar si existen fenotipos recurrentes de recombinación y sinapsis asociados a infertilidad.
3. Determinar si técnicas de NGS pueden ser útiles para analizar las causas genéticas de los fenotipos recurrentes de recombinación y sinapsis asociados a infertilidad.
4. Determinar si existe una asociación entre el genotipo de *PRDM9* y enfermedades de origen meiótico: infertilidad y síndromes *de novo*.
5. Determinar la influencia de polimorfismos genéticos sobre la tasa de recombinación, en concreto polimorfismos en los genes *PRDM9* y *RNF212*.
6. Analizar los procesos de recombinación y sinapsis en tres especies de mamíferos (humanos, gatos y perros) para detectar paralelismos y divergencias que ayuden a conocer mejor ambos procesos.





## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 3.1. ANÁLISIS INMUNOCITOGÉNÉTICO

### 3.1.1. Material biológico

Las biopsias testiculares humanas (3-4 mm<sup>3</sup>) se obtuvieron mediante intervención quirúrgica con anestesia local en pacientes infértiles e individuos control sometidos a orquiectomía. Los pacientes habían acudido a la consulta del Servicio de Reproducción del Hospital Universitario Son Espases (HUSE) por problemas de fertilidad (a partir de septiembre del 2011) y habían sido diagnosticados con NOA (n=6; i9, i11, i12, i14, i18, i20) o azoospermia obstructiva (*OA, Obstructive Azoospermia*) (n=6; i10, i13, i15, i16, i17, i21). Los individuos control (n=4; 2 hidrocele (HC1, HC2) y 2 tumor testicular (TB1, TB2)) fueron reclutados en el Servicio de Urología del mismo hospital. Todos ellos firmaron un consentimiento informado de acuerdo con la normativa del Comité Ético de Investigación Clínica. Tras la intervención, las muestras se mantuvieron en solución isotónica (PBS 1x) a 4 °C un máximo de 15 minutos hasta su procesamiento.

Las biopsias testiculares de 21 gatos (*Felis catus*), de edades comprendidas entre 4 y 12 meses, y de 6 perros (*Canis lupus familiaris*), de edades comprendidas entre 5 y 12 meses, se obtuvieron tras castración rutinaria en clínicas veterinarias de Mallorca.

Los cariotipos de las especies analizadas son los que se detallan a continuación (FNa: número diploide de brazos autosómicos):

- Gatos: 2n=38, FNa=68. 18 pares de autosomas de los cuales 8 metacéntricos, 8 submetacéntricos y 2 acrocéntricos
- Perros: 2n=78, FNa=76. 38 pares de autosomas siendo todos acrocéntricos.
- Humanos: 2n=46; FNa=78. 22 pares de autosomas, de los cuales 5 metacéntricos, 12 submetacéntricos y 5 acrocéntricos.

### 3.1.2. Materiales y reactivos

Los reactivos y materiales utilizados para el tratamiento de las biopsias testiculares se detallan en la [Tabla 3.1](#). Las soluciones utilizadas se detallan en las [Tablas 3.2, 3.3 y 3.4](#).

### 3.1.3. Metodología

#### Obtención de núcleos meióticos

El protocolo empleado permite una extensión óptima y uniforme de las células, que se caracteriza por una menor superposición de los SCs. La incubación del tejido en un medio hipotónico debilita las uniones intercelulares y la fijación en una cámara húmeda

con una solución fijadora de pH 9,2 permite la detección de las proteínas mediante anticuerpos específicos.

**Tabla 3.1. Reactivos y material para el procesamiento de las biopsias testiculares**

<b>Kits y reactivos</b>	<b>Fabricante</b>
Ácido bórico	Sigma
Ácido cítrico	Sigma
DTT	Sigma
EDTA	Sigma
Isopropanol	Sigma
NaOH	Sigma
PMSF	Sigma
Sacarosa	Fluka
Tris	Sigma
Triton-X	Sigma
<b>Aparataje y material</b>	<b>Fabricante, modelo</b>
Cámara húmeda	Fabricación propia
Coplins	
Lupa	Nikon SMZ-645
Microscopio de contraste de fases	Nikon Eclipse TS100
Pinzas nº 5	
Pipetas (1 ml, 100 µl, 10 µl)	Eppendorf
Placas de Petri (8,8 cm <sup>2</sup> )	Nunc®
Portaobjetos	Menzel Gläser (Thermo Scientific)
Tijeras de disección	

**Tabla 3.2. Soluciones para el procesamiento de las biopsias testiculares**

<b>Solución</b>	<b>Composición</b>
600 mM Tris pH 8,2 (4 °C)	25 ml * (0,6 mol/1000 ml) * 121,1 g/mol = en ddH <sub>2</sub> O
500 mM Sacarosa (4 °C)	10 ml * (0,5 mol/1000 ml) * 342,3 g/mol = en ddH <sub>2</sub> O
170 mM Ácido cítrico (4 °C)	10 ml * (0,17 mol/1000 ml) * 294,1 g/mol = en ddH <sub>2</sub> O
500 mM EDTA (4 °C)	25 ml * (0,5 mol/1000 ml) * 372,2 g/mol = en ddH <sub>2</sub> O Ajustar pH a 8,0 para facilitar disolución
500 mM DTT (-20 °C)	25 ml * (0,5 mol/1000 ml) * 154,3 g/mol = en ddH <sub>2</sub> O
50 mM PMSF (-20 °C)	25 ml * (0,05 mol/1000 ml) * 174,2 g/mol = en isopropanol

**Tabla 3.3. Solución hipotónica de extracción.**

10 ml como se indica en la siguiente tabla, ajustando pH a 8,2-8,4

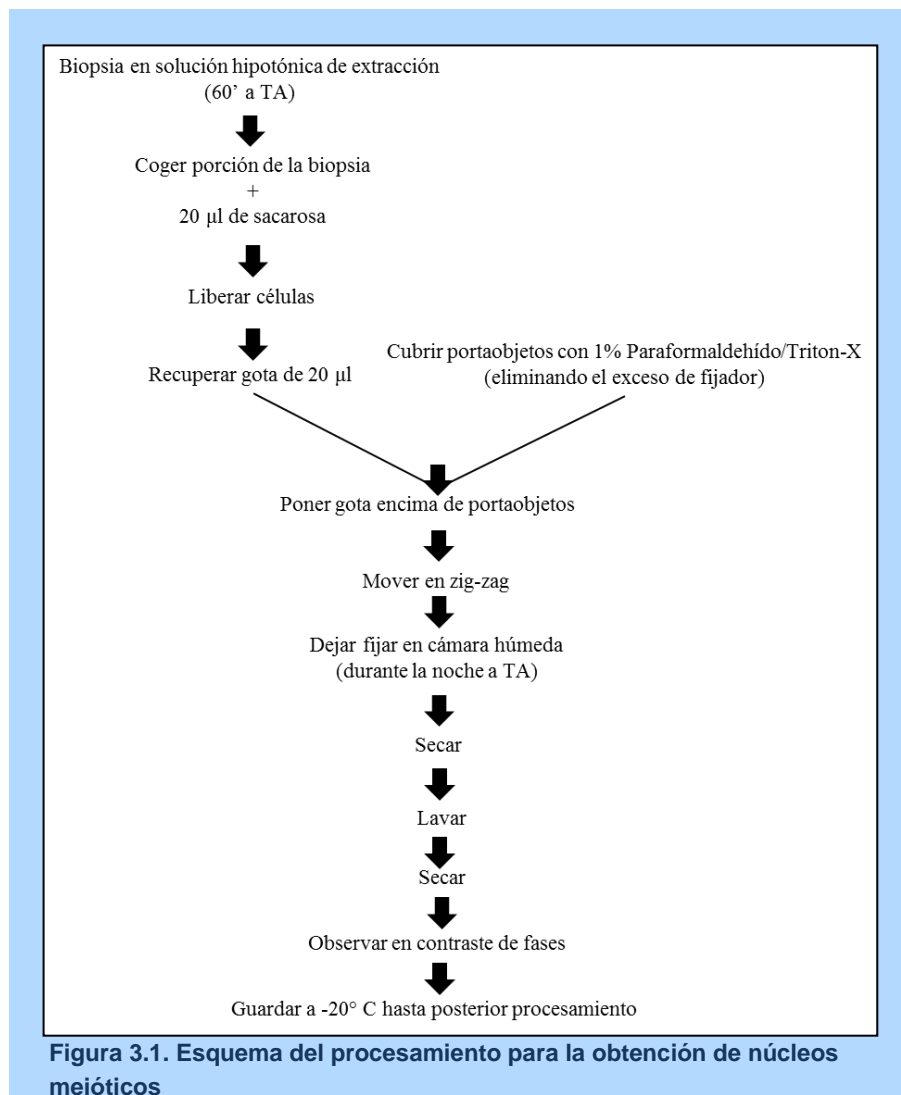
Concentración final	Solución stock	Volumen
30 Mm	600 mM Tris pH 8,2	500 µl
50 Mm	500 mM Sacarosa	1 ml
17 Mm	170 mM Ácido cítrico	1 ml
5 mM	500 mM EDTA	100 µl
1,5 mM	500 mM DTT	50 µl
0,5 mM	50 mM PMSF	100 µl
ddH <sub>2</sub> O		6,25 ml

**Tabla 3.4. Otras soluciones**

Solución	Composición
Sacarosa 100 mM	A partir de la solución stock mezclar 100 µl de 500 mM sacarosa con 400 µl de ddH <sub>2</sub> O.
1% Paraformaldehído/ Triton-X (Solución fijadora)	Disolver 0,25 g de paraformaldehído en 20 ml de ddH <sub>2</sub> O, añadir una gota de NaOH 1 M y calentar a 65 °C hasta que se disuelva. Dejar atemperar antes de medir pH. Ajustar el pH a 9,2 con una solución de ácido bórico 50 mM. Añadir 40 µl de Triton-X y enrasar a 25 ml con ddH <sub>2</sub> O.
0.04% Triton-X (Solución de lavado)	Disolver 25 µl de Triton-X en 50 ml de ddH <sub>2</sub> O.

El fragmento de biopsia testicular fue transferido a una placa de Petri pequeña con solución hipotónica y se separaron ligeramente los túbulos seminíferos utilizando dos pinzas. La muestra se incubó 1 hora en esta solución hipotónica, hecho que facilita la posterior obtención de una suspensión celular. Sobre un portaobjetos limpio se pipeteó una gota de 20 µl de sacarosa 100 mM a la cual se transfirió un fragmento del tejido testicular. Bajo la lupa y con dos pinzas se rasgaron los túbulos seminíferos durante aproximadamente 30 segundos para obtener una suspensión celular. Los túbulos seminíferos fueron retirados a una esquina del portaobjetos para que no interfirieran en la recolección de la suspensión celular con una micropipeta. Dicha suspensión se repartió sobre un portaobjetos previamente cubierto con una fina capa de una solución fijadora de PFA al 1% con detergente (Triton X). La muestra se colocó inmediatamente en una cámara húmeda y se incubó a temperatura ambiente (TA) durante la noche con el objetivo de ralentizar el proceso de secado y obtener una mejor extensión de los núcleos meióticos. A la mañana siguiente, el portaobjetos se extrajo de la cámara y se

permitió que se secase al aire durante unos 10 minutos. Finalmente, la muestra se lavó durante 4 minutos en la solución de lavado y se secó al aire (**Figura 3.1**).



**Figura 3.1. Esquema del procesamiento para la obtención de núcleos meióticos**

Las muestras fueron escaneadas mediante microscopio de contraste de fases para comprobar la correcta extensión de los núcleos meióticos y fueron posteriormente guardadas a -20 °C hasta su utilización.

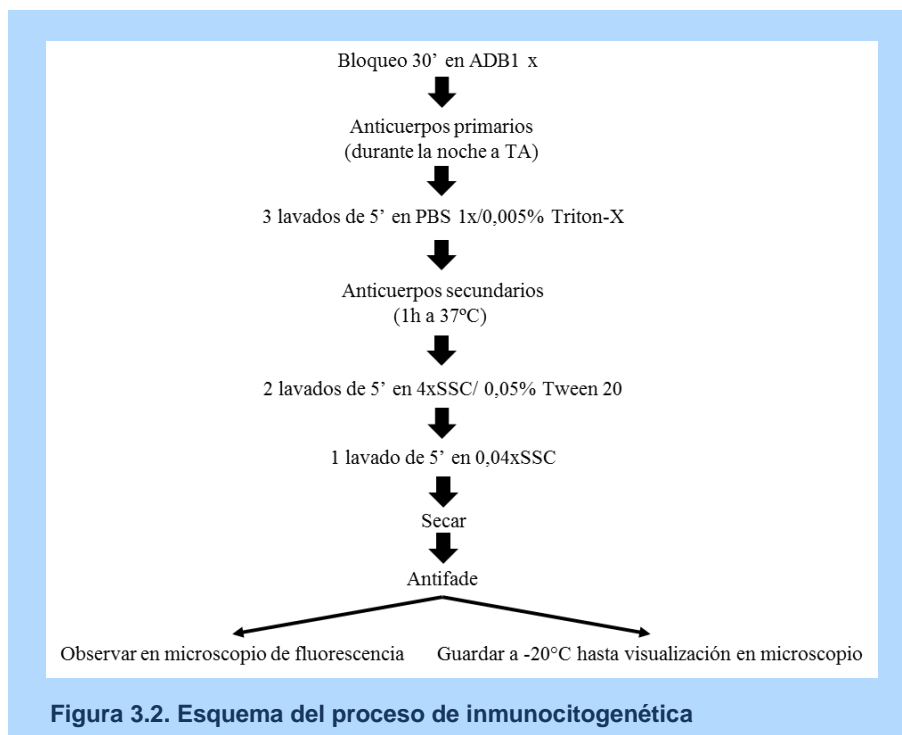
### Inmunocitogenética

Los reactivos y materiales utilizados para la inmunocitogenética (ICG) se detallan en la **Tabla 3.5**. Las soluciones y anticuerpos utilizados se detallan en las **Tablas 3.6, 3.7 y 3.8**.

**Tabla 3.5. Reactivos y material para inmunocitogenética**

Reactivos	Fabricante
BSA	Sigma
Citrato sódico	Serva
KCl	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Serva
Medio de montaje (Prolong® Antifade)	Life Technologies
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Serva
NaCl	Sigma
Suero de burro	Abcam
Triton-X	Serva
Tween 20	Scharlau
Aparataje y material	Fabricante, modelo
Parafilm	Bemis NA
Cámara húmeda	Fabricación propia

En primer lugar, se bloqueó la muestra para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. Para ello se añadieron 100 µl de la solución de bloqueo (ADB 1x) a la muestra, se cubrió con una tira de Parafilm y se incubó durante 30 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente.



**Figura 3.2. Esquema del proceso de inmunocitogenética**

Posteriormente, se preparó la solución deseada de anticuerpos primarios en solución de bloqueo (ADB 1x) y se añadieron 90 µl de dicha solución sobre la muestra, que se volvió a cubrir con una tira de Parafilm y se incubó en una cámara húmeda durante la noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente, el portaobjetos se lavó 3 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente en PBS 1x/0,005% Triton X. A continuación, se preparó la solución deseada de anticuerpos secundarios en solución de bloqueo (ADB 1x) y se añadieron 90 µl de dicha solución sobre la muestra, que se volvió a cubrir con una tira de Parafilm y se incubó en una cámara húmeda durante 1 hora a 37 °C. Para el lavado final, la muestra fue incubada 2 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente en 4xSSC/0,05% Tween 20 y 1 vez durante 5 minutos a temperatura ambiente en 0,4xSSC. Después se dejó secar al aire, se le añadieron 30 µl de un medio de montaje para prevenir la pérdida de la fluorescencia (Prolong® Antifade de Life Technologies) y se cubrió con un cubreobjetos (Figura 3.2).

**Tabla 3.6. Soluciones para inmunocitogenética**

Solución	Ingredientes	Cantidad
PBS 1X (pH 7,0)	0,1370 M NaCl	8,0 g/l
	1 l * (3 mol/1 ml) * 58,4 g/mol	
	0,0027 M KCl	0,2 g/l
	1 l * (3 mol/1 ml) * 58,4 g/mol	
	0,0100 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g/l
	1 l * (3 mol/1 ml) * 142,0 g/mol	
	0,0018 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g/l
1 l * (3 mol/1 ml) * 136,1 g/mol		
PBS 1x/0,005% Triton-X	50 ml PBS 1x	
	2,5 µl Triton-X	
20xSSC	3 M NaCl	175,2 g /l
	1 l * (3 mol/1 ml) * 58,4 g/mol	
	0,3 M Citrato sódico	88,22 g /l
	1 l * (0,3 mol/1 ml) * 294 g/mol	
4xSSC/0,05% Tween 20 (pH= 7,0)	20 x SSC	200 ml/l
	Tween 20	0,50 ml/l
0,4xSSC (pH= 7,0)	20 x SSC	20 ml/l
ADB 10x	Suero de burro	1 ml
	BSA	0,3 g
	Triton X	5 µl
	H <sub>2</sub> O	9 ml



Las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia ZEISS AxioScope A1 con lámpara de mercurio HXP120C con bombilla "mercury Short Arc 103W/2". Los filtros de los que dispone el equipo son: eGFP (excitación: 470/40 nm, dicroico: 495 nm, emisión: 525/50 nm), Rodamina (excitación: 550/25 nm, dicroico: 570 nm, emisión: 605/70 nm), DAPI (excitación: 390/40 nm, dicroico: 420 nm, emisión: 450/40 nm), Cy5 (excitación: 640/30 nm, dicroico: 660 nm, emisión: 690/50 nm) y CFP (excitación: 395-440 nm, dicroico: 460 nm, emisión: 470 nm).

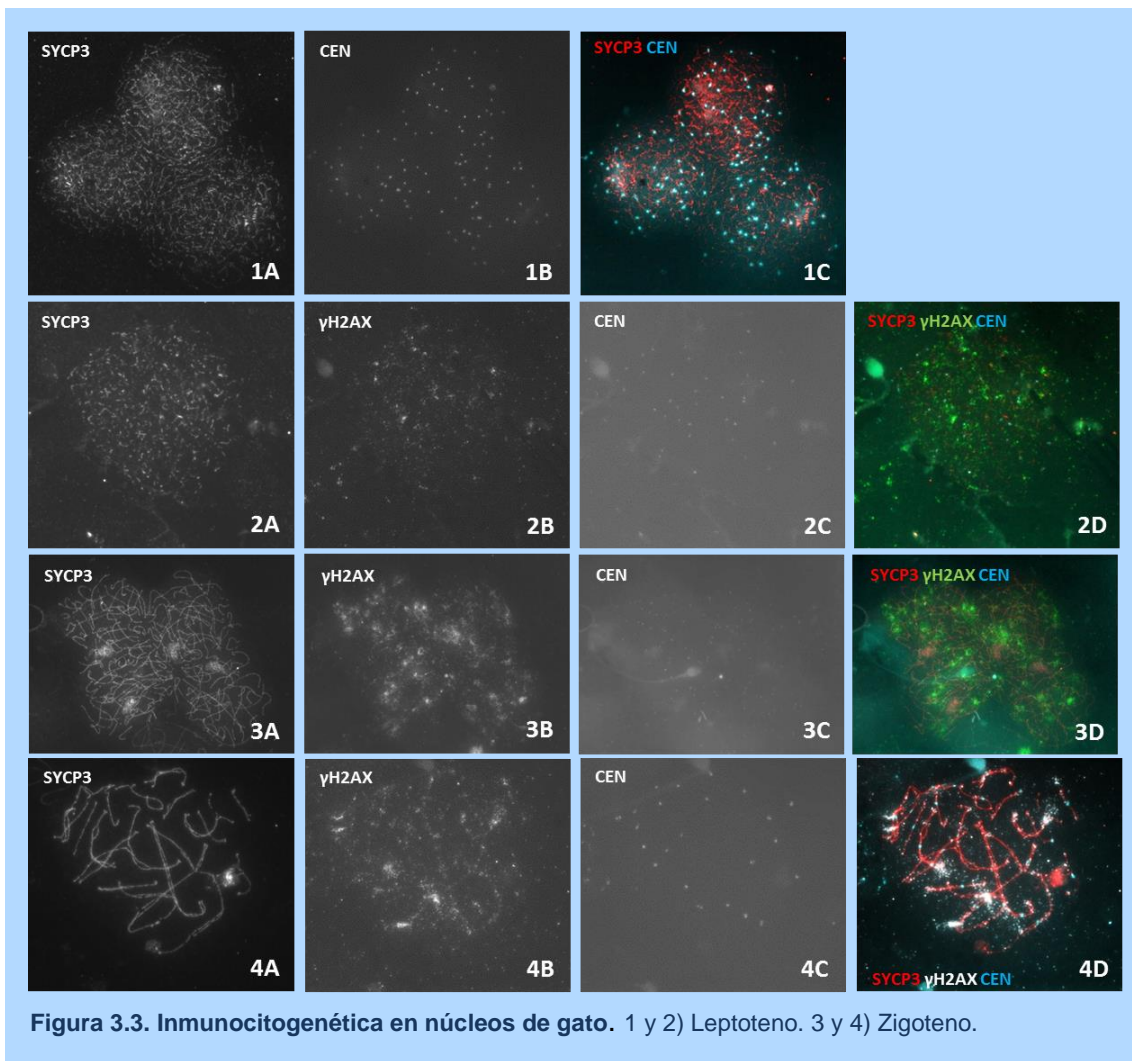
La captura se realizó con una cámara ZEISS AXIOCAM mRA conectada al microscopio y a un ordenador con el programa de captura ZEN Blue. Las imágenes fueron coloreadas mediante software para facilitar la visualización de las proteínas.

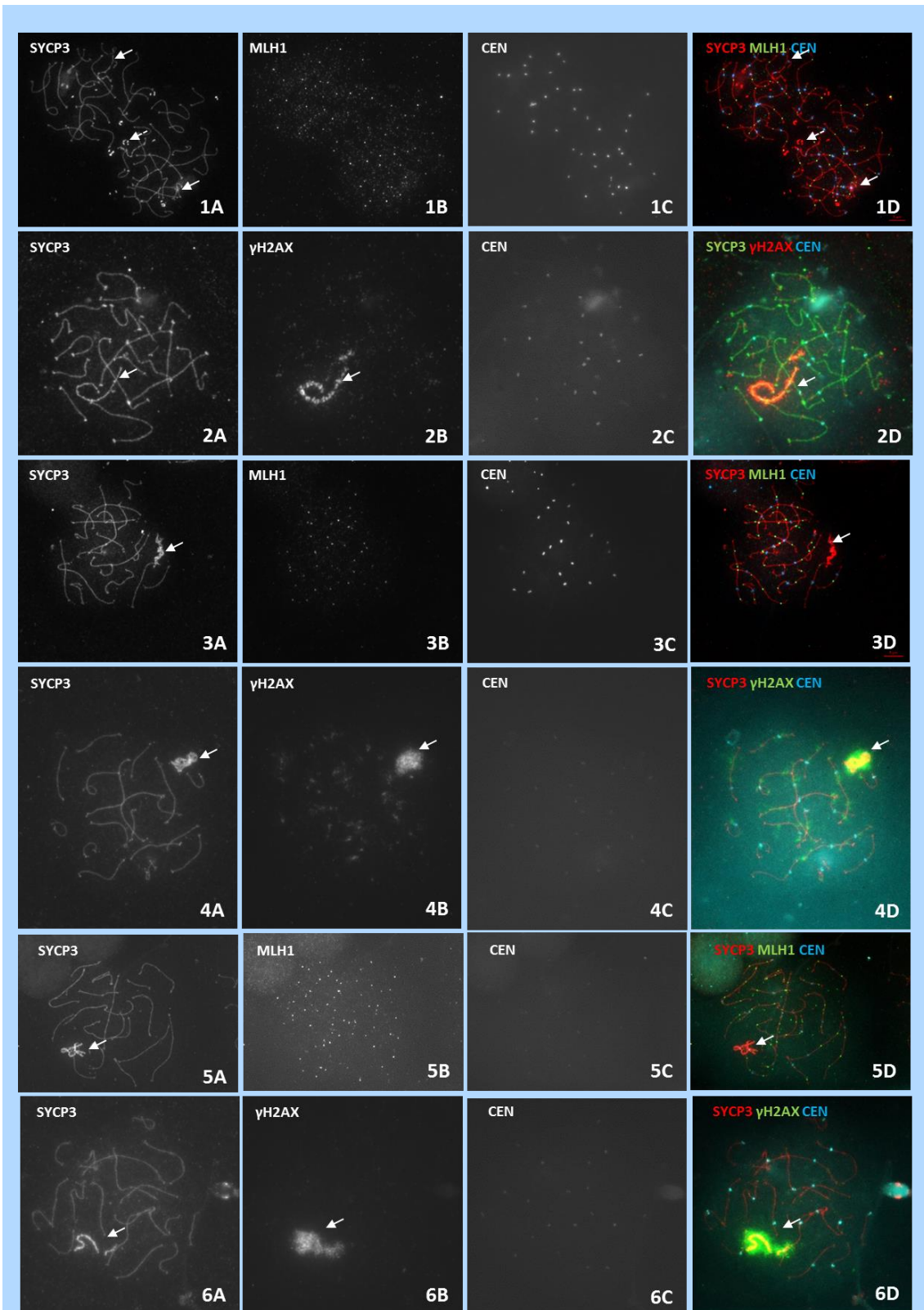
**Tabla 3.7. Anticuerpos primarios empleados en inmunocitogenética**

Contra	Origen	Referencia	Organismo	Producción	Dilución
CENPE	Regalo de Dr. William Earnshaw		Humano	Suero de pacientes con esclerodermia	1:90
MLH1	BD Pharmingen™	551091	Ratón	Monoclonal - MLH1 humano recombinante	1:40
SYCP1	Abcam	ab15087	Cabra	Policlonal	1:90
SYCP3	Regalo de Christa Heyting		Conejo	Policlonal	1:180
γH2AX	Millipore	05-636	Ratón	Monoclonal - Péptido (KATQA[pS]QEY) correspondiente a los aminoácidos 134-142 de la histona H2A.X humana	1:180

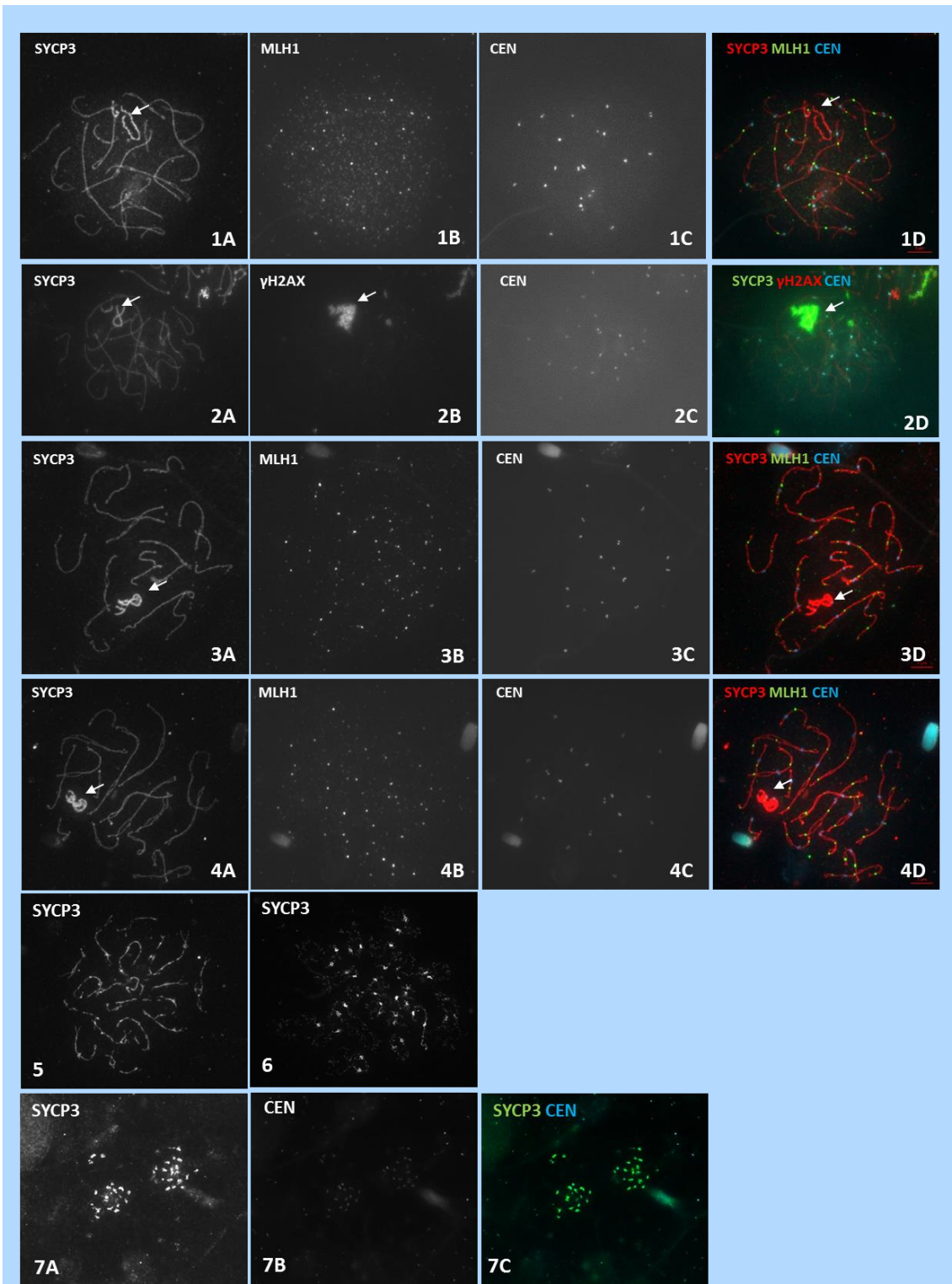
**Tabla 3.8. Anticuerpos secundarios empleados en inmunocitogenética**

Fluorocromo	Origen	Referencia	De	Contra
AMCA	Dianova	709-155-098	Burro	Humano
AMCA	Dianova	715-155-150	Burro	Ratón
Cy3	Dianova	115-166-146	Cabra	Ratón
FITC	Santa Cruz Biotechnology®	sc-2099	Burro	Ratón
FITC	Dianova	711-095-152	Burro	Conejo
FITC	Dianova	DAB-88127	Cabra	Ratón
TR	Santa Cruz Biotechnology®	sc-2783	Burro	Cabra
TRITC	Dianova	705-025-147	Burro	Cabra
TRITC	Santa Cruz Biotechnology®	sc-3841	Cabra	Conejo



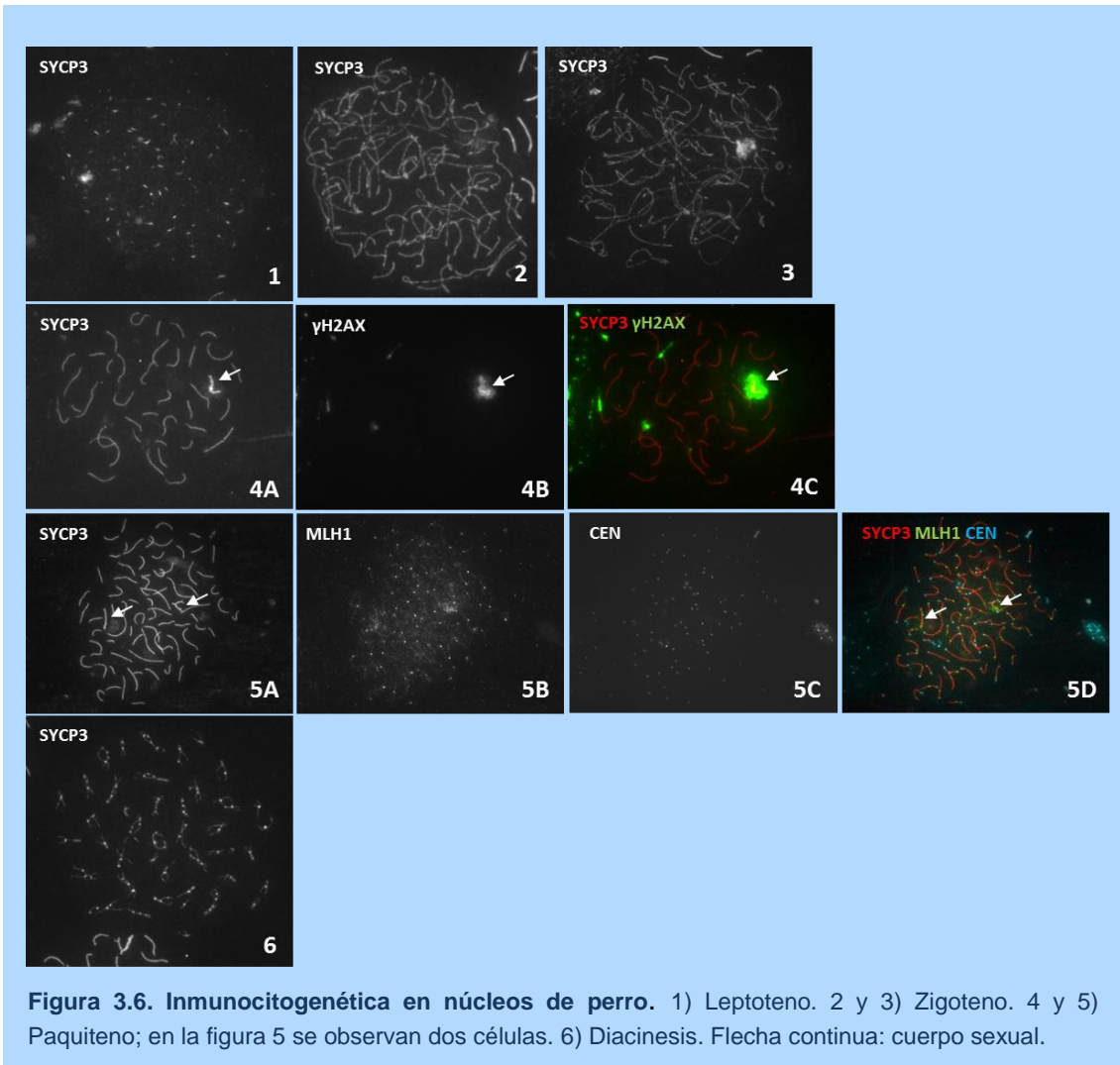


**Figura 3.4. Inmunocitogenética en núcleos de gato.** 1 y 2) Paquiteno inicial. 3 y 4) Paquiteno medio 5 y 6) Paquiteno tardío. Flecha continua: cuerpo sexual. Flecha discontinua: agregado SYCP3.



**Figura 3.5. Inmunocitogenética en núcleos de gato.** 1 y 2) Paquiteno desinapsis inicial. 3 y 4) Paquiteno desinapsis media. 5) Diacinesis. 6) Metafase I. 7) Metafase II. Flecha continua: cuerpo sexual.





## 3.2. ANÁLISIS DE LA RECOMBINACIÓN MEIÓTICA EN AUTOSOMAS

### 3.2.1. Material biológico

En todas las especies se analizaron exclusivamente aquellos núcleos en paquíteno que presentaban todos los cromosomas homólogos completamente sinapsados y el número completo de bivalentes.

**Tabla 3.9. Número de núcleos analizados por individuo para el análisis de la recombinación meiótica**

Humanos		Gatos				Perros	
Individuo	N	Individuo	N	Individuo	N	Individuo	N
HC1	40	FC1	40	FC12	20	CF1	40
TB1	40	FC2	50	FC13	27	CF9	40
TB2	40	FC3	38	FC14	28	CF10	50
i9	28	FC4	50	FC17	28	CF11	50
i10	40	FC5	31	FC18	29	CF12	40
i12	40	FC6	34	FC19	30	CF13	40
i13	31	FC7	35	FC20	27		
i15	102	FC8	18	FC21	25		
i16	46	FC9	35	FC22	33		
i17	40	FC10	13	FC23	34		
i21	31	FC11	25				

En el estudio realizado en humanos, se analizaron entre 28 y 102 núcleos en paquiteno por cada individuo que cumpliera con los requisitos detallados en el párrafo anterior. El total de núcleos analizados fue de 478 (Tabla 3.9). En algunos análisis no se incluyeron los pacientes i9 e i15 por no disponer de los datos correspondientes, y por ello el número de núcleos analizados fue de 376 (sin i9) y 348 (sin i9 e i15).

En el estudio realizado en gatos, se analizaron entre 13 y 50 núcleos en paquiteno por cada individuo hasta llegar a un total de 650 núcleos (Tabla 3.9). En algunos análisis no se incluyeron los individuos FC2 y FC4 por no disponer de los datos correspondientes, y por ello el número de núcleos analizados fue de 550.

Finalmente, en el estudio realizado en perros, se analizaron entre 40 y 50 núcleos en paquiteno por cada individuo, hasta un total de 260 núcleos analizados (Tabla 3.9).

En los análisis en los que además de medidas de la recombinación meiótica se contemplaba el estadio de paquiteno, el número de núcleos analizados en humanos y gatos variaba en ocasiones con respecto a los números mencionados anteriormente, por ser dudoso el estadio. El número total se indica en el apartado correspondiente de Resultados.

### 3.2.2 Metodología

El programa utilizado en el análisis de la recombinación meiótica fue ObjectJ, un plugin del programa ImageJ. Con la ayuda del Dr. Norbert Vischer (Universidad de Ámsterdam,

SILS) se desarrolló una adaptación de este plugin para el análisis de células meióticas que permite el marcaje guiado de los SCs autosómicos, el marcaje automático de los *foci* de MLH1 (considerando únicamente aquellas señales situadas sobre SCs) y el marcaje automático de los centrómeros.

Una vez terminadas las mediciones, el programa exporta automáticamente los datos que se enumeran a continuación a un documento Excel para su posterior análisis:

- longitud de cada SC
- posición absoluta y relativa de los centrómeros
- clasificación de los cromosomas según su morfología (submetacéntricos, metacéntricos y acrocéntricos) en base a la relación entre la longitud absoluta del brazo corto y la longitud absoluta del brazo largo o entre la posición relativa del centrómero y 1, que es la longitud total relativa del SC<sup>243</sup>. El criterio establecido para clasificar los cromosoma fue el siguiente: valor de hasta 1,7 metacéntrico; valor entre 1,7 y 7 submetacéntrico; valor a partir de 7 acrocéntrico
- posición absoluta y relativa de los puntos de MLH1
- número de puntos de MLH1 por SC (media y desviación estándar)
- número de puntos de MLH1 por núcleo (media y desviación estándar)

Los datos obtenidos para cada uno de los SC medidos fueron exportados, tratados y analizados mediante el programa Excel (Microsoft). Con las variables mencionadas anteriormente se pudieron calcular además las siguientes:

- longitud total de los SCs por núcleo
- media de la longitud total de los SCs por núcleo
- media de la longitud total de los SCs por núcleo según subestadio: inicial, medio y tardío
- porcentaje de SCs según número de *foci* de MLH1
- distancia relativa entre cada uno de los puntos de MLH1
- interferencia para cada SC y para el número total de puntos presentes en todos los SCs de cada núcleo
- distribución de los *foci* de MLH1 en los SCs autosómicos agrupados según su morfología: metacéntricos, submetacéntricos y acrocéntricos. En el caso de los cromosomas acrocéntricos en humanos se establecieron adicionalmente dos categorías: grandes y pequeños
- correlación de la longitud de SCs (individuales) con el número de *foci* de MLH1

### 3.3. ANÁLISIS DE LA SINAPSIS EN AUTOSOMAS

#### 3.3.1. Material biológico

En el estudio realizado en humanos, se analizaron entre 50 y 114 núcleos en paquitenio por cada individuo con células meióticas. El número total de núcleos analizados fue de 931 (6 pacientes y 4 individuos control).

En el estudio realizado en gatos, se analizaron un total de 1.050 núcleos en paquitenio en 21 individuos (50 por individuo) y en perros 260 núcleos en 21 individuos ([Tabla 3.10](#)).

Tabla 3.10. Número de núcleos analizados por individuo para el análisis de la sinapsis

Humanos		Gatos				Perros	
Individuo	N	Individuo	N	Individuo	N	Individuo	N
HC1	102	FC1	50	FC12	50	CF1	40
HC2	50	FC2	50	FC13	50	CF9	40
TB1	104	FC3	50	FC14	50	CF10	50
TB2	100	FC4	50	FC17	50	CF11	50
i10	89	FC5	50	FC18	50	CF12	40
i12	114	FC6	50	FC19	50	CF13	40
i13	91	FC7	50	FC20	50		
i16	102	FC8	50	FC21	50		
i17	87	FC9	50	FC22	50		
i21	92	FC10	50	FC23	50		
		FC11	50				

#### 3.3.2 Metodología

El análisis de la sinapsis evaluó la existencia de discontinuidades en el complejo sinaptonemal (*gaps*), de zonas sin sinapsar (*splits* o asinapsis) y de MSUC. Los datos obtenidos para cada núcleo se incorporaron a una base de datos. Para cada individuo se determinó:

- el índice de asinapsis = número de núcleos con bivalentes asinapsados / número de núcleos analizados
- el índice de *gaps* = número de núcleos con *gaps* / número de núcleos analizados
- el índice de asinapsis + *gaps* = número de núcleos con bivalentes asinapsados y *gaps*/número de núcleos analizados



- el índice total de anomalías sinápticas: suma de los tres índices anteriores
- el índice de MSUC = número de núcleos con MSUC / número de núcleos analizados

### **SYCP1 y $\gamma$ H2AX en zonas asinapsadas**

Para analizar de forma cualitativa la presencia de las proteínas SYCP1 y  $\gamma$ H2AX en las zonas asinapsadas en humanos se examinaron un total de 30 meiocitos en paquiteno (individuos HC1 y HC2) y la colocalización de ambas proteínas (completa, parcial o nula) en las zonas de asinapsis.

### **Análisis de la progresión de la profase I meiótica en gatos y perros**

Para determinar la progresión de la profase I meiótica en gatos y perros se analizó la dinámica temporal y espacial de los marcadores meióticos SYCP1, SYCP3 (ambas proteínas presentes en el complejo sinaptonemal),  $\gamma$ H2AX (marcaje de zonas de DSBs en leptoteno y zigoteno; marcaje del cuerpo sexual en paquiteno) y MLH1 (proteína presente en los nódulos de recombinación tardíos), y también la estructura del cuerpo sexual.

Para determinar la progresión de la profase meiótica se analizaron en seis gatos y seis perros un total de 180 células en leptoteno, 180 células en zigoteno y 180 células en paquiteno, respectivamente. Los datos obtenidos para cada célula se incorporaron a una base de datos.

### **Análisis de la sinapsis en gatos**

Para determinar la progresión de la sinapsis en gatos machos, se analizó el número y la localización de sitios de iniciación de la sinapsis en células a lo largo de la fase de zigoteno. Se definió la sinapsis como aquellas regiones de fusión de las señales SYCP3 (es decir, elementos axiales unidos) y/o la aparición de señales SYCP1 (es decir, aparición del elemento transversal).

Para el estudio se restringió el análisis a aquellas células en las cuales al menos un cromosoma presentara un inicio de sinapsis y a aquellos bivalentes en los que los elementos laterales estaban separados al menos en alguna porción del SC. En base a estos criterios, se obtuvieron un total de 350 bivalentes analizables de 68 células en fase de zigoteno en un individuo (FC1).

### Análisis de la desinapsis en gatos

Para determinar la progresión de la desinapsis en gatos, se analizó el número y la localización de sitios de iniciación de la desinapsis en células en las que se observó este fenómeno. Se definió la desinapsis como aquellas regiones en las que se observa una separación de las señales de SYCP3 (es decir elementos axiales separados) y/o la desaparición de señales SYCP1 (es decir, desaparición del elemento central). Se dividió esta fase de desinapsis cualitativamente en tres fases: inicial, media y avanzada, caracterizadas por la extensión y amplitud de dicha desinapsis (**Figura 4.21**). Para el análisis se consideraron sólo las células en la fase inicial de este proceso, no aquellas en la fase media y avanzada. En base a los criterios expuestos, se obtuvieron un total de 164 bivalentes analizables de 32 células (en fase de desinapsis inicial) en 2 individuos (FC1 y FC3).

## 3.4. PRESENCIA DE MLH1 EN EL CUERPO SEXUAL

### 3.4.1. Material biológico

Se analizaron un total de 500 núcleos en humanos, 1.050 en gatos y 260 en perros (**Tabla 3.11**).

En los análisis en los que la presencia de MLH1 en el cuerpo sexual se analizaba en relación con el estadio de paquiteno, el número de núcleos analizados en humanos y gatos variaba en ocasiones con respecto a los números mencionados anteriormente, por ser dudoso el estadio. El número total se indica en el apartado correspondiente de Resultados.

### 3.4.2. Metodología

Se evaluó la presencia de un foco de MLH1 en el cuerpo sexual en los núcleos en paquiteno de las tres especies analizadas (humanos, gatos y perros). Se determinó tanto la media de núcleos en paquiteno con un foco de recombinación en el cuerpo sexual (global y por estadios de paquiteno) como la relación entre el número medio de *foci* de MLH1 por núcleo y la presencia o ausencia de foco de MLH1 en el cuerpo sexual. Los resultados se expresaron en porcentaje.

**Tabla 3.11. Número de núcleos analizados por individuo para el análisis de la presencia de MLH1 en el cuerpo sexual**

Humanos		Gatos				Perros	
Individuo	N	Individuo	N	Individuo	N	Individuo	N
HC1	50	FC1	50	FC12	50	CF1	40
TB1	50	FC2	50	FC13	50	CF9	40
TB2	50	FC3	50	FC14	50	CF10	50
i9	50	FC4	50	FC17	50	CF11	50
i10	50	FC5	50	FC18	50	CF12	40
i12	50	FC6	50	FC19	50	CF13	40
i13	50	FC7	50	FC20	50		
i16	50	FC8	50	FC21	50		
i17	50	FC9	50	FC22	50		
i21	50	FC10	50	FC23	50		
		FC11	50				

### 3.5. PRESENCIA DE SYCP1 EN EL CUERPO SEXUAL

#### 3.5.1. Material biológico

Para investigar en detalle la presencia de la proteína SYCP1 en el cuerpo sexual se analizaron células en estadio de paquiteno en tres especies: humanos, gatos y perros.

En humanos, el análisis se realizó en los núcleos en paquiteno de dos individuos control, HC2 y TB1. En el individuo HC2 se analizó además la colocalización de la proteína SYCP1 con la proteína  $\gamma$ H2AX y en el individuo TB1 con la proteína MLH1. El número de núcleos analizados fue de 56 en el individuo HC2, de los cuales 26 núcleos en paquiteno inicial, 15 en paquiteno medio y 15 en paquiteno tardío, y de 97 en el individuo TB1, con 28 de los núcleos en fase de paquiteno inicial, 37 en fase de paquiteno medio y 32 en fase de paquiteno tardío.

En gatos, se analizaron un total de 38 núcleos en diferentes subestadios de paquiteno en un individuo del presente estudio (FC8): 10 núcleos en paquiteno temprano, 4 en medio y 24 en tardío.

Finalmente, se analizaron 24 núcleos en paquiteno en tres perros (CF1, CF9 y CF10).

### 3.5.2. Metodología

Para este estudio se definieron los conceptos de fragmento de SYCP1 y punto de SYCP1 (**Figura 4.30**), y se analizaron las células en base a la presencia de uno o varios de estos fragmentos y/o puntos. Los resultados se expresaron siempre en porcentajes.

Para el estudio en gatos, se observó la presencia, en términos de cantidad absoluta, de la proteína SYCP1 en el cuerpo sexual.

La morfología siempre lineal del cuerpo sexual de los meiocitos de perros permitió la medición de la longitud del fragmento SYCP1 del par XY y la longitud del fragmento de SYCP3 de dicho par en todos los núcleos en paquiteno. El resultado se expresó en porcentaje aproximado.

## 3.6. MORFOLOGÍA DEL CUERPO SEXUAL EN GATOS Y PERROS

### 3.6.1. Material biológico

En gatos se analizaron en total 1.050 núcleos en paquiteno en 21 individuos (50 por individuo) y en perros 260 núcleos en 6 individuos.

### 3.6.2. Metodología

Para determinar la temporalidad del paquiteno y por lo tanto la temporalidad del cuerpo sexual durante el transcurso del mismo se tuvo en cuenta la variación de la acumulación y localización de la proteína  $\gamma$ H2AX a lo largo de dicho estadio. En gatos, además, se tuvieron en cuenta otras variables establecidas en el presente estudio, como son la presencia de agregado de SYCP3 (indicador de paquitenos muy iniciales), la presencia de las protuberancias teloméricas y la desinapsis de los autosomas (indicador de paquiteno tardío).

## 3.7. ANÁLISIS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS

### 3.7.1. Material biológico

#### Humanos

Las variantes genéticas de los genes *PRDM9* y *RNF212* en humanos se analizaron a partir de ADN genómico extraído de sangre periférica obtenida de individuos que participaron en el presente estudio. Todos los individuos participantes en el presente

estudio firmaron un consentimiento informado de acuerdo con la normativa del Comité Ético de Investigación Clínica de las Illes Balears.

En el estudio sobre la relación entre *PRDM9*, *RNF212* y recombinación meiótica se analizaron un total de 11 individuos reclutados en la consulta del Servicio de Reproducción del Hospital Universitario Son Espases (HUSE) por problemas de fertilidad (n=8), tumor testicular (n=2) o hidrocele (n=1).

En el estudio sobre la relación entre *PRDM9* y la incidencia de síndromes microdelecionales se analizaron un total de 103 individuos control, hombres y mujeres de fertilidad probada y edad comprendida entre los 21 y 86 años, que en el momento del reclutamiento (a partir de mayo del 2011) vivían en Mallorca (Islas Baleares). Los individuos de estudio en este caso fueron 22 padres y madres transmisores de microdeleciones de *novo* reclutados en el Servicio de Genética del Hospital Universitario Son Espases (HUSE).

En el estudio sobre la relación entre *PRDM9* e infertilidad se analizaron un total de 21 individuos reclutados en la consulta del Servicio de Reproducción del Hospital Universitario Son Espases (HUSE) por problemas de fertilidad: azoospermicos no obstructivos (n=12; i1 a i9, i11, i12, i14, i18, i20) o azoospermicos obstructivos (n=6; i10, i13, i15, i16, i17, i21). La población control fue la misma que la descrita en el párrafo anterior.

En el estudio poblacional realizado se analizaron un total de 256 individuos, los cuales fueron agrupados según origen en uno de los siguientes grupos:

- Población mallorquina cuyos ancestros se podían situar en Mallorca durante como mínimo tres generaciones: 56 individuos
- Población mallorquina residente (incluye los 56 individuos anteriores): 116 individuos, con ancestros que se sitúan tanto en la isla de Mallorca como en otras regiones de la Península Ibérica y Europa.
- Población menorquina cuyos ancestros se podían situar en Menorca durante como mínimo tres generaciones: 71 individuos
- Población ibicenca cuyos ancestros se podían situar en Ibiza durante como mínimo tres generaciones: 69 individuos

El método estadístico empleado para cada uno de estos estudios se detalla en el [Apartado 3.9](#).

### Animales

Las variantes genéticas de la región ZF del gen *PRDM9* en perros y gatos se analizaron a partir de ADN genómico extraído de tejido testicular.

El análisis de variantes genéticas de *PRDM9* se realizó sobre un total de 21 gatos de edades comprendidas entre los 4 y 12 meses y diferentes fenotipos, y 6 perros de edades comprendidas entre los 6 y 18 meses y diferentes fenotipos reclutados en diferentes clínicas veterinarias de la isla de Mallorca. El método estadístico empleado para el estudio se detalla en el [Apartado 3.9](#).

### 3.7.2. Metodología

**Tabla 3.12. Reactivos y material para la extracción de ADN genómico**

Kits y reactivos	Fabricante
Etanol	Merck
Isopropanol	Sigma
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	Promega
Aparataje y material	Fabricante
Bisturí	
Microcentrífuga	Eppendorf
Pipetas (1 ml, 100 µl, 10 µl)	Eppendorf
Tijeras de disección	
Tubos	
Tubos de sangre EDTA	

Para la extracción del ADN genómico se utilizó el kit Wizard® Genomic DNA (Promega) según el protocolo proporcionado por la casa comercial. Dicho kit está diseñado para la extracción de ADN de glóbulos blancos, células en cultivo, tejido animal, tejido vegetal, levaduras y bacterias. El kit está basado en la lisis alcalina de las células y la purificación del ADN mediante precipitación con isopropanol. Los ácidos nucleicos precipitan en presencia de sal (especialmente de cationes monovalentes como  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ) y de alcohol (generalmente etanol o isopropanol). El precipitado puede ser aislado mediante centrifugación y resuspendido en el volumen deseado de tampón TE. Los reactivos y materiales utilizados se detallan en la [Tabla 3.12](#).

### Extracción del ADN genómico a partir de sangre periférica

El proceso de extracción de ADN a partir de sangre periférica se realizó según el protocolo proporcionado por la casa comercial. Brevemente, este protocolo comprende los siguientes pasos:

- A partir de 500  $\mu$ l de sangre, se consigue la lisis de los glóbulos rojos mediante la adición de 900  $\mu$ l de una solución específica más una incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se centrifuga la muestra a 16.000 x g durante 20 segundos.
- Tras descartar el sobrenadante, se procede a la resuspensión del pellet y a la lisis de los glóbulos blancos y sus núcleos mediante 300  $\mu$ l de una solución alcalina con detergente.
- A continuación, se realiza la precipitación de las proteínas mediante 100  $\mu$ l de solución de precipitación y un centrifugado a 16.000 x g durante 3 minutos.
- El sobrenadante obtenido se transfiere a un eppendorf con 300  $\mu$ l de isopropanol para conseguir la precipitación del ADN genómico.
- Tras una centrifugación a 16.000 x g durante 1 minuto, el sobrenadante es descartado y se procede al lavado del ADN genómico con etanol 70%, para la eliminación de las sales que precipitan con el ADN. Se repite el proceso de centrifugación, se descarta el sobrenadante y se resuspende el ADN genómico en tampón TE.

### Extracción del ADN genómico a partir de biopsia testicular

El proceso de extracción de ADN de biopsia testicular comprende los siguientes pasos:

- Obtención de un pequeño fragmento de biopsia testicular, de un tamaño aproximado de 4 mm<sup>3</sup>.
- Lisis mecánica de las células con un homogeneizador de vidrio Potter-Elvehjem en una solución alcalina con detergente más una incubación a 65 °C durante 10 minutos.
- A continuación se procede a la degradación del ARN mediante adición de 3  $\mu$ l de solución RNasa e incubación a 37 °C durante 15 minutos.
- Posteriormente, se realiza la precipitación de las proteínas mediante 100  $\mu$ l de solución de precipitación y un centrifugado a 16.000 x g durante 3 minutos.
- Los pasos posteriores son iguales a los descritos en el apartado anterior.

### Cuantificación

La cuantificación de las muestras de ADN se llevó a cabo en un espectrofotómetro Nanodrop® del fabricante Thermo, que además de valores de cuantificación, también da valores de relación 260/280 (ADN/proteínas) y 260/230 (ADN/solventes orgánicos) que aportan información sobre la pureza de la muestra. Sólo se emplearon para el procesamiento posterior aquellas muestras con un valor 260/280  $\approx$  1,8 y un valor 260/230 de 1,8 a 2,2.

### Amplificación

Los reactivos y material utilizados en la amplificación del ADN genómico se hallan detallados en la [Tabla 3.13](#). La correcta amplificación de los fragmentos en cada una de las muestras analizadas se comprobó mediante geles de agarosa.

**Tabla 3.13. Reactivos y material para la amplificación de ADN genómico**

Kits y reactivos	Fabricante
TaKaRa Ex Taq™	TaKaRa
Aparataje y material	Fabricante, modelo
Electroforesis	EmbiTec
Pipetas (1 ml, 100 $\mu$ l, 10 $\mu$ l)	Eppendorf
Termociclador	Biometra, T Professional
Termociclador	VWR, Biometra
Tijeras de disección	
Transiluminador	Syngene
Transiluminador	BioRad, Gel Doc EZ Imager
Tubos	

### Amplificación de la región ZF del gen *PRDM9* en humanos

Para determinar la variante alélica del gen *PRDM9* en humanos, la región ZF de dicho gen fue amplificada mediante PCR con cebadores específicos para dicho gen y no el parálogo *PRDM7* ([Tabla 3.14](#))<sup>101</sup>. Los reactivos y el programa de amplificación utilizado se detallan en las [Tablas 3.15 y 3.16](#), respectivamente. Las reacciones se realizaron en termocicladores de las empresas VWR y Biometra.



Tabla 3.14. Oligonucleótidos empleados para amplificación y secuenciación

Especie	Gen	Nombre	Secuencia (5' → 3')	Utilización
Humano	<i>PRDM9</i>	PN0.6F <sup>101</sup>	TGA GGT TAC CTA GTC TGG CA	5', amplificación
	<i>PRDM9</i>	PN2.5R <sup>101</sup>	ATA AGG GGT CAG CAG ACT TC	3', amplificación
	<i>PRDM9</i>	PN1.2F <sup>101</sup>	TGA ATC CAG GGA ACA CAG GC	5', secuenciación
	<i>PRDM9</i>	PN2.4R <sup>101</sup>	GCA AGT GTG TGG TGA CCA CA	3', secuenciación
Gato	<i>PRDM9</i>	FcPRDM9.F	GGG AAT GGT GGA AGA AGG G	5', amplificación y secuenciación
	<i>PRDM9</i>	FcPRDM9.R	TGG GGT ATG GAG TGT GTG G	3', amplificación y secuenciación
Perro	<i>PRDM9</i>	CanPRDM9.F <sup>244</sup>	AGA GAA GCT GCC TCT GAT GC	5', amplificación
	<i>PRDM9</i>	CanPRDM9.R <sup>244</sup>	CTG GAC CCT TTT GCT TTC AG	3', amplificación
Humano	<i>RNF212</i>	HsRNF212.F2	CGA GTG GTG TGG AAT TTT	5', amplificación y secuenciación
	<i>RNF212</i>	HsRNF212.R2	CTC TGG CTC ATC GTT CTG	3', amplificación y secuenciación
Humano	<i>TEX11</i>	TEX11F	AGC CCC ATA CCT TGT TTG CT	5', amplificación y secuenciación
	<i>TEX11</i>	TEX11R	AAG ATG CCT GTC ACT GTG GG	3', amplificación y secuenciación
Humano	<i>MSH5</i>	MSH5F	AAC CTT TGT GCC CAA CTC CA	5', amplificación y secuenciación
	<i>MSH5</i>	MSH5R	GAG TAG ATG CAG GAG ACG CC	3', amplificación y secuenciación
Humano	<i>TOP2A</i>	TOP2AF	AGC CTG CAG AGT TCA TCT TTC T	5', amplificación y secuenciación
	<i>TOP2A</i>	TOP2AR	TGA AGG CCT GGA AAG AAG CC	3', amplificación y secuenciación

## Material y Métodos

**Tabla 3.15. Mezcla de la reacción de PCR para la amplificación de la región ZF del gen *PRDM9***

Reactivo	Cantidad	Concentración final
H <sub>2</sub> O	27,35 µl	
Buffer 10x (MgCl <sub>2</sub> 20 mM)	4 µl	Buffer 1x, 2 MgCl <sub>2</sub> mM
dNTPs (2,5 mM cada uno)	3,2 µl	0,2 mM
Primer 5' (10 mM)	1 µl	0,25 mM
Primer 3'(10 mM)	1 µl	0,25 mM
DMSO	1,2 µl	3%
ExTaq (5 U/µl)	0,25 µl	1,25 U
ADN (50 ng/µl)	2 µl	100 ng
Volumen final	40 µl	

**Tabla 3.16. Programas de las reacciones de PCR**

**Amplificación de la región ZF del gen *PRDM9* en humanos**

Desnat. inicial	Ciclos (x45)			Producto (bp)
	Desnaturalización	Annealing	Elongación	
95 °C, 3 min	95 °C, 30 seg	62 °C, 40 seg	72 °C, 105 seg	1.900*

**Amplificación de la región ZF del gen *PRDM9* en gatos**

Desnat. inicial	Ciclos (x45)			Producto (bp)
	Desnaturalización	Annealing	Elongación	
95 °C, 3 min	95 °C, 30 seg	62 °C, 40 seg	72 °C, 80 seg	1.113**

**Amplificación de la región ZF del gen *PRDM9* en perros**

Desnat. inicial	Ciclos (x45)			Producto (bp)
	Desnaturalización	Annealing	Elongación	
95 °C, 3 min	95 °C, 30 seg	62 °C, 40 seg	72 °C, 105 seg	***

**Amplificación del gen *RNF212***

Desnat. inicial	Ciclos (x45)			Producto (bp)
	Desnaturalización	Annealing	Elongación	
95 °C, 3 min	95 °C, 30 seg	56 °C, 40 seg	72 °C, 25 seg	220

**Amplificación de los genes *TEX11*, *MSH5* y *TOP2A***

Desnat. inicial	Ciclos (x35)			Producto (bp)
	Desnaturalización	Annealing	Elongación	
95 °C, 3 min	95 °C, 30 seg	62 °C, 40 seg	72 °C, 25 seg	****

\*Se indica aquí el tamaño del amplicón correspondiente al alelo B referenciado en las bases de datos del NCBI. \*\* Se indica aquí el tamaño del amplicón correspondiente al alelo referenciado en las bases de datos del NCBI (GenBank NC\_018737.1, 63863259-63897530). \*\*\* Longitud aproximada de los dos alelos presentes en todos los perros analizados: 1.600 bp y 1.900 bp. \*\*\*\* *TEX11*: 198 bp; *MSH5*: 150 bp; *TOP2A*: 283 bp

### Amplificación del exón ZF del gen *PRDM9* en gatos

Para la amplificación de la región de ZF del gen *PRDM9* en gatos (GenBank NC\_018737.1, 63863259-63897530) se diseñaron cebadores específicos con el programa CLC Main Workbench versión 6.8 (Aarhus, DK), estableciendo una distancia mínima de 35 bp entre los nucleótidos terminales de los cebadores y el nucleótido inicial y final de dicha región (Tabla 3.14). Los reactivos y el programa de amplificación utilizado se detallan en las Tablas 3.16 y 3.17, respectivamente. Las reacciones se realizaron en termocicladores de la empresa Biometra.

**Tabla 3.17. Mezcla de la reacción de PCR para amplificación de la región ZF del gen *PRDM9* en gatos y perros**

Reactivo	Cantidad	Concentración final
H <sub>2</sub> O	27,55 µl	
Buffer 10x (MgCl <sub>2</sub> 20 mM)	4 µl	Buffer 1x, 2 MgCl <sub>2</sub> mM
dNTPs (2,5 mM cada uno)	3,2 µl	0,2 mM
Primer 5' (10 mM)	1 µl	0,25 mM
Primer 3' (10 mM)	1 µl	0,25 mM
ExTaq (5 U/µl)	0,25 µl	1,25 U
ADN (50 ng/µl)	3 µl	150 ng
Volumen final	40 µl	

### Amplificación del exón ZF del gen *PRDM9* en perros

La región ZF del gen *PRDM9* en perros fue amplificada mediante PCR con cebadores específicos<sup>244</sup> (Tabla 3.14) y según los protocolos especificados (Tablas 3.16 y 3.17). Las reacciones se realizaron en termocicladores de la empresa Biometra.

### Amplificación del gen *RNF212* en humanos

Para determinar la variante del SNP rs3796619 del gen *RNF212* de pacientes e individuos control (de los cuales se disponía de datos MLH1), se amplificó una región de 220 bp dentro de la cual se halla este SNP. Para el diseño de los cebadores se empleó el programa CLC Main Workbench versión 6.8 (Aarhus, DK) (Tabla 3.14). Los reactivos y el programa de amplificación utilizado se detallan en las Tablas 3.16 y 3.18, respectivamente.

## Material y Métodos

Tabla 3.18. Mezcla de la reacción de PCR para amplificación del gen *RNF212*, *TEX11*, *MSH5* y *TOP2A*

Reactivo	Cantidad	Concentración final
H <sub>2</sub> O	28,55 µl	
Buffer 10x (MgCl <sub>2</sub> 20 mM)	4 µl	Buffer 1x, 2 MgCl <sub>2</sub> mM
dNTPs (2,5 mM cada uno)	3,2 µl	0,2 mM
Primer 5' (10 mM)	1 µl	0,25 mM
Primer 3' (10 mM)	1 µl	0,25 mM
ExTaq (5 U/µl)	0,25 µl	1,25 U
ADN (50 ng/µl)	2 µl	100 ng
<b>Volumen final</b>	40 µl	

### Amplificación de los genes *TEX11*, *MSH5* y *TOP2A* en humanos

La región de los genes *TEX11*, *MSH5* y *TOP2A* que incluía el SNP detectado en el análisis del exoma del paciente con bloqueo meiótico (i14) fueron amplificadas mediante PCR con cebadores específicos (Tabla 3.14) y según los protocolos especificados (Tablas 3.16 y 3.18). Las reacciones se realizaron en termocicladores de la empresa Biometra.

### Electroforesis en geles de agarosa

La separación de fragmentos de ADN de diferente tamaño (específicos del estudio realizado para la amplificación de *PRDM9*) se realizó electroforéticamente en geles de agarosa al 1% para *PRDM9* y al 2% para los otros genes del presente estudio. Las muestras fueron diluidas con tampón de carga 6x y separadas bajo una tensión de 100V en TAE (Tabla 3.19). A continuación los geles fueron teñidos 10 minutos en una solución de bromuro de etidio y posteriormente desteñidos 5 minutos en ddH<sub>2</sub>O.

Tabla 3.19. Soluciones para la electroforesis en geles de agarosa

Tampón de carga	TAE	Solución de bromuro de etidio
40% Glicerol	40 mM Tris Base	10 mg/ml de bromuro de etidio en ddH <sub>2</sub> O
60% ddH <sub>2</sub> O	10 mM EDTA	
0,06 mg/ml azul de bromofenol	1% Ácido acético glacial	

### Purificación de los fragmentos de PCR

Los reactivos y material utilizados en la amplificación del ADN genómico se hallan detallados en la Tabla 3.20.

**Tabla 3.20. Reactivos y material para la purificación de los fragmentos de PCR**

<b>Kits y reactivos</b>	<b>Fabricante</b>
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Fermentas
GeneJET™ PCR Purification Kit	Fermentas
<b>Aparataje y material</b>	<b>Fabricante, modelo</b>
Baño de agua	Selecta
Electroforesis	EmbiTec
Pipetas (1 ml, 100 µl, 10 µl)	Eppendorf
Transiluminador	Syngene
Tubos	

La purificación de los fragmentos amplificados se realizó con el kit GeneJET™ PCR Purification de Fermentas. Dicho Kit se basa en la purificación del ADN por absorción a membranas de sílice en columnas en presencia de sales caotrópicas y alcohol (generalmente etanol).

El proceso consta de los siguientes pasos:

- Mezcla de la muestra de PCR con el mismo volumen de tampón de unión, que contiene sales caotrópicas y alcohol.
- Transferencia de la muestra a la columna con membrana de sílice. Unión a la membrana mediante centrifugación a 16.000 x g durante 1 minuto.
- Lavado del ADN con 700 µl de tampón de lavado (etanol 70%) mediante centrifugación a 16.000 x g durante 1 minuto.
- Para eliminar cualquier residuo de tampón de lavado se centrifuga una vez más la columna a 16.000 x g durante 1 minuto.
- Elución del ADN de la membrana de sílice con 50 µl tampón de elución (TE) mediante centrifugación a 16.000 x g durante 1 minuto.

La correcta purificación de los fragmentos se comprobó posteriormente en un gel de agarosa.

En caso de observar dos alelos de diferentes longitudes para la región ZF de *PRDM9*, se aisló cada una de las bandas a partir de un gel de agarosa (agarosa al 1%) y se procedió a su purificación con el kit GeneJET™ Gel Extraction de Fermentas. Este kit se basa en el mismo principio que el anterior y sólo se diferencia en el primer paso, en el cual el fragmento de agarosa que contiene la banda deseada se incubó en 1:1 (volumen de tampón: peso del fragmento de gel) a 65 °C hasta su completa disolución.

La correcta purificación de los fragmentos se comprobó posteriormente en un gel de agarosa.

### Secuenciación

La secuenciación bidireccional de las muestras de *PRDM9* se llevó a cabo por la empresa especializada MacroGen en un secuenciador Applied Biosystems 3730XL.

La secuenciación bidireccional de las muestras de los otros genes del presente estudio se llevó a cabo en la Unidad de Secuenciación del Hospital Universitario Son Espases en un secuenciador Applied Biosystems 3130XL.

Los electroferogramas fueron analizados con el programa CLC Main Workbench versión 6.8 (Aarhus, DK).

Para el análisis de *PRDM9* en humanos los electroferogramas fueron alineados y comparados con secuencias publicadas en la literatura. En la mayoría de los casos de homocigotos de longitud, se obtuvieron electroferogramas homocigotos A/A (GenBank GU216222.1). En aquellos casos con electroferogramas heterocigotos se empleó el programa Multiple SeqDoc<sup>245</sup> para compararlos con electroferogramas homocigotos. Este algoritmo produce imágenes alineadas de un electroferograma de referencia y uno de prueba junto con uno que resulta de la substracción de ambos y que muestra las diferencias entre los mismos. Estas diferencias en el perfil permiten una identificación visual rápida de sustituciones, inserciones y deleciones en el electroferograma de prueba. Las diferencias indicadas por el programa fueron comprobadas visualmente e interpretadas para evitar artefactos a veces introducidos por programas de software de interpretación de electroferogramas.

En el caso del análisis de *PRDM9* en gatos, los electroferogramas fueron alineados y comparados con la secuencia de *PRDM9* de GenBank (NC\_018737.1, 63863259-63897530).

El análisis los otros genes del presente estudio (*RNF212*, *TEX11*, *MSH5*, *TOP2A* y *NBN*) se realizó mediante alineación y comparación de los electroferogramas obtenidos con la secuencia de la base de datos del NCBI (NC\_000004.11 ,1050039-1107352; NC\_000023.10, 69748790-70128567; NC\_000006.11, 31707725-31730455; NC\_000017.10, 38544773-38574202 y NC\_000008.10, 90945564-90996952 respectivamente). En el caso de los genes *TEX11*, *MSH5*, *TOP2A* y *NBN* para confirmar los SNPs detectados en el análisis del exoma.

## 3.8. ANÁLISIS DEL EXOMA

### 3.8.1. Material biológico

En el momento del estudio, el paciente tenía 40 años, no presentaba antecedentes patológicos de interés, salvo una leve hiperlipidemia sin tratamiento médico y un episodio de prostatitis sucedido 15 años atrás. Acudió a consulta por infertilidad primaria de 24 meses. A la exploración el pene, meato, epidídimos, deferentes, testículos y caracteres sexuales secundarios fueron normales. Se practicaron dos espermogramas que mostraron azoospermia post-centrifugación con volumen seminal normal. En el cultivo de semen se aisló *Citrobacter Koseri* que fue tratado con ciprofloxacino con negativización en el cultivo de control. Las cifras de FSH, inhibina B, LH, testosterona, estradiol y PRL fueron normales. El cariotipo fue normal (46, XY) y no se encontraron microdeleciones en el cromosoma Y. Se intentó la técnica de extracción de espermatozoides testiculares bilateral (TESE, *Testicular Sperm Extraction*) sin conseguirse gametos aptos para inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, *Intracytoplasmatic Sperm Injection*). La anatomía patológica mostró un bloqueo madurativo a nivel de espermatocito de primer orden. Concretamente, el número de espermatogonias por túbulos se hallaba conservado, con una media de 24 espermatogonias por túbulo, se observaba una marcada disminución de espermatocitos de primer orden, con una media de 12 espermatocitos por túbulo, y solo en algunos túbulos se observaban aisladas espermatidas precoces A+B (0-2 por túbulo), sin identificarse ninguna espermatida madura C+D.

### 3.8.2. Metodología

El análisis del exoma se realizó a partir de ADN extraído de sangre periférica. La secuenciación del genoma se externalizó a la empresa Beijing Genome Institute en Hong Kong donde se utilizó la plataforma Complete Genomics, que utiliza el sistema de *nanoball sequencing* (Figura 3.3).

#### 1) Preparación de la librería:

El ADN fue fragmentado hasta conseguir moléculas con longitudes entre 400 y 500 bp. A continuación, se repitió cuatro veces el siguiente proceso:

- Unión de secuencias de ADN sintéticas conocidas como “semi-adaptadores” a los extremos 3’ y 5’ de los fragmentos generados

- Circularización de los fragmentos mediante ligación intramolecular para formar un adaptador completo
- Reacción de restricción enzimática para la linearización que permite la unión de nuevos “semi-adaptadores”

Las moléculas circulares resultantes se replicaron mediante un sistema de amplificación en círculo basado en la utilización de la ADN polimerasa phi29. El resultado final de esta amplificación son los ADN *nanoballs*. Cada uno de ellos contiene más de 200 copias del fragmento original.

### 2) Array

Los ADN *nanoballs*, al ser introducidos en una celdilla de flujo, se disponen en un *array* altamente ordenado en el cual más del 95% de las posiciones están ocupadas por un solo ADN *nanoball*. De esta manera se garantiza la secuenciación de una sola molécula por posición.

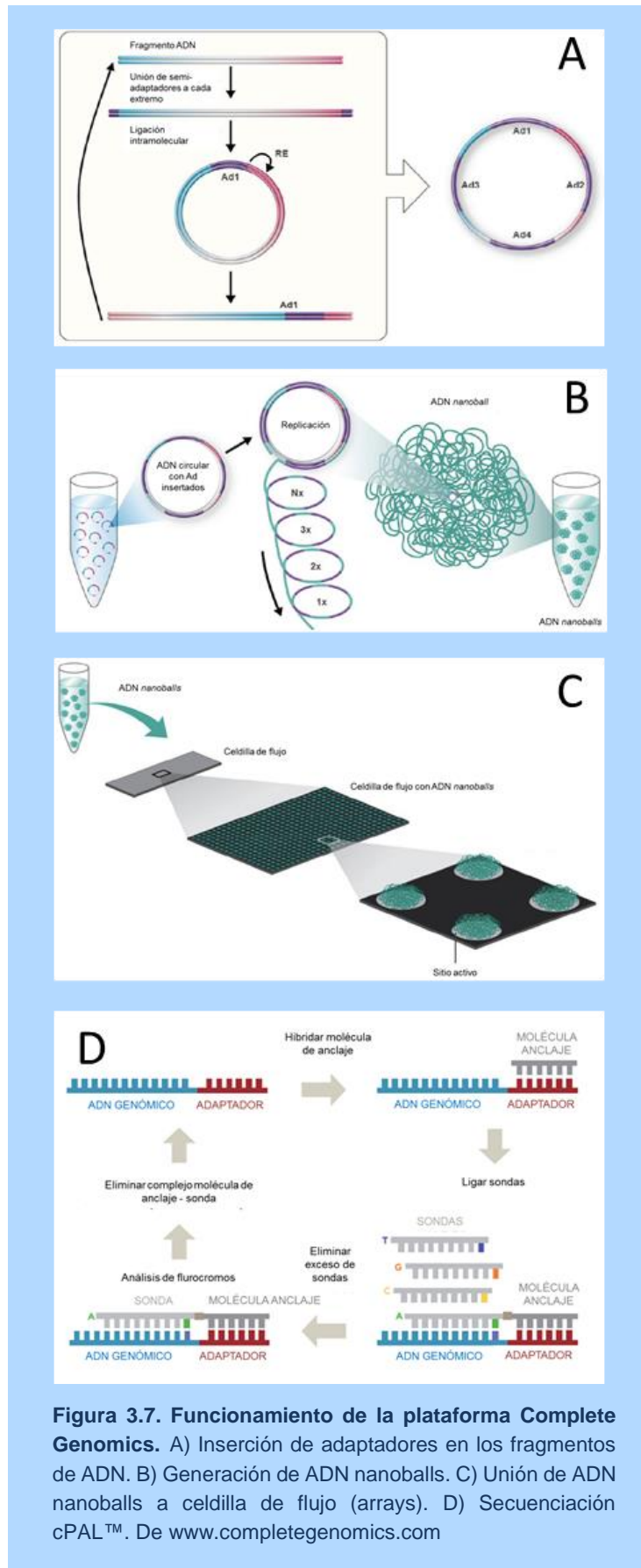
### 3) Secuenciación cPAL™ (combinatorial Probe-Anchor Ligation)

Cada ciclo de secuenciación empieza con la hibridación de una secuencia de anclaje a uno de los adaptadores sintéticos. Para secuenciar una posición determinada, se introduce una mezcla de sondas de 10 bp marcadas con cuatro fluorocromos diferentes (uno por cada una de las cuatro posibles bases: A, T, C, G). Cada posición de lectura tiene una mezcla diferente de sondas.

Cuando la sonda con el nucleótido complementario al de la posición que se quiere determinar hibrida, la molécula de anclaje se une a ella estabilizando la interacción entre la sonda y el fragmento de ADN genómico a secuenciar. Las sondas que no se unen son lavadas y la celdilla de flujo se analiza mediante la detección simultánea y rápida de los cuatro fluorocromos. Una vez se ha leído una base, se elimina el complejo secuencia de anclaje – sonda y el substrato está listo para un nuevo ciclo de secuenciación usando una mezcla diferente de sondas y secuencias de anclaje para determinar la base en la siguiente posición. El software de análisis realiza el ensamblaje de secuencias solapadas y mapeo en base a una secuencia de referencia.

El análisis de los resultados de secuenciación se llevó a cabo mediante el programa Enlis Genome Research de Enlis Genomics. Este software genera un listado de todas las variantes genéticas presentes en el individuo analizado que difieren de la secuencia del genoma humano consenso (GRCh37/hg19). Las variantes genéticas encontradas





**Figura 3.7. Funcionamiento de la plataforma Complete Genomics.** A) Inserción de adaptadores en los fragmentos de ADN. B) Generación de ADN nanoballs. C) Unión de ADN nanoballs a celdilla de flujo (arrays). D) Secuenciación cPAL™. De [www.completegenomics.com](http://www.completegenomics.com)

fueron filtradas según criterios de asociación con fertilidad y meiosis, para determinar cuál o cuáles de ellas podían ser la causa del bloqueo meiótico.

Una vez obtenidos los genes candidatos, se analizaron las mutaciones con dos programas disponibles en internet, UMD-Predictor (<http://umd-predictor.eu/>) y [Human Splicing Factor](#), para confirmar que los cambios encontrados pudieran tener relevancia con la enfermedad.

La comprobación de la mutación encontrada en los genes *TEX11*, *MSH5* y *TOP2A* se realizó mediante secuenciación de Sanger (Apartado 3.7.2).

## 3.9 ESTADÍSTICA

### 3.9.1. Meiosis: recombinación meiótica, asinapsis y estudio genético (PRDM9 y RNF212)

Los resultados obtenidos se introdujeron en una base de datos. Se realizó una depuración de los mismos mediante pruebas de rangos (detección de valores posibles) y cruces de campos lógicos, para detectar inconsistencias entre respuestas. Los análisis estadísticos que se realizaron, mediante el programa SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA), son los siguientes:

- Análisis descriptivo, etiquetado y depuración de los datos, valoración de valores atípicos y extremos. Descripción de la distribución de cada variable.
- Las variables cuantitativas se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar, las variables cualitativas en forma de frecuencias absolutas y porcentajes. El análisis de las diferencias para los parámetros cuantitativos se hizo mediante test t de Student. Para evaluar las diferencias entre variables cualitativas se utilizó el test de chi cuadrado de Pearson.
- Se utilizaron modelos de Ecuaciones de Estimación Generalizadas (EEG) para estimar la asociación entre:
  - los diferentes parámetros de la recombinación meiótica y el fenotipo de fertilidad
  - los diferentes parámetros de la recombinación meiótica y las variantes de *PRDM9*
  - los diferentes parámetros de la recombinación meiótica y las variantes de *RNF212*

Los modelos EEG permiten tener en cuenta que diferentes meiosis analizadas en el estudio pertenecen al mismo sujeto. Este método también permite ajustar según el

efecto de otras variables, como en el análisis conjunto de la asociación entre los diferentes parámetros de la recombinación meiótica y las variantes genéticas de *PRDM9* y *RNF212*. El procedimiento EEG amplía el modelo lineal generalizado para permitir el análisis de mediciones de observaciones correlacionadas, como datos clústeres.

Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuándo la *p* fue menor de 0,05.

### 3.9.2. Estudio poblacional

Se han analizado 196 individuos de las Illes Balears con ascendencia balear de al menos tres generaciones (56 de Mallorca, 71 de Menorca y 69 de Ibiza) y un grupo de residentes en Mallorca ( $n=60$ ), con procedencia geográfica diversa, recogidos en el Hospital de Son Espases. Las frecuencias alélicas, el índice de diversidad genética (Nei), la heterozigosidad esperada y el equilibrio de Hardy-Weinberg, se han calculado con el software Arlequin ver. 3.5<sup>246</sup>. Las distancias genéticas índice de fijación ( $F_{ST}$ , *Fixation Index*) y de Reynolds entre poblaciones han sido calculadas con el programa Poptree2<sup>247</sup> y Phylip 3.69<sup>248</sup>. Finalmente estas distancias se han representado en un gráfico de escala multidimensional (*MDS, Multidimensional Scaling*) usando SPSS v.15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). La comparación de las frecuencias de los alelos A, L24 y L26 entre poblaciones se ha llevado a cabo mediante el test exacto de Fischer en tablas de contingencia<sup>249</sup>.



## 4. RESULTADOS



## 4.1. RECOMBINACIÓN EN AUTOSOMAS

### 4.1.1. Análisis de la recombinación meiótica y parámetros asociados

En el presente estudio se analizó la recombinación recíproca entre cromosomas homólogos, que resulta en la generación de COs. Para ello se emplearon técnicas de inmunofluorescencia que permiten la localización de la proteína MLH1, presente en los nódulos de recombinación tardíos, de la proteína  $\gamma$ H2AX y de las proteínas del complejo sinaptonemal SYCP1 y SYCP3.

#### MLH1: número y distribución

El **número de MLH1** se definió en el presente estudio como la suma de los *foci* de dicha proteína presentes en todos los SCs de un núcleo. En el presente estudio se analizó este parámetro en humanos, gatos y perros para determinar los valores en cada una de estas tres especies. En humanos, los valores obtenidos se utilizaron para establecer si existe una asociación de este parámetro con infertilidad. Además, en humanos y gatos, se analizó la temporalidad de esta proteína durante los diferentes subestadios del paquiteno.

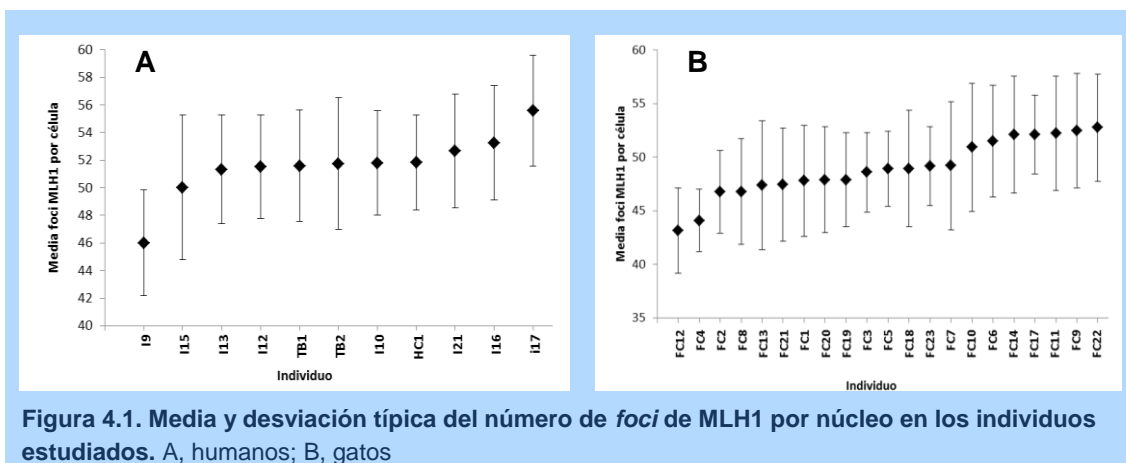
En un análisis preliminar en humanos, se observó que las biopsias testiculares de los individuos i11, i18 e i20 presentaban síndrome de sólo Sertoli, caracterizado por la ausencia total de células germinales, y que el individuo i14 presentaba un bloqueo meiótico en zigoteno. Por ello, ninguno de estos individuos fue incluido en los análisis de recombinación y sinapsis del presente estudio.

En humanos, se analizaron un total de 478 núcleos en paquiteno de ocho pacientes (358 núcleos, OA = 290 núcleos y NOA = 68 núcleos) y tres individuos control (120 núcleos). Los **valores medios de *foci* de MLH1 por núcleo** observados en los individuos de este estudio fueron significativamente variables entre ellos y se situaron entre  $46,00 \pm 3,83$  en el individuo i9 y  $55,58 \pm 4,00$  en el individuo i17 ( $p < 0,001$ ) (**Figura 4.1**). Esta diferencia entre los dos extremos representó el 17% de la media total para este rasgo.

No se observó una diferencia significativa entre número de *foci* de MLH1 en los individuos control ( $51,72 \pm 4,10$ ) comparado con el número de *foci* de MLH1 en los grupos de pacientes considerados de forma individual, OA ( $52,47 \pm 0,6$ ;  $p = 0,273$ ) y NOA ( $48,77 \pm 1,88$ ;  $p = 0,118$ ) ni entre los dos grupos de pacientes, OA y NOA ( $p = 0,065$ ) (comparaciones por pares). El **rango de *foci* de MLH1 por núcleo** obtenido fue de 34 a 64 en pacientes y de 44 a 65 en individuos control.

## Resultados

En gatos, se analizaron un total de 650 núcleos en paquiteno procedentes de 21 individuos. El análisis del **número medio de foci de MLH1** en los espermatocitos de los gatos mostró una variabilidad interindividual significativa ( $p < 0,001$ ) que fue desde los  $43,15 \pm 3,98$  en el individuo FC12 hasta los  $52,76 \pm 5,01$  en el individuo FC22, con un valor medio en la población analizada de  $48,88 \pm 5,31$  (Figura 4.1). La diferencia entre los dos extremos de la media total para este rasgo fue de un 18%.



En lo que respecta al número total de *foci* de MLH1 por núcleo (**rango de MLH1**), se observó también una variabilidad inter e intraindividual. En la mayoría de individuos, los núcleos poseían un mínimo de 40 y un máximo de 60 *foci* de recombinación, siendo los valores extremos en la población analizada de 33 y 68 *foci*.

En perros, se analizaron un total de 260 núcleos en paquiteno procedentes de seis individuos. Los perros analizados presentaron un **valor medio de foci de MLH1 por núcleo** de  $40,18 \pm 1,34$  con una variabilidad interindividual significativa ( $p = 0,002$ ) que se encontraba entre los  $39,72 \pm 1,11$  *foci* en el individuo CF9 y los  $40,55 \pm 1,54$  *foci* en el individuo CF1. No obstante, esta diferencia entre los dos extremos representa sólo el 2% de la media total para este rasgo.

Los datos obtenidos en el **análisis del porcentaje de SCs según número de foci de MLH1** para cada uno de los humanos analizados (10 individuos, 376 núcleos) mostraron cierta variabilidad entre los mismos (Tabla 4.1). Se observó que tasas de recombinación menores estaban asociadas a un mayor porcentaje de SCs con un foco de MLH1 y pocos SCs con varios *foci* de MLH1 (individuos i9 e i13). Por el contrario, individuos con tasas de recombinación más elevadas presentaron más SCs con múltiples *foci* y menos con un foco (individuos i16 e i17). Los individuos que se hallaban entre ambos extremos



presentaban tasas de recombinación similares y también un porcentaje similar de SCs según número de *foci* de MLH1.

Al analizar la media para todos los individuos se observó que los SCs más frecuentes eran aquellos con dos *foci* de MLH1 (47,4%), seguidos por aquellos con tres *foci* (26,7%) y con un *foci* (15,3%).

**Tabla 4.1. Análisis del porcentaje de SCs según número de *foci* de MLH1 (1, 2, 3, 4, 5, 6) en cada individuo y media.**

Individuo	1 MLH1	2 MLH1	3 MLH1	4 MLH1	5 MLH1	6 MLH1	R
HC1	14,6%	47,1%	27,9%	9,1%	1,1%	0,2%	51,83
TB1	15,5%	47,5%	26,2%	8,5%	1,9%	0,3%	51,58
TB2	14,0%	49,3%	27,3%	7,1%	1,7%	0,5%	51,75
i9	22,6%	51,3%	19,2%	5,2%	1,1%	0%	46,00
i10	15,8%	46,5%	26,1%	9,6%	1,6%	0,5%	51,80
i12	13,5%	50,8%	25,6%	7,4%	2,6%	0,0%	51,33
i13	18,6%	47,0%	24,8%	7,6%	1,3%	0,6%	50,03
i16	13,6%	44,2%	30,8%	9,3%	1,7%	0,4%	53,26
i17	10,8%	44,9%	29,5%	10,7%	3,9%	0,2%	55,58
i21	13,9%	45,9%	29,2%	9,1%	1,8%	0,1%	52,65
<b>Media</b>	<b>15,3%</b>	<b>47,4%</b>	<b>26,7%</b>	<b>8,4%</b>	<b>1,9%</b>	<b>0,3%</b>	<b>51,58</b>

R: Tasa de recombinación.

Los datos obtenidos en el **análisis del porcentaje de SCs según número de *foci* de MLH1** para cada uno de los gatos (19 individuos, 550 núcleos) indicaron cierta variabilidad entre ellos y se observó también la misma tendencia mencionada para humanos: las tasas de recombinación menores se asociaron a un mayor porcentaje de SCs con un foco de MLH1 y pocos SCs con varios *foci* de MLH1 (p.ej. individuos FC12, FC13, FC20 y FC21). Y la situación inversa, los individuos con tasas de recombinación más elevadas presentaron más SCs con múltiples *foci* y menos con un foco (p. ej. individuos FC14, FC17 y FC22) (**Tabla 4.2**).

Al analizar la media para todos los individuos se observó que en estos animales el porcentaje de SCs con dos o tres *foci* es similar (37,4% y 31,8% respectivamente), seguidos por aquellos con cuatro *foci* (15,7%) y con un *foci* (8,9%).

Tabla 4.2. Análisis del porcentaje de SCs según número de *foci* de MLH1 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) en cada individuo y media

Individuo	1 MLH1	2 MLH1	3 MLH1	4 MLH1	5 MLH1	6 MLH1	7 MLH1	R
FC1	11,4%	40,3%	28,3%	12,6%	6,7%	0,3%	0,3%	47,8
FC3	8,8%	39,7%	30,2%	16,1%	4,4%	0,9%	0,0%	48,58
FC5	7,7%	38,2%	33,9%	16,1%	3,2%	0,9%	0,0%	48,9
FC6	6,7%	35,1%	32,4%	18,6%	5,9%	1,0%	0,3%	51,5
FC7	10,3%	35,6%	32,5%	15,4%	4,4%	1,7%	0,0%	49,2
FC8	10,9%	39,6%	32,8%	11,7%	4,7%	0,3%	0,0%	46,79
FC9	6,3%	33,2%	33,5%	19,0%	5,9%	1,9%	0,0%	52,46
FC10	6,0%	38,9%	29,9%	16,7%	8,5%	0,0%	0,0%	50,92
FC11	8,5%	32,9%	29,8%	19,4%	7,3%	1,9%	0,2%	52,22
FC12	15,8%	43,6%	29,1%	8,5%	2,6%	0,4%	0,0%	43,15
FC13	12,3%	37,4%	30,9%	14,2%	4,1%	1,0%	0,0%	47,41
FC14	4,0%	37,0%	32,8%	19,1%	5,8%	1,2%	0,2%	52,11
FC17	4,4%	36,5%	35,1%	15,5%	6,3%	2,2%	0,0%	52,11
FC18	9,4%	37,4%	31,6%	16,1%	4,8%	0,8%	0,0%	48,93
FC19	9,8%	39,6%	30,2%	15,7%	4,3%	0,4%	0,0%	47,9
FC20	12,6%	35,8%	32,1%	14,2%	4,5%	0,8%	0,0%	47,89
FC21	12,0%	37,3%	31,8%	14,0%	4,2%	0,2%	0,4%	47,44
FC22	4,6%	36,0%	30,7%	20,4%	6,6%	1,2%	0,5%	52,76
FC23	7,9%	36,4%	35,9%	14,8%	4,1%	0,8%	0,2%	49,15
<b>Media</b>	<b>8,9%</b>	<b>37,4%</b>	<b>31,8%</b>	<b>15,7%</b>	<b>5,2%</b>	<b>0,9%</b>	<b>0,1%</b>	<b>47,8</b>

R: Tasa de recombinación

Se analizó la **influencia del subestadio de paquiteno sobre el número medio de *foci* de MLH1 por núcleo** en humanos y en gatos. (Figura 4.2). En humanos se analizaron un total de 516 núcleos (191 inicial, 185 medio y 140 tardío) de 11 individuos y en gatos un total de 637 núcleos (85 inicial, 235 medio y 317 tardío) de 21 individuos. En ambos casos se observó un aumento en el paquiteno medio y una posterior disminución hacia el paquiteno tardío. La variación en el número medio de *foci* de MLH1 por núcleo entre paquitenos iniciales, medios y tardíos fue estadísticamente significativa en humanos, aunque no en gatos (Tabla 4.3 y Figura 4.2).

Tabla 4.3. Subestadios. Comparaciones por pares

Humanos			Gatos		
E	Comp. E	P	E	Comp. E	P
1	2	0,020*	1	2	0,217
	3	0,541		3	0,602
2	1	0,020*	2	4	0,465
	3	0,007*		1	0,217
				3	0,347
3	1	0,541	3	4	0,650
	2	0,007*		1	0,602
				2	0,347
				4	0,829
			4	1	0,465
				2	0,650
				3	0,829

\*Resultados estadísticamente significativos

E: Subestadio; Comp. E: Comparación con subestadio

Subestadios: 1 (inicial), 2 (medio), 3 (tardío) y 4 (separación)

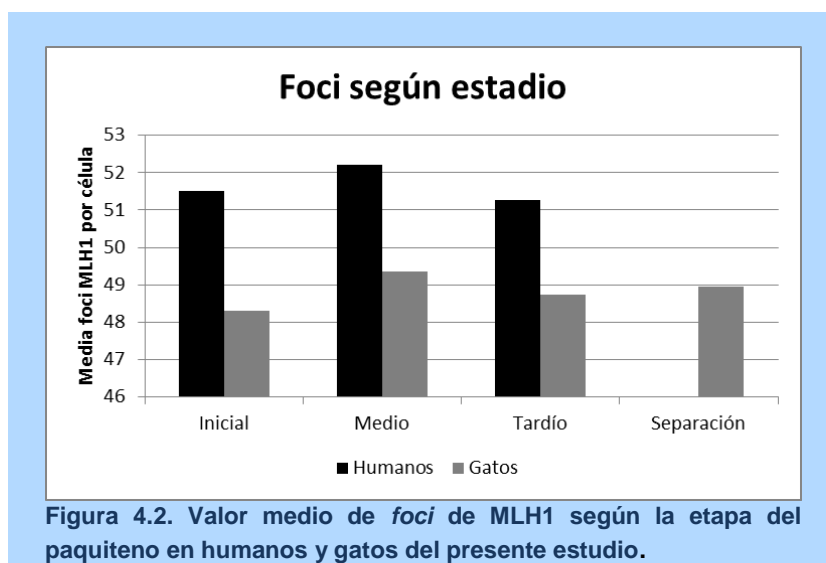
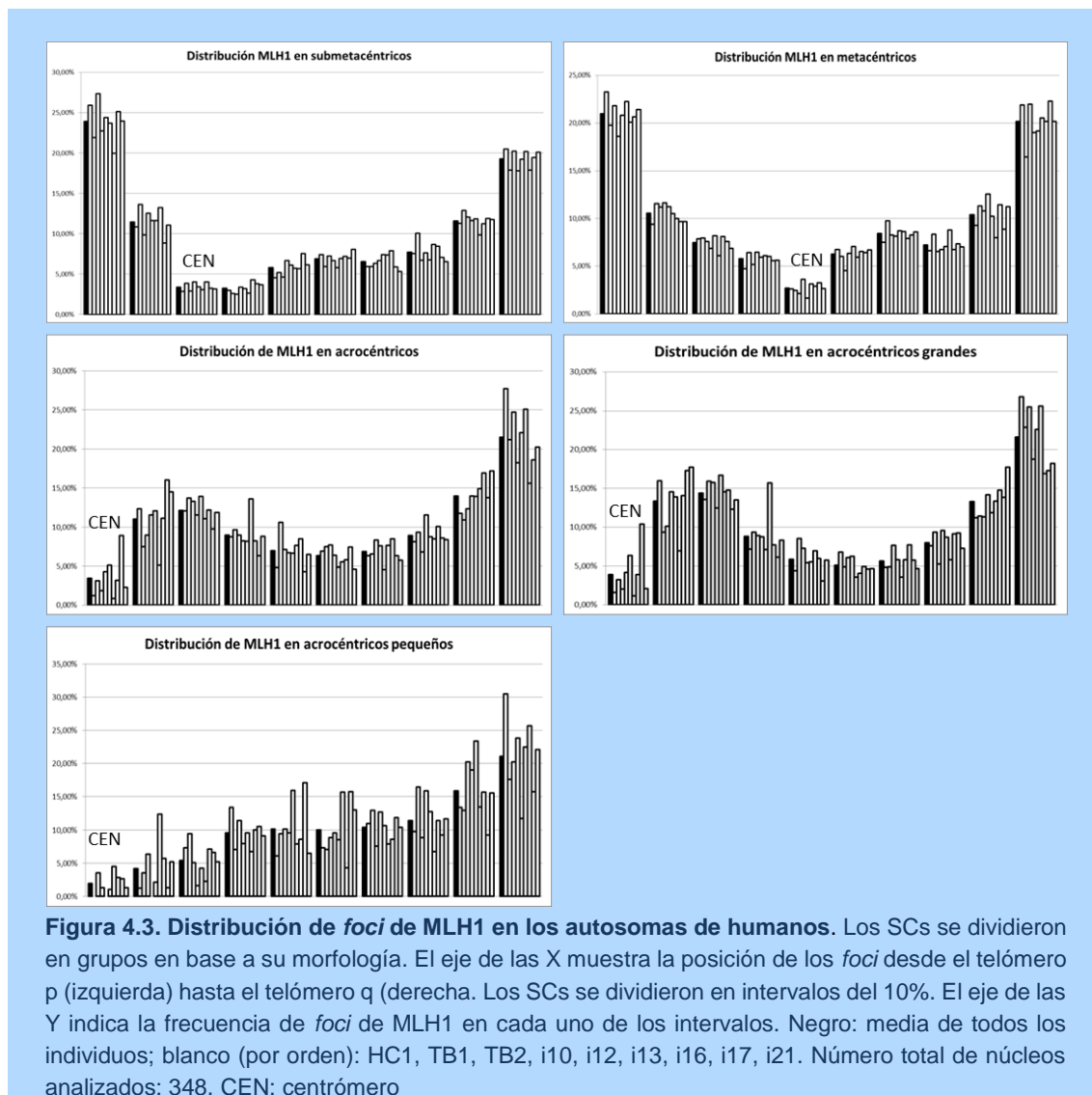


Figura 4.2. Valor medio de *foci* de MLH1 según la etapa del paquiteno en humanos y gatos del presente estudio.

Para determinar la **distribución de los *foci* de MLH1** en los SCs agrupados según su morfología, se analizaron núcleos en estadio de paquiteno en humanos y gatos. Para ello se dividieron los SCs en 10 intervalos iguales y las distribuciones de MLH1 se obtuvieron sumando el número de *foci* de MLH1 en cada intervalo para SCs de la misma morfología (submetacéntricos, metacéntricos, acrocéntricos). Además, en humanos se

dividieron los acrocéntricos en grandes y pequeños. Las barras indican el porcentaje de *foci* de MLH1 en cada uno de estos intervalos.

En humanos, al no haberse observado diferencias significativas en los parámetros de recombinación entre pacientes y controles, la distribución de los *foci* de MLH1 se analizó de forma conjunta en 348 núcleos de seis pacientes (no se incluyeron i9 e i15) y tres individuos control.

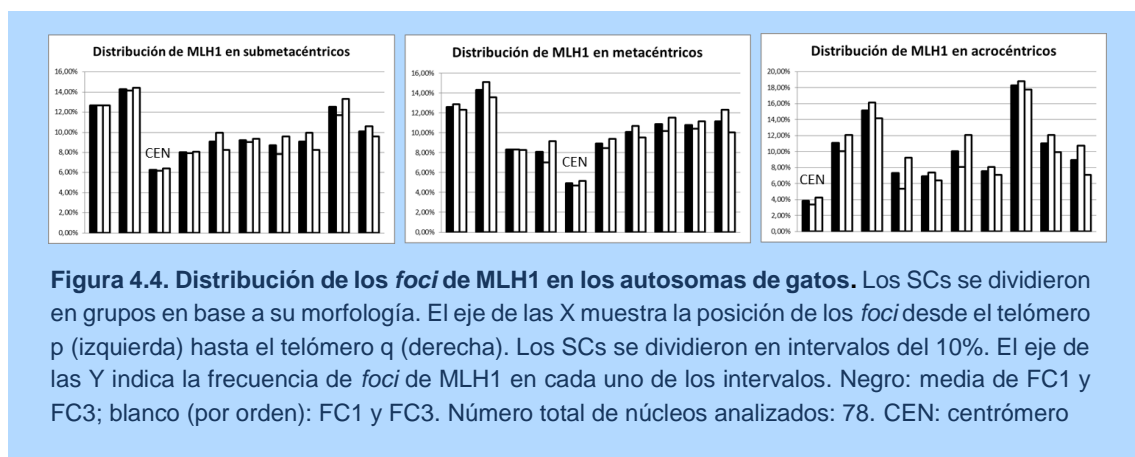


La **Figura 4.3** muestra la distribución de los *foci* de MLH1 a lo largo de los SCs agrupados según su morfología. La distribución de los *foci* de MLH1 a lo largo de los complejos sinaptonemales fue similar en todos los individuos, apreciándose sólo cierta variabilidad en el caso de los acrocéntricos. En los SCs metacéntricos y

submetacéntricos se observaron dos picos en las regiones subtelméricas y una disminución gradual desde dichos extremos hacia el centrómero. En los SCs submetacéntricos, se observó además que la tasa de recombinación en el extremo distal del brazo corto era superior a la del extremo distal del brazo largo.

En los SCs acrocéntricos (global) se detectó una distribución bimodal con un pico menor próximo al centrómero y otro pico mayor en la región distal. Al dividir los acrocéntricos en grandes y pequeños, se determinó que el pico menor próximo al centrómero era casi exclusivo de los acrocéntricos grandes, mientras que los acrocéntricos pequeños presentaron un descenso gradual desde el extremo distal hacia el centrómero.

En gatos, la distribución de los *foci* de MLH1 se analizó en 78 espermatocitos de dos individuos (FC1 y FC3). La **Figura 4.4** muestra la distribución de los *foci* de MLH1 a lo largo de los SCs clasificados según su morfología. La distribución de los *foci* de MLH1 a lo largo de los complejos sinaptonemales fue similar en los dos individuos analizados y también parecida a la descrita en humanos. No obstante, la frecuencia con la que se halló un *foci* de recombinación en la región pericentromérica fue mayor en gatos que en humanos (**Figuras 4.3 y 4.4**). Otra diferencia que se apreció en los SCs metacéntricos fue una distribución más homogénea de los *foci* de MLH1 en el brazo largo.



### SCs: Longitud e interferencia

La **longitud de los SCs** se definió en el presente estudio como la suma de las longitudes de todos los SCs autosómicos de un núcleo. En el presente estudio se analizó la longitud de los SCs en humanos y gatos para determinar los valores en cada una de estas dos especies. En humanos, los valores obtenidos se utilizaron para establecer si existe una asociación de este parámetro con infertilidad. Finalmente, en humanos y gatos, se

analizó el comportamiento de este parámetro durante los diferentes subestadios del paquiteno.

En humanos, se analizaron 376 núcleos de tres controles (120 núcleos) y siete pacientes (256 núcleos, OA = 188 núcleos y NOA = 68 núcleos). El valor de la longitud media de los SCs autosómicos por núcleo fue de  $311,64 \pm 40,64 \mu\text{m}$ , variando desde  $271,43 \pm 25,32 \mu\text{m}$  en el individuo i9 a  $352,43 \pm 34,52 \mu\text{m}$  en el individuo TB2. Esta diferencia entre los dos extremos representó el 23% de la media total para este rasgo. El rango varió desde  $218,68 \mu\text{m}$  hasta  $429,09 \mu\text{m}$ .

Se observó una diferencia significativa entre los individuos control ( $334,28 \mu\text{m}$ ) y los pacientes NOA ( $285,82 \mu\text{m}$ ;  $p=0,006$ ), mientras que entre los individuos control y los pacientes OA ( $304,41 \mu\text{m}$ ) se observó una tendencia que no llegó a la significancia estadística ( $p=0,054$ ). Entre los dos grupos de pacientes, OA y NOA, no se observó una diferencia significativa ( $p = 0,097$ ).

Al igual que los otros valores de la recombinación, la media de la longitud total de los SCs en gatos presentó una gran variabilidad intra e interindividual. La media en la población estudiada (19 individuos, 550 núcleos) fue de  $252,24 \pm 44,77 \mu\text{m}$ , variando entre  $195,31 \pm 23,02 \mu\text{m}$  en el individuo FC12 hasta  $282,15 \pm 39,38 \mu\text{m}$  en el individuo FC23. Esta diferencia entre los dos extremos representó el 34% de la media para este rasgo. El rango de la longitud total de los SCs por núcleo fue de  $154,35$  a  $409,34 \mu\text{m}$ .

Por lo que respecta al comportamiento de la **longitud media de los SCs a lo largo de los diferentes subestadios del paquiteno**, en humanos se observó un mayor grado de compactación de los mismos durante el paquiteno medio, relajándose posteriormente en el paquiteno tardío hasta un grado similar al paquiteno inicial (**Tabla 4.4**). No obstante, esta variación fue mínima y no significativa (**Tabla 4.5**).

En gatos se observó un incremento paulatino y significativo de la longitud media de los SCs desde la fase inicial hasta la fase tardía de paquiteno (**Tabla 4.4**). La variación fue significativa entre todos los subestadios, excepto entre el tardío y la etapa que se denominó separación (**Tabla 4.5**).

**Tabla 4.4. Longitud media de los SCs por núcleo según la etapa del paquiteno en humanos y gatos.**

Subestadio	Humanos		Gatos	
	N	Longitud SCs ( $\mu\text{m}$ )	N	Longitud SCs ( $\mu\text{m}$ )
Inicial	83	316,40	82	222,65
Medio	106	310,43	230	235,84
Tardío	105	314,81	122	275,22
Separación			105	280,73
<b>Total</b>	<b>294</b>	<b>315,10</b>	<b>539</b>	<b>252,25</b>

N: Número de núcleos analizados

**Tabla 4.5. Longitud media de los SCs por núcleo según la etapa del paquiteno en humanos y gatos. Comparaciones por pares**

Humanos			Gatos		
E	Comp. E	P	E	Comp. E	P
1	2	0,077	1	2	0,006*
	3	0,802		3	0,000*
				4	0,000*
2	1	0,077	2	1	0,006*
	3	0,380		3	0,000*
				4	0,000*
3	1	0,802	3	1	0,000*
	2	0,380		2	0,000*
				4	0,473
			4	1	0,000*
				2	0,000*
				3	0,473

\*Resultados estadísticamente significativos

E: Subestadio; Comp. E: Comparación con subestadio; N: Número de núcleos analizados

Subestadios: 1 (inicial), 2 (medio), 3 (tardío) y 4 (separación)

En el presente estudio la **interferencia** se estimó en base a las distancias entre *foci* de recombinación adyacentes como la distancia en porcentaje de la longitud del SC entre dichos dos *foci*. La interferencia se midió para cada SC (para SCs con el mismo número de *foci*, interferencia SC), para cada núcleo (interferencia celular) y para todas las células de un individuo (interferencia total). Se analizó la interferencia en humanos y gatos para determinar los valores en cada una de estas dos especies y su comportamiento durante los diferentes subestadios del paquiteno. Finalmente, en

## Resultados

humanos, los valores obtenidos se utilizaron para establecer si existe una asociación de este parámetro con infertilidad.

Para ello, se analizaron en humanos 376 núcleos de tres controles (120 núcleos) y siete pacientes (256 núcleos, OA = 188 núcleos y NOA = 68 núcleos). En gatos se analizaron un total de 550 núcleos de 19 individuos.

Tanto en humanos como en gatos, la interferencia para los SCs agrupados según número de *foci* de MLH1 (interferencia SC) presentó cierta variabilidad entre los individuos (expresada en el rango). La distancia media en humanos entre los *foci* de MLH1 en los SCs con dos *foci* fue del 67,54%. En gatos, esta distancia fue del 51,6%. En gatos, el porcentaje de SCs con dos *foci* de MLH1 y una interferencia inferior al 20% fue del 1,8%, tres veces superior al observado en humanos ([Tablas 4.6 y 4.7](#)).

**Tabla 4.6. Distancias interfocales para SCs con el mismo número de *foci* de MLH1 en gatos**

N	DIM (%)		DI (%)					
			1 a 2	2 a 3	3 a 4	4 a 5	5 a 6	6 a 7
2	<b>Media</b>	<b>51,6</b>	<b>51,6</b>					
	Rango	48,4 a 54,9	48,4 a 54,9					
3	<b>Media</b>	<b>35,4</b>	<b>35,6</b>	<b>35,2</b>				
	Rango	34,1 a 39,6	33,8 a 38,3	33,1 a 37,4				
4	<b>Media</b>	<b>26,3</b>	<b>25,5</b>	<b>27,9</b>	<b>25,7</b>			
	Rango	25,3 a 27,1	23,0 a 28,1	25,7 a 31,0	23,8 a 28,4			
5	<b>Media</b>	<b>20,8</b>	<b>19,8</b>	<b>22,3</b>	<b>22,0</b>	<b>19,3</b>		
	Rango	20,0 a 21,9	15,5 a 30,4	19,9 a 25,4	16,9 a 25,5	16,0 a 21,8		
6	<b>Media</b>	<b>17,5</b>	<b>14,4</b>	<b>20,3</b>	<b>18,6</b>	<b>17,6</b>	<b>16,4</b>	
	Rango	16,5 a 18,6	4,7 a 20,3	15,2 a 44,8	12,2 a 30,1	5,6 a 29,3	7,5 a 29,2	
7	<b>Media</b>	<b>14,4</b>	<b>13,4</b>	<b>19,5</b>	<b>13,0</b>	<b>16,2</b>	<b>12,6</b>	<b>11,5</b>
	Rango	13,6 a 15,1	10,3 a 17,2	11,4 a 26,2	6,3 a 22,1	9,8 a 24,7	6,5 a 26,4	2,8 a 16,9
Total	<b>Media</b>	<b>34,1</b>	<b>39,2</b>	<b>31,5</b>	<b>24,4</b>	<b>18,8</b>	<b>15,6</b>	<b>10,7</b>
		32,1 a 38,3	36,4 a 43,0	29,5 a 33,8	23,0 a 26,3	14,5 a 21,0	7,5 a 29,2	2,8 a 16,6

N: Número de *foci*; DIM: Distancia interfocal media; DI: Distancia interfocal



Tabla 4.7. Distancias interfocales para SCs con el mismo número de *foci* de MLH1 en humanos.

N	DIM (%)		DI (%)				
			1 a 2	2 a 3	3 a 4	4 a 5	5 a 6
2	<b>Media</b>	<b>67,54</b>	<b>67,54</b>				
	Rango	65,32 a 69,51	65,32 a 69,51				
3	<b>Media</b>	<b>41,47</b>	<b>44,33</b>	<b>38,40</b>			
	Rango	39,39 a 44,88	40,38 a 49,67	37,31 a 39,49			
4	<b>Media</b>	<b>28,96</b>	<b>28,01</b>	<b>31,39</b>	<b>27,48</b>		
	Rango	28,24 a 29,84	23,54 a 31,05	27,94 a 34,36	25,06 a 30,60		
5	<b>Media</b>	<b>22,49</b>	<b>22,10</b>	<b>23,58</b>	<b>23,21</b>	<b>21,03</b>	
	Rango	21,54 a 23,01	18,54 a 27,09	19,14 a 28,60	20,33 a 28,04	18,57 a 23,03	
6	<b>Media</b>	<b>18,50</b>	<b>19,55</b>	<b>17,68</b>	<b>19,14</b>	<b>16,67</b>	<b>19,48</b>
	Rango	17,82 a 19,23	14,84 a 25,71	13,11 a 22,01	11,28 a 31,51	10,82 a 23,28	11,77 a 28,92
Total	<b>Media</b>	<b>46,95</b>	<b>55,04</b>	<b>35,90</b>	<b>26,55</b>	<b>20,43</b>	<b>19,42</b>
	Rango	44,85 a 49,64	52,34 a 56,71	35,13 a 37,28	24,19 a 29,55	18,57 a 22,72	11,77 a 28,92

N: Número de *foci*; DIM: Distancia interfocal media; DI: Distancia interfocal

En cuanto al valor medio de la interferencia celular, éste fue constante en los diferentes subestadios del paquiteno tanto en humanos como en gatos. Presentó, además, una gran variabilidad intraindividual en ambas especies, situándose el rango de la población estudiada entre el 35% y el 70% en humanos y el 25% y el 54% en gatos (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Interferencia por célula según la etapa del paquiteno en humanos y gatos.

Subestadio	Humanos		Gatos	
	N	Interferencia	N	Interferencia
Inicial	83	47	82	35
Medio	106	47	230	35
Tardío	105	47	122	35
Separación			105	34
<b>Total</b>	<b>294</b>	<b>47</b>	<b>539</b>	<b>35</b>

N: Número de núcleos analizados

Los valores medios de la interferencia total fueron, tanto en los humanos como gatos de este estudio, significativamente variables entre ellos. En humanos se situaron entre 45% en el individuo i16 y 50% en el individuo i9 ( $p < 0,001$ ). En gatos se situaron entre el 32% en el individuo FC6 y el 38% en el individuo FC12 ( $p < 0,001$ ).

En lo que respecta a la asociación de este parámetro con infertilidad, se observó una diferencia significativa entre los individuos control (0,480) y los pacientes OA (0,462;  $p = 0,044$ ) y también entre los dos grupos de pacientes entre ellos (NOA 0,492;  $p < 0,001$ ). Entre los individuos control y los pacientes NOA no se observó una diferencia significativa ( $p = 0,207$ ).

### Correlación entre la longitud de los SCs y el número de *foci* de MLH1

Para determinar si existe una relación entre la longitud de los SCs y el número de *foci* que poseen, se calculó la longitud media de los SCs agrupados según el número de *foci* de MLH1. En humanos, se analizaron un total de 376 núcleos procedentes de siete pacientes y tres controles. En gatos, se analizaron 550 núcleos, procedentes de 19 individuos.

Tanto en humanos como en gatos se observó una correlación significativa entre ambas variables en todos los individuos y también en la media de todos ellos (**Figuras 4.5 y 4.6**).

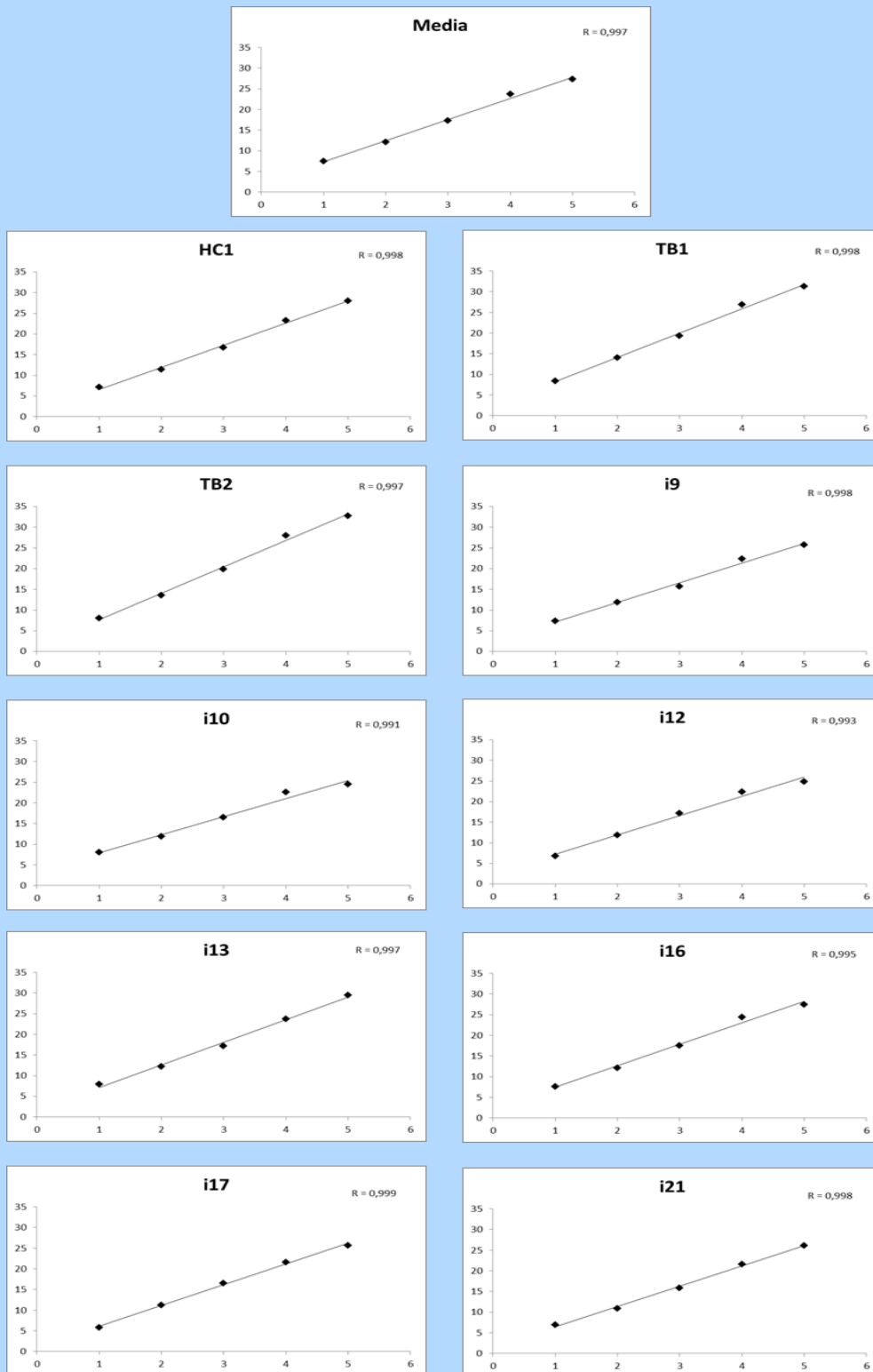
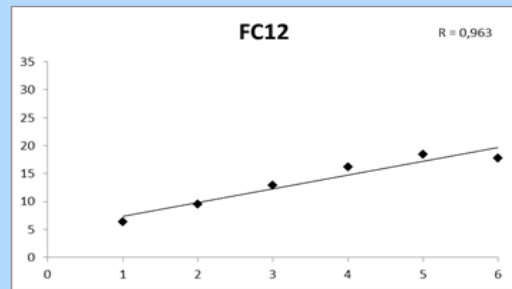
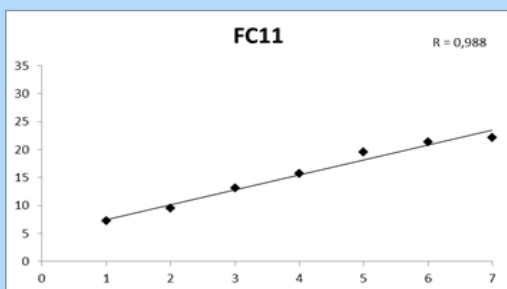
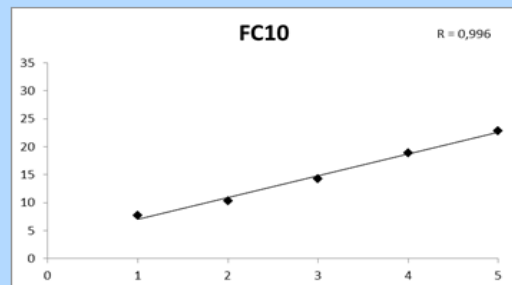
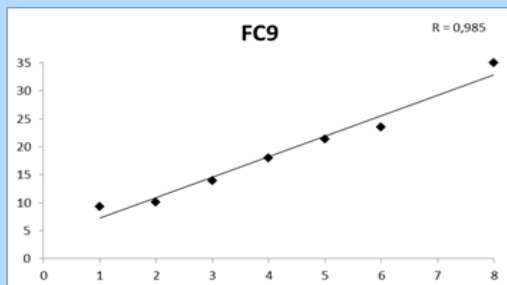
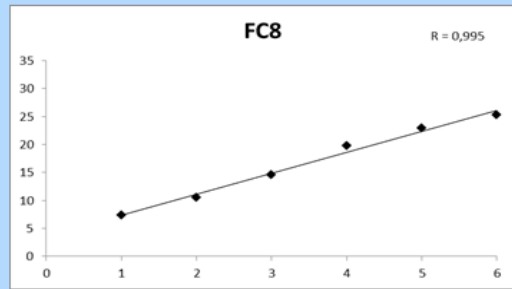
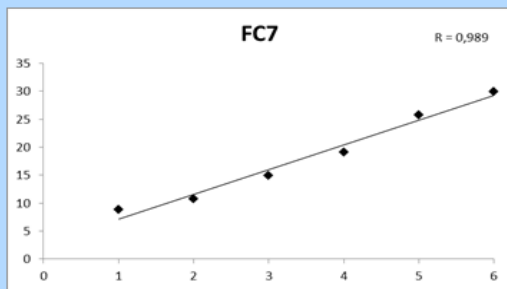
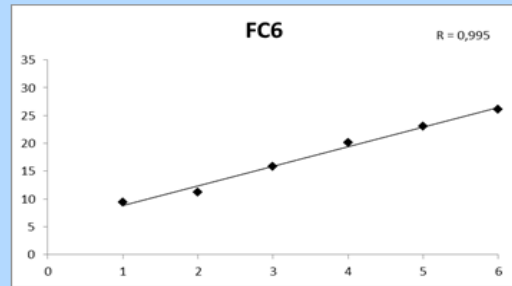
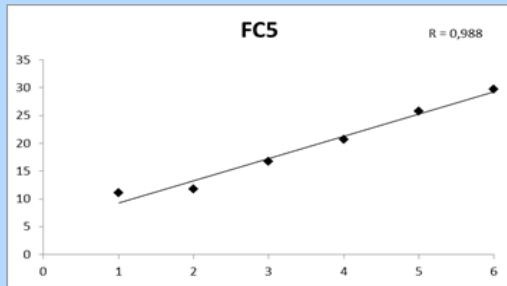
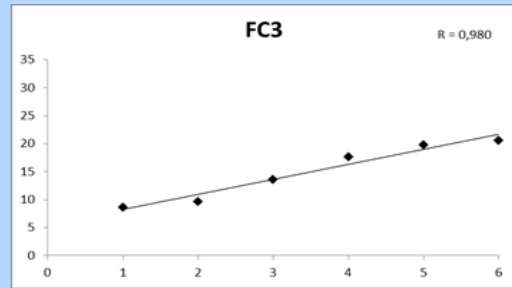
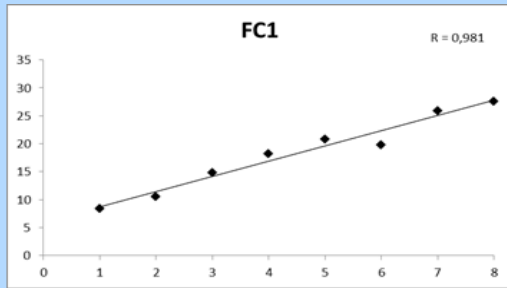


Figura 4.5. Correlación entre el número de *foci* de MLH1 y la longitud total de los SCs autosómicos en humanos (SCs agrupados según el número de *foci* de MLH1). Eje X: número de *foci* de MLH; eje Y: longitud total de los SCs autosómicos ( $\mu\text{m}$ )



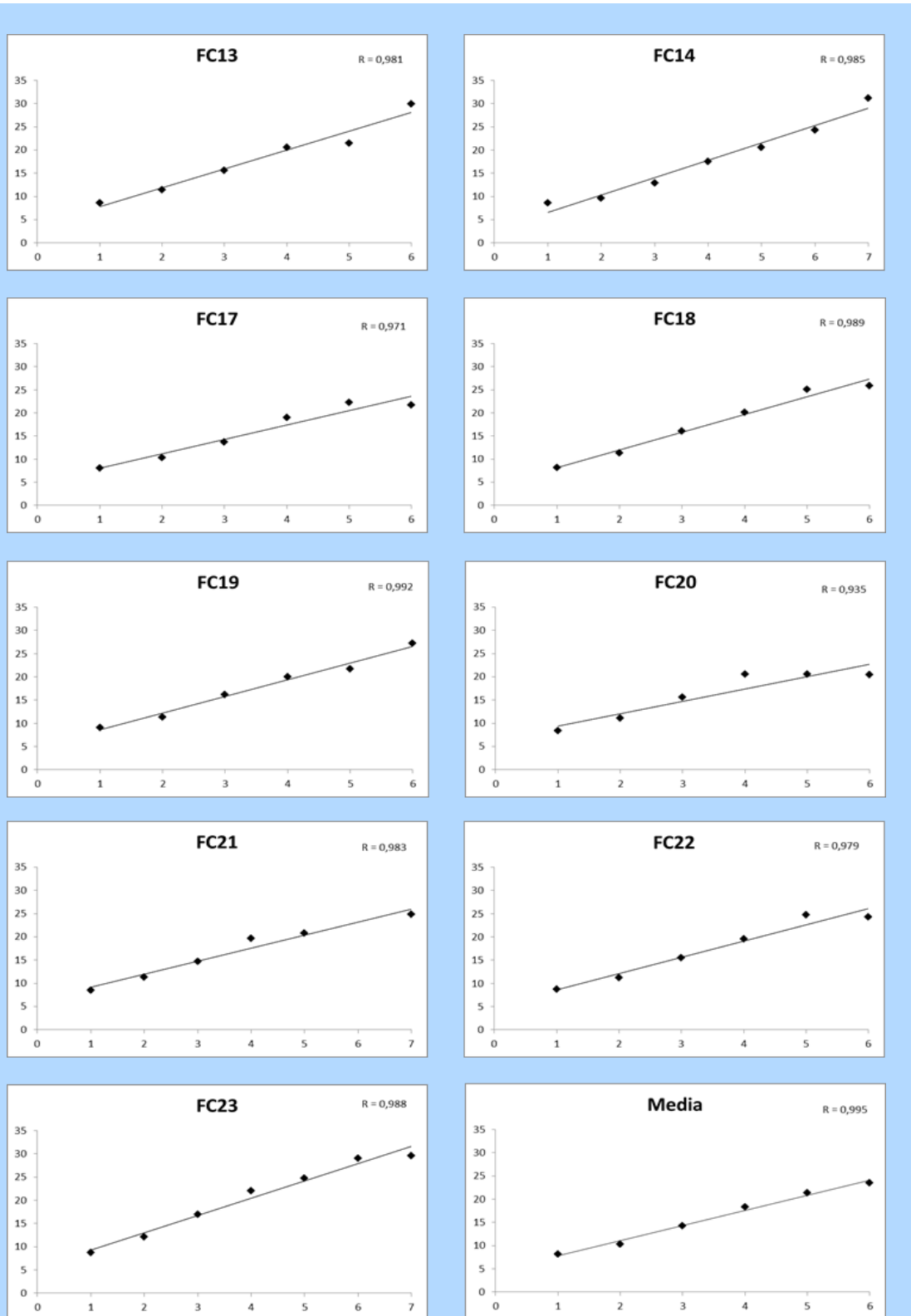


Figura 4.6. Correlación entre el número de *foci* de MLH1 y la longitud total de los SCs autosómicos en gatos (SCs agrupados según el número de *foci* de MLH1). Eje X: número de *foci* de MLH; eje Y: longitud total de los SCs autosómicos ( $\mu\text{m}$ )

## 4.2 SINAPSIS EN AUTOSOMAS

### 4.2.1. Anomalías sinápticas

Para estudiar la incidencia de anomalías sinápticas en la meiosis de mamíferos se analizaron meiocitos en fase de paquiteno procedentes de humanos, gatos y perros. En las tres especies, los núcleos fueron catalogados en cuatro grupos: normales (aquellos que no presentaban ningún tipo de anomalía), núcleos con asinapsis (si uno o más SCs presentaban regiones asinapsadas), núcleos con *gaps* (si uno o más SCs presentaban *gaps*), núcleos con asinapsis y *gaps* (si se observaban ambos tipos de defectos en los SCs) y núcleos con MSUC. En humanos y en gatos, los tipos principales de defectos sinápticos que se observaron fueron asinapsis, *gaps* y MSUC. En perros, en cambio, tan sólo se observó el fenómeno de MSUC.

El número de meiocitos analizados en humanos fue de 931. Los resultados obtenidos se reflejan en la [Tabla 4.9](#).

**Tabla 4.9. Frecuencia de núcleos con defectos sinápticos clasificados según defectos**

Ind.	Total	Asinapsis (%)				Gaps (%)				Asinapsis + Gaps (%)			
		I	M	T	Tot.	I	M	T	Tot.	I	M	T	Tot.
HC1	53,6	12,7	10,9	1,8	25,5	1,8	13,6	3,6	19,1	3,6	2,7	0,0	6,4
HC2	22,0	10,0	0,0	0,0	10,0	12,0	0,0	0,0	12,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TB1	22,9	13,3	5,7	0,0	19,0	1,0	1,0	0,0	1,9	1,0	0,0	0,0	1,0
TB2	10,0	5,0	2,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
i10	6,8	6,8	0,0	0,0	6,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
i12	18,4	11,4	0,9	0,0	12,3	1,8	1,8	1,8	5,3	0,9	0,0	0,0	0,9
i13	53,4	0,0	0,0	0,0	0,0	37,4	5,5	0,0	42,9	11,0	0,0	0,0	11,0
i16	32,4	20,6	6,9	1,0	28,4	2,0	1,0	0,0	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0
i17	11,5	3,4	0,0	1,1	4,6	3,4	0,0	0,0	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0
i21	21,7	10,9	3,3	1,1	15,2	4,3	1,1	1,1	6,5	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>C</b>	<b>27,9</b>	<b>10,3</b>	<b>5,3</b>	<b>1,4</b>	<b>14,2</b>	<b>2,5</b>	<b>4,2</b>	<b>1,0</b>	<b>7,7</b>	<b>1,3</b>	<b>0,8</b>	<b>0,0</b>	<b>2,1</b>
<b>OA</b>	<b>24,1</b>	<b>9,2</b>	<b>1,9</b>	<b>0,5</b>	<b>11,7</b>	<b>7,8</b>	<b>1,6</b>	<b>0,5</b>	<b>9,9</b>	<b>1,9</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>1,9</b>
<b>NOA</b>	<b>18,4</b>	<b>11,4</b>	<b>0,9</b>	<b>0</b>	<b>12,3</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>	<b>5,3</b>	<b>0,9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,9</b>

I: Paquiteno inicial, M: Paquiteno medio, T: Paquiteno tardío

C: Media de los controles, OA: Media de los OA, NOA: Media de los NOA

En este estudio, todos los individuos analizados presentaron defectos sinápticos. La incidencia de dichos defectos presentó una gran variabilidad interindividual ( $p < 0,001$ ) y

no se observaron diferencias significativas entre los pacientes y la población control (contrastes de los efectos del modelo  $p=0,247$ ; comparaciones por pares: control vs. OA  $p=0,795$ , control vs. NOA  $p=0,266$ . OA vs. NOA  $p=0,344$ ). El individuo que presentó menor incidencia de anomalías sinápticas fue i10 en el cual apenas un 6,82% de los meiocitos en paquiteno presentaba algún tipo de defecto. En el otro extremo se hallaron los individuos i13 y HC1 en los cuales un 53,85% y un 54,90% de los meiocitos tenían algún defecto en la formación de los complejos sinaptonemales, respectivamente. Los bivalentes más afectados por los defectos sinápticos fueron los submetacéntricos (65,86% del total de defectos) seguidos de los acrocéntricos (24,83% del total de defectos) y los metacéntricos (9,31%). Los defectos más frecuentes en los submetacéntricos fueron la asinapsis pericentromérica o subcentromérica (44,83% del total de defectos) y el *gap* pericentromérico o subcentromérico (19,31% del total de defectos). En el caso de los bivalentes acrocéntricos, la anomalía predominante fue la asinapsis telomérica (24,14% del total de defectos), asociada en más de la mitad de los casos al cuerpo sexual. Los núcleos más afectados fueron los que se hallaban en el subestadio inicial del paquiteno (45,9% de todos los núcleos en este subestadio), seguidos de aquellos en subestadio medio (19,4% todos los núcleos en este subestadio) y por último los meiocitos en subestadio tardío (6,7% todos los núcleos en este subestadio) (Tabla 4.10).

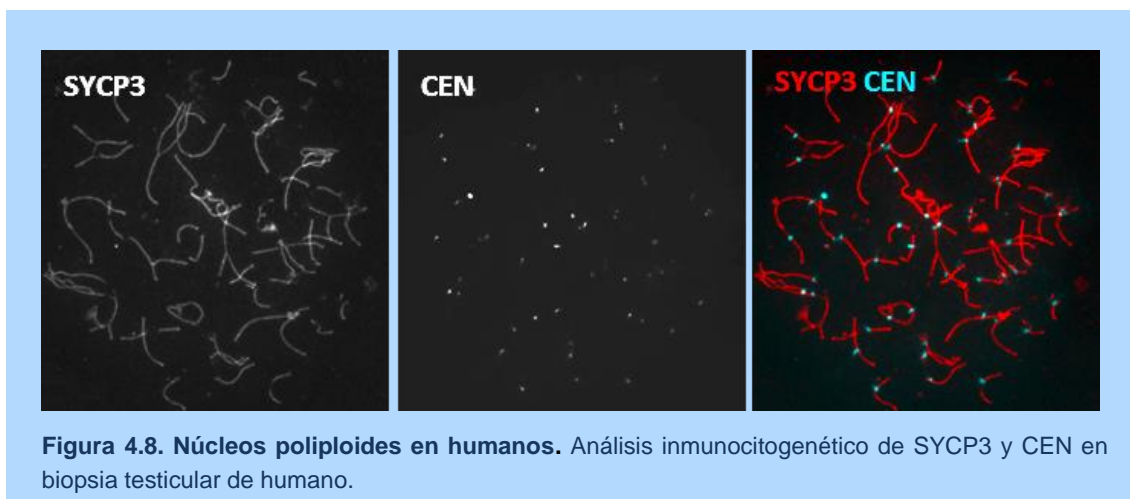
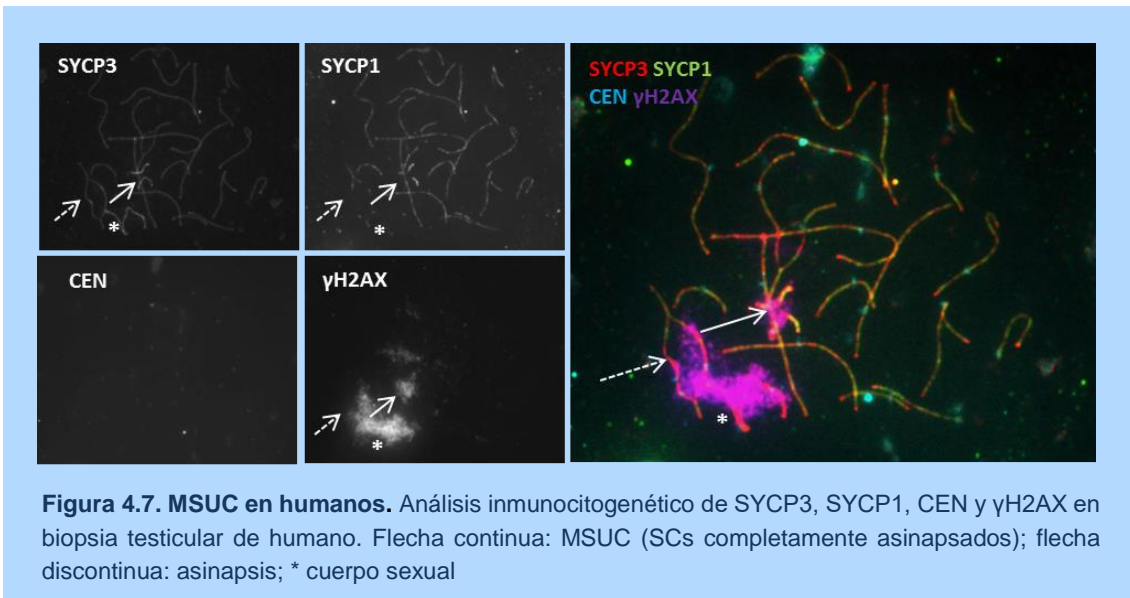
Tabla 4.10. Frecuencia de núcleos con defectos sinápticos clasificados según subestadio

Ind.	Inicial				Medio				Tardío			
	A	G	A+G	Tot.	A	G	A+G	Tot.	A	G	A+G	Tot.
HC1	38,7	6,5	12,9	58,1	19,3	26,3	5,3	50,9	15,4	30,8	0,0	46,2
TB1	55,2	3,4	3,4	62,0	16,2	0,0	0,0	16,2	0,0	4,0	0,0	4,0
TB2	18,5	0,0	0,0	18,5	5,0	0,0	0,0	5,0	3,8	0,0	0,0	3,8
i10	13,8	0,0	0,0	13,8	4,0	0,0	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0
i12	27,9	2,3	2,3	32,5	0,0	8,0	0,0	8,0	4,8	4,8	0,0	9,6
i13	51,6	0,0	16,1	67,7	23,8	0,0	0,0	23,8	NA	NA	NA	0,0
i16	40,4	3,8	0,0	44,2	17,9	2,6	0,0	20,5	10,0	0,0	0,0	10,0
i17	15,8	15,8	0,0	31,6	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0	0,0	2,2
i21	34,6	15,4	0,0	50,0	10,7	3,6	0,0	14,3	5,3	2,6	0,0	7,9
<b>Total</b>	<b>36,2</b>	<b>5,8</b>	<b>4,9</b>	<b>46,9</b>	<b>11,4</b>	<b>7,0</b>	<b>1,0</b>	<b>19,4</b>	<b>3,8</b>	<b>2,9</b>	<b>0,0</b>	<b>6,7</b>

A: Asinapsis; G: *Gap*; A+G: Asinapsis y *gap*

## Resultados

Además, se observó la presencia de SCs que presentaban MSUC en un núcleo en paquiteno de un individuo control (HC1), caracterizado por una mayor intensidad de fluorescencia de la proteína SYCP3 que otorga un aspecto más denso, presencia de la proteína  $\gamma$ H2AX y una reducción en la cantidad de la proteína SYCP1 (Figura 4.7). Concretamente, el MSUC afectaba a dos SCs completamente asinapsados (flecha continua en [Figura 4.7](#)). También se observaron dos núcleos poliploides en el individuo i13 ([Figura 4.8](#)).



En gatos, se analizaron un total de 1.050 núcleos en estadio de paquiteno de 21 individuos. Para el análisis de la asinapsis no se consideraron aquellos que se encontraban en el subestadio de desinapsis típica del final del paquiteno en gatos y que se describe más adelante. Los resultados se presentan en la [Tabla 4.11](#).

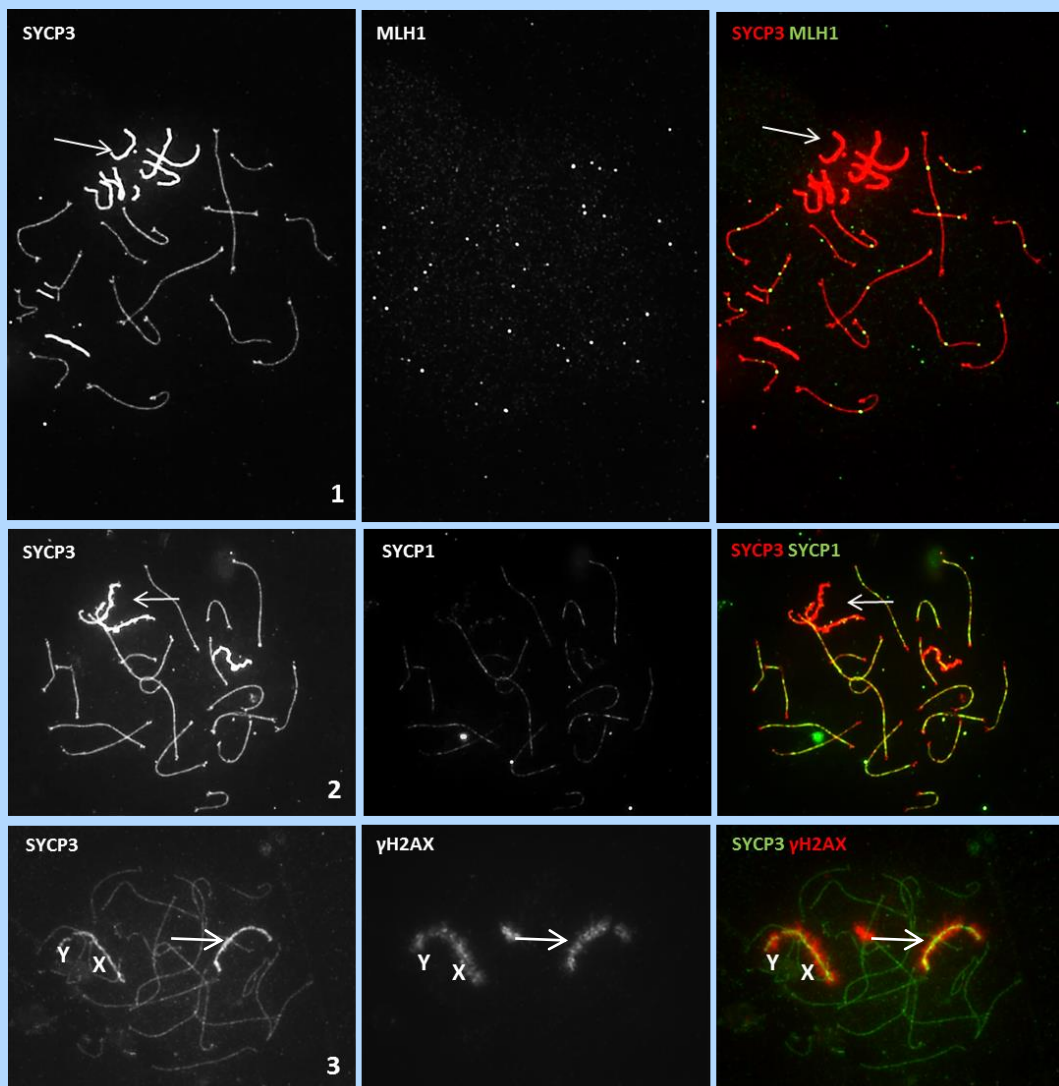


**Tabla 4.11. Frecuencia de núcleos con defectos sinápticos clasificados según defectos**

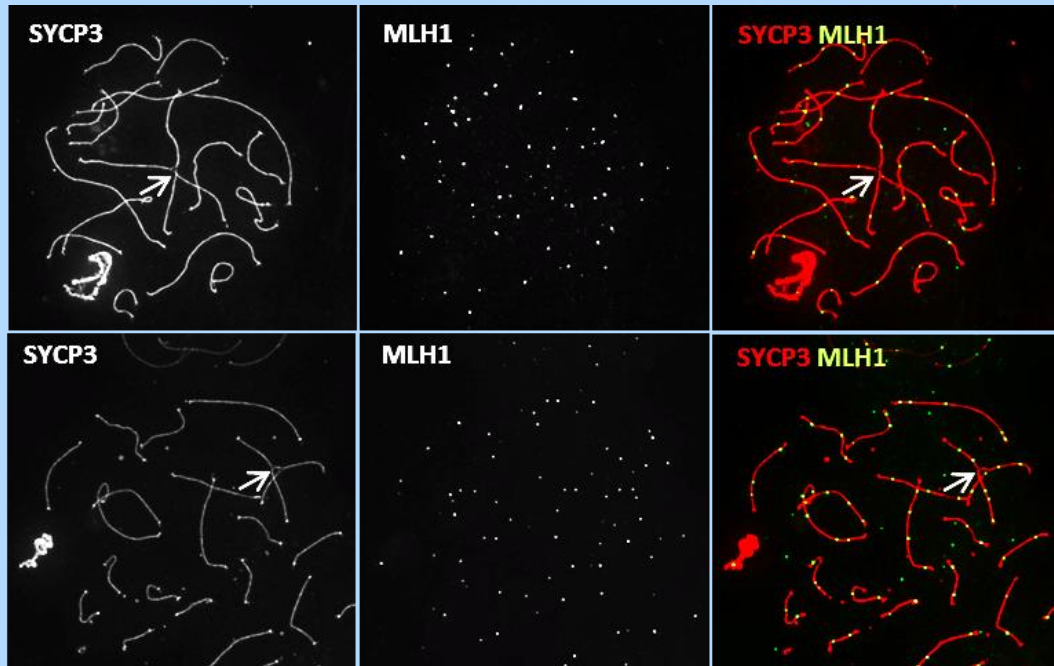
Individuo	Total (%)	Asinapsis (%)	Gaps (%)	MSUC (%)
FC1	2,4	0,0	0,0	2,4
FC2	2,9	0,0	0,0	2,9
FC3	0,0	0,0	0,0	0,0
FC4	1,5	0,0	0,0	1,5
FC5	0,0	0,0	0,0	0,0
FC6	1,9	1,9	0,0	0,0
FC7	4,0	0,0	0,0	4,0
FC8	0,0	0,0	0,0	4,0
FC9	0,0	0,0	0,0	0,0
FC10	12,0	4,0	0,0	8,0
FC11	2,0	0,0	0,0	2,0
FC12	4,0	0,0	0,0	4,0
FC13	4,0	2,0	0,0	2,0
FC14	16,0	0,0	4,0	12,0
FC17	2,0	2,0	0,0	0,0
FC18	4,0	0,0	0,0	4,0
FC19	2,0	2,0	0,0	0,0
FC20	8,0	2,0	4,0	2,0
FC21	19,0	0,0	0,0	19,0
FC22	3,8	0,0	0,0	3,8
FC23	0,0	0,0	0,0	0,0

En conjunto, los resultados obtenidos en gatos indicaron la existencia de variabilidad interindividual en la incidencia de anomalías sinápticas en los 21 individuos analizados. Las anomalías sinápticas fueron poco frecuentes y tan sólo se hallaron en siete de ellos (incidencia  $\leq 4\%$ ). Por el contrario, en 14 de los individuos se observó un porcentaje variable (1,5% a 19,0%) de núcleos en paquiteno en los cuales uno o más bivalentes estaban afectados por MSUC (Tabla 4.11 y Figura 4.9). Además, en dos individuos (FC9 y FC23) se observó un núcleo en paquiteno con un cuadrivalente (Figura 4.10).

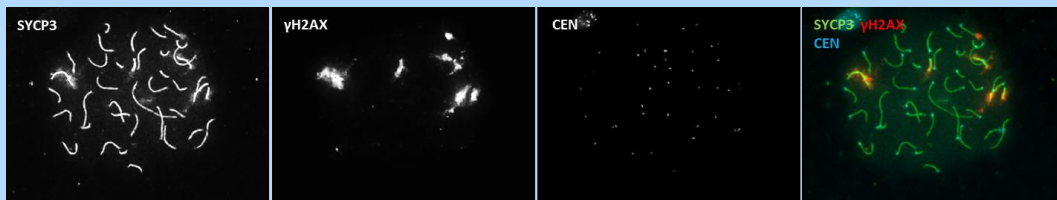
Finalmente, el estudio realizado en perros no detectó anomalías sinápticas del tipo asinapsis o *gaps* en ninguno de los 260 núcleos de los seis perros analizados en el presente estudio. En uno de los individuos analizados (CF1) se observó el fenómeno de MSUC (Figura 4.11).



**Figura 4.9. MSUC en gatos.** Análisis inmunocitogenético de SYCP3, SYCP1, MLH1 y  $\gamma$ H2AX en biopsia testicular de gatos. Flecha: MSUC.



**Figura 4.10. Núcleos con cuadrivalentes en gatos.** Análisis inmunocitogenético de SYCP3 y MLH1 en biopsia testicular de gatos. Las flechas señalan el cuadrivalente.



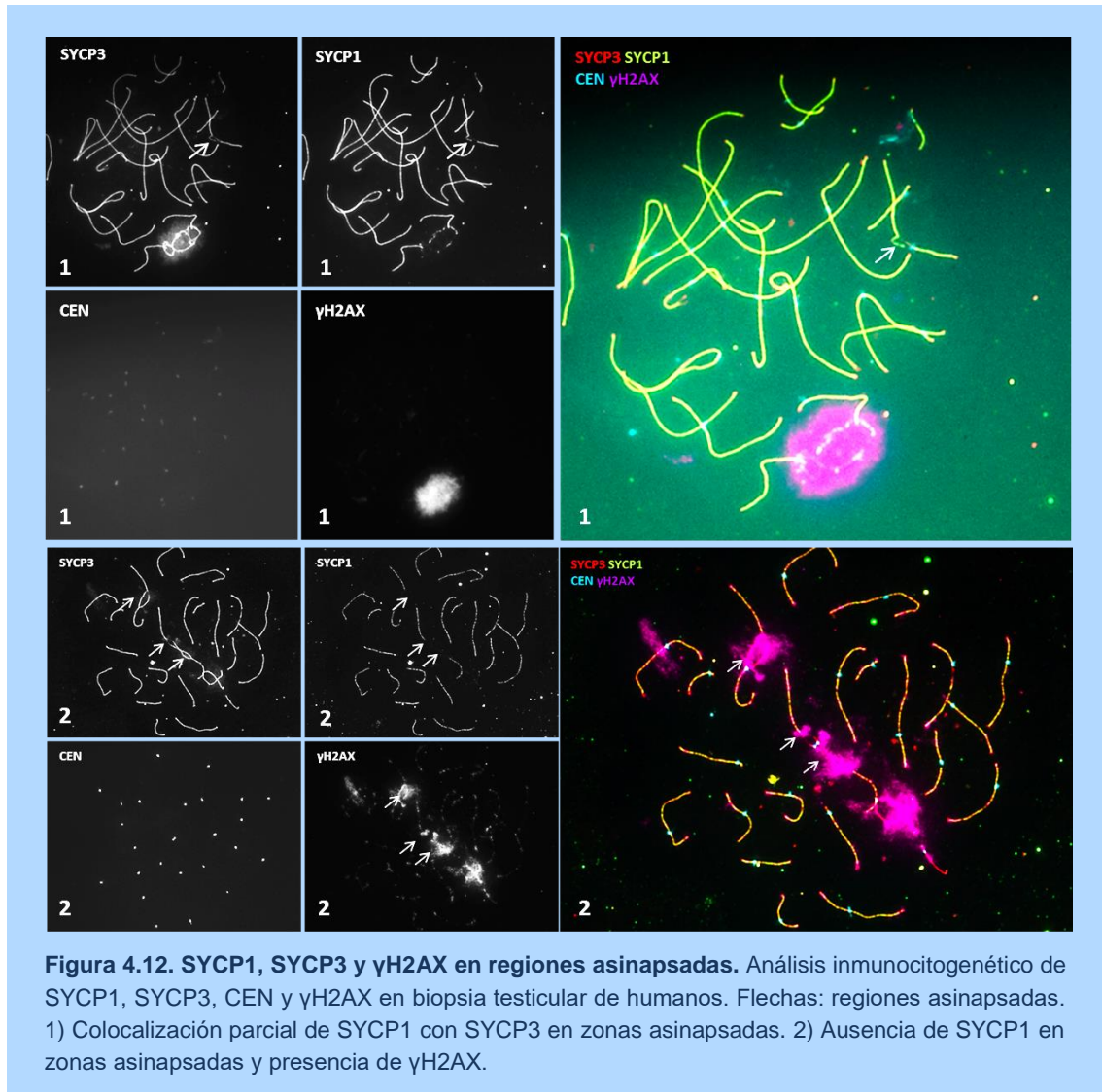
**Figura 4.11. MSUC en perros.** Análisis inmunocitogenético de SYCP3,  $\gamma$ H2AX y CEN en biopsia testicular de perros.

### Presencia de SYCP1 y $\gamma$ H2AX en zonas asinapsadas

Se analizó la presencia de SYCP1 y  $\gamma$ H2AX en paquitenos que contenían regiones en asinapsis en humanos. La práctica ausencia de asinapsis en gatos y perros imposibilitó el análisis en estas dos especies.

En humanos, se estudiaron de forma cualitativa en tres pacientes control las zonas asinapsadas respecto a la presencia de las proteínas SYCP1 y  $\gamma$ H2AX. Para ello se examinaron un total de 30 meiocitos en paquitenos. En un 40% (12 de 30) de los núcleos, la proteína SYCP1 colocalizaba completamente con la proteína SYCP3 en las regiones de asinapsis. En un 36,7% de los núcleos (11 de 30), algunos *foci* de SYCP1

colocalizaban con SYCP3 y en los restantes (23,3%, 9 de 30) no se observaba señal de SYCP1. Sólo en uno de los núcleos se observó señal de la proteína  $\gamma$ H2AX en la región asinapsada (sin SYCP1) (**Figura 4.12**).



### 4.2.2. Características del proceso sináptico en la especie *Felis catus*

#### Características sinápticas

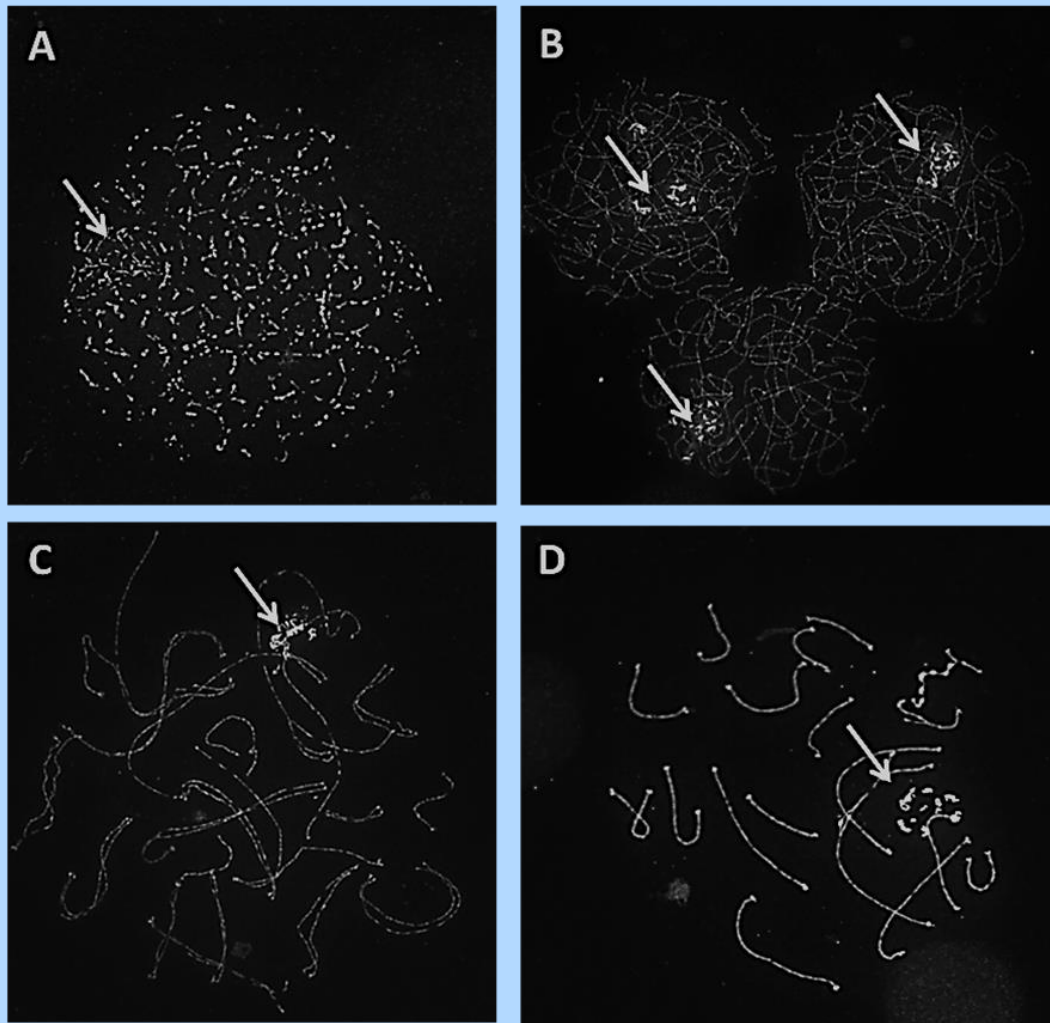
Se observó que, al igual que en otros mamíferos<sup>8,70,250-252</sup>, la formación de los elementos axiales de los SCs en gatos se inicia durante la etapa de leptoteno, en donde se apreciaron fragmentos cortos de SYCP3 que adoptaban una estructura lineal. Durante la fase de zigoteno, la formación de dichos elementos laterales fue completa y se inició la sinapsis entre los cromosomas homólogos, promovida por la proteína SYCP1. Esta

proteína forma parte del elemento central de los SCs durante el paquiteno, etapa en la que se observaron en el núcleo del espermatozoido los 18 SCs de los autosomas y el cuerpo sexual. No obstante, el hecho destacado sobre la proteína SYCP1 en gatos es que empezó a desaparecer antes del inicio del diploteno, durante el paquiteno medio-tardío.

Una segunda característica particular observada en la meiosis de gatos fue la formación de agregados de proteína SYCP3 desde el leptoteno hasta el inicio del paquiteno. Los fragmentos de SYCP3 presentes en estos agregados eran diferentes de aquellos que forman parte de los elementos laterales tanto por la morfología, como por la distribución y la intensidad (**Figura 4.13**, A y B). Este agregado alcanzó su máximo grado de compactación durante la etapa de zigoteno (**Figura 4.13**, C). Al inicio de paquiteno se localizó en regiones diferenciadas por aglomeraciones de SYCP3 de elevada densidad (**Figura 4.13**, D). Este agregado de SYCP3 se observó en todos los gatos analizados, particularmente en los paquitenos de un gato de cuatro meses de edad (FC10), que se caracterizaron por estar en estadios muy iniciales de dicha fase.

El siguiente elemento distintivo observado durante el análisis realizado en meiocitos de gatos fue la presencia de unas protuberancias esféricas situadas en las regiones teloméricas de todos los SCs autosómicos. Estas protuberancias estaban formadas por proteína SYCP3 pero no por SYCP1 (**Figura 4.14**). De hecho, en ninguna de las tres especies analizadas en el presente estudio se halló proteína SYCP1 en las regiones teloméricas de los SCs autosómicos, aunque fue en gatos donde esta ausencia fue más notable.



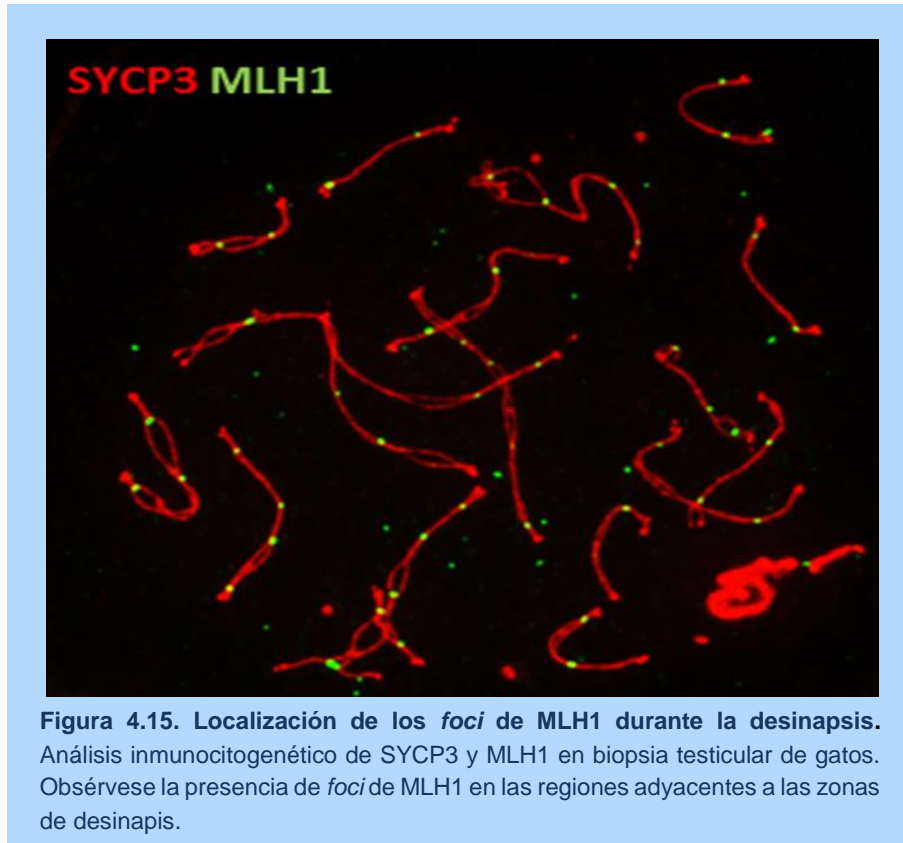


**Figura 4.13. Agregado de SYCP3 en diferentes etapas de la profase I en gatos.** A: Leptoteno. B: Zigoteno medio. C: Zigoteno tardío. D: Paquiteno inicial. Flechas: Agregado de SYCP3.



**Figura 4.14. Protuberancias esféricas en las regiones teloméricas de los SCs.** Análisis inmunocitogenético de SYCP3 y SYCP1 en biopsia testicular de gatos. La flecha señala una de las protuberancias presentes en las regiones teloméricas de los SCs.

Por último, en el proceso sináptico de los gatos destaca el hecho de que la proteína MLH1 se continúa observando durante la desinapsis típica de los SCs de gatos. En este proceso de desinapsis, esta proteína se localiza en las regiones de desinapsis como punto de unión entre homólogos en esa región (**Figura 4.15**).



Durante el análisis, se cuantificó la presencia de *foci* de MLH1 en estas regiones en dos individuos (**Figura 4.15**). En todos los cromosomas analizados se observó una elevada presencia de *foci* de MLH1 en uno o ambos extremos de la región desinapsada. Los valores fueron similares en los dos individuos analizados y también entre los diferentes tipos de cromosomas con valores superiores al 70%, a excepción de los cromosomas acrocéntricos del individuo FC3 con un valor próximo al 55% (**Figura 4.16**).

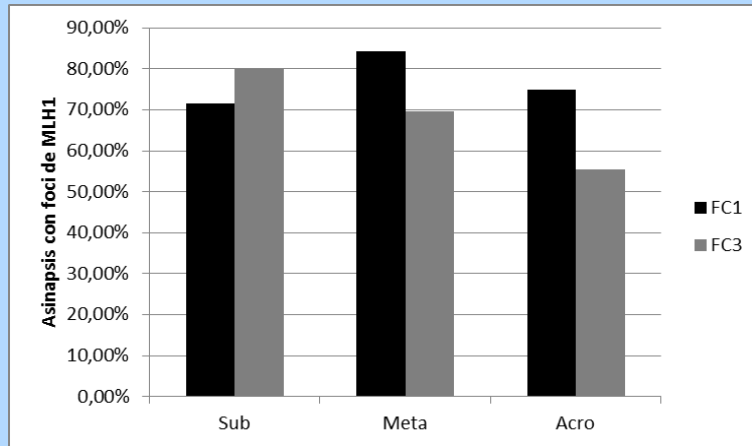


Figura 4.16. Análisis de la presencia de un foco de MLH1 en los extremos de las zonas asinapsadas.

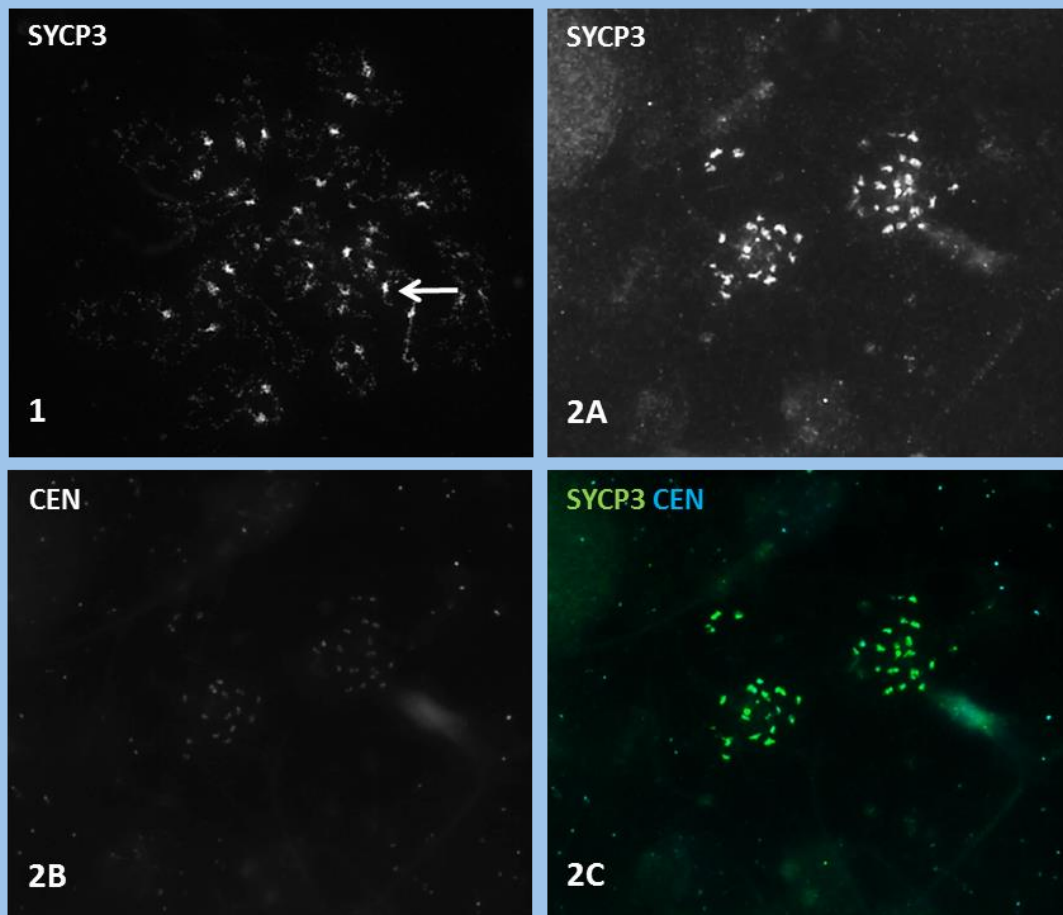


Figura 4.17. Localización de la proteína SYCP3 durante la metafase I en gatos. Análisis inmunocitogenético de SYCP3 y CEN en biopsia testicular de gatos. 1) Metafase. Flecha: cromosomas XY. 2) Anafase



Una vez se alcanza el estadio de metafase I se observó la presencia de SYCP3 a lo largo del eje de los cromosomas homólogos y concentraciones notables de dicha proteína en los centrómeros (**Figura 4.17**, 1). En anafase, la proteína SYCP3 se observó únicamente a nivel de centrómeros I (**Figura 4.17**, 2).

### Inicio y progresión de la sinapsis en *Felis catus*

En base a los criterios descritos en la metodología, se obtuvieron un total de 350 bivalentes analizables de 68 células en fase de zigoteno en un individuo (FC1). De estos 350 bivalentes, 110 correspondían a cromosomas metacéntricos, 210 a cromosomas submetacéntricos y 30 a cromosomas acrocéntricos.

De acuerdo con las morfologías observadas (**Figura 4.18**), se clasificaron los 110 bivalentes metacéntricos en una de las cuatro categorías que se citan a continuación:

- sinapsis en ambos extremos, formación completa del SC en uno de los brazos, asinapsis desde centrómero hacia el otro brazo (**Figura 4.18**, A)
- sinapsis en ambos extremos, formación parcial del SC en ambos brazos, asinapsis que engloba la región pericentromérica de ambos brazos (**Figura 4.18**, B)
- sinapsis en ambos extremos, formación parcial del SC en ambos brazos, asinapsis que engloba la región pericentromérica de ambos brazos, una o dos asinapsis en la región intersticial (**Figura 4.18**, C)
- otras más complejas



**Figura 4.18.** Morfologías observadas en el inicio de sinapsis en cromosomas metacéntricos en gatos

La frecuencia con la que se halló cada una de las conformaciones fue la expresada en la **Tabla 4.12**.

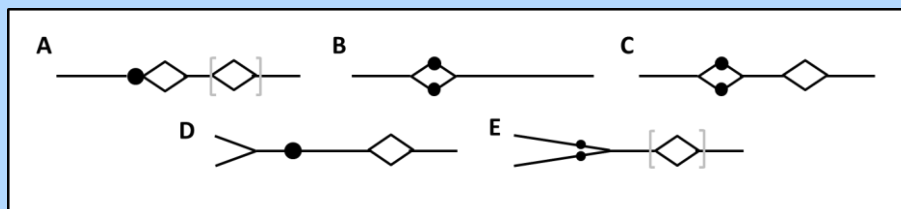
**Tabla 4.12. Análisis de la sinapsis de los cromosomas metacéntricos en gatos.**

Gato	N	A	B	C	D
FC1	110	27,27%	22,73%	31,82%	18,18%

N: Número de bivalentes analizados. A, B y C se corresponden con las morfologías de la Figura 4.18, D otras morfologías más complejas.

Los 210 bivalentes submetacéntricos se clasificaron en una de las seis categorías citadas a continuación (**Figura 4.19**):

- sinapsis en ambos extremos, formación del SC completa en el brazo corto, asinapsis desde centrómero hacia el brazo largo y asinapsis adicionales en el brazo largo (**Figura 4.19**, A)
- sinapsis en ambos extremos, formación parcial del SC en ambos brazos, asinapsis que engloba la región pericentromérica de ambos brazos (**Figura 4.19**, B)
- sinapsis en ambos extremos, formación parcial del SC en ambos brazos, asinapsis que engloba la región pericentromérica de ambos brazos y asinapsis adicionales en el brazo largo (**Figura 4.19**, C)
- brazo corto en asinapsis, centrómero en sinapsis completa, una o más regiones en asinapsis a lo largo del brazo largo, y sinapsis en la región telomérica del brazo largo (**Figura 4.19**, D)
- asinapsis desde el telómero del brazo corto hasta la región intersticial del brazo largo (incluye centrómero), telómero de brazo largo en sinapsis y asinapsis adicionales en el brazo largo (**Figura 4.19**, E)
- otras más complejas



**Figura 4.19. Morfologías observadas en el inicio de sinapsis en cromosomas submetacéntricos en gatos**

La frecuencia con la que se halló cada una de las conformaciones fue la expresada en la **Tabla 4.13**.

**Tabla 4.13. Análisis de la sinapsis de los cromosomas submetacéntricos en gatos.**

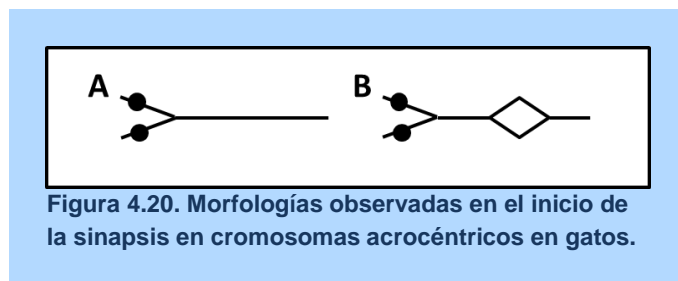
Gato	N	A	B	C	D	E	F
FC1	210	30,95%	11,90%	11,90%	11,90%	21,43%	11,90%

N: Número de bivalentes analizados. A, B, C, D y E se corresponden con las morfologías de la Figura 4.19, F otras morfologías más complejas.

Los 30 SCs acrocéntricos se clasificaron en una de las dos categorías citadas a continuación (**Figura 4.20**):

- centrómero en asinapsis, telómero de brazo largo ya en sinapsis (**Figura 4.20, A**)
- centrómero en asinapsis, región intersticial en brazo largo en asinapsis, telómero de brazo largo ya en sinapsis (**Figura 4.20, B**)

La frecuencia con la que se halló cada una de las conformaciones fue la expresada en la **Tabla 4.14**.



**Tabla 4.14. Análisis de la sinapsis de los cromosomas acrocéntricos en gatos**

Gato	N	A	B
FC1	30	50,00%	50,00%

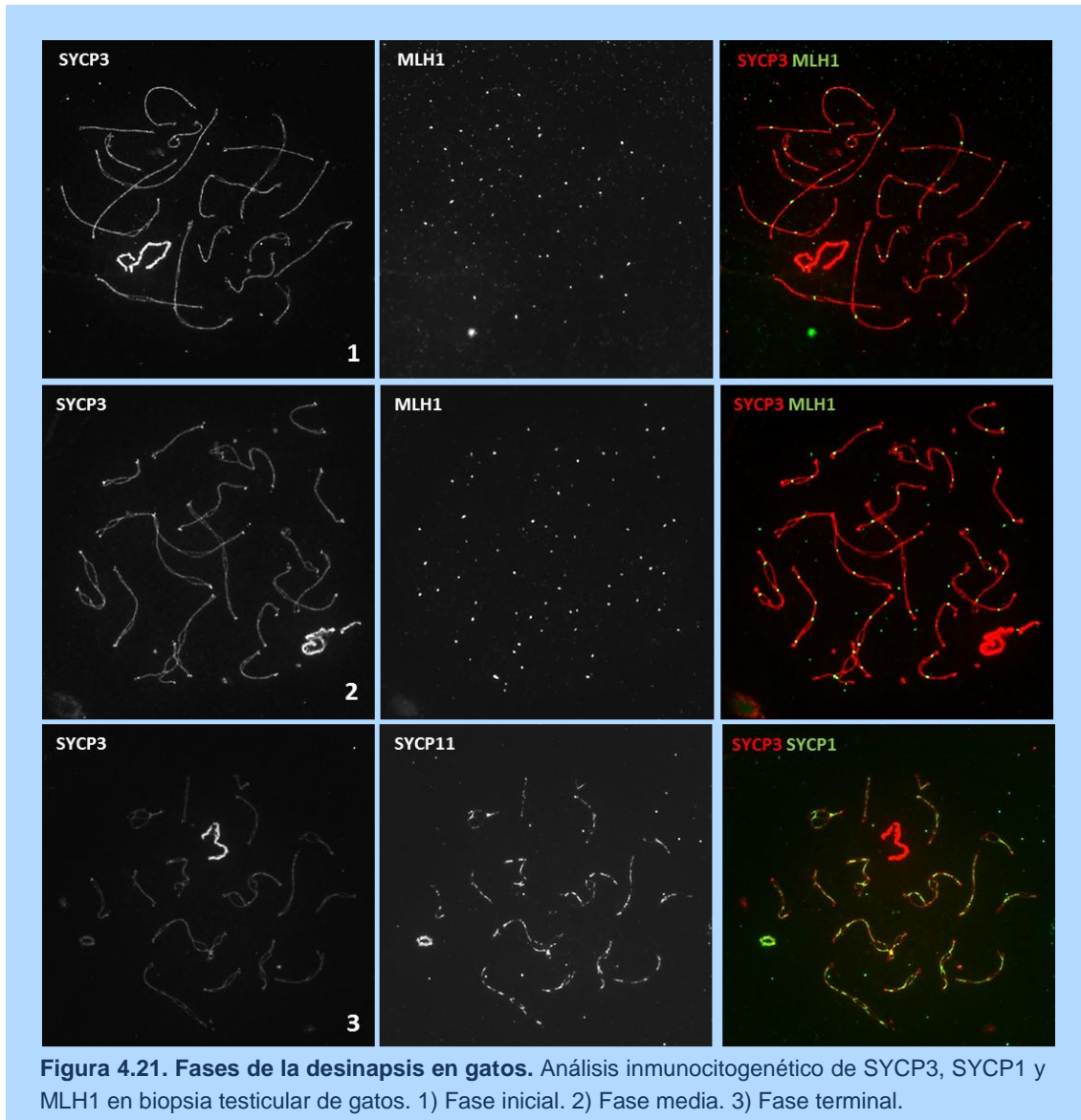
N: Número de bivalentes analizados. A y B se corresponden con las morfologías de la Figura 4.20.

### Iniciación y progresión de la desinapsis en *Felis catus*

Como se ha descrito anteriormente, la fase final del paquiteno de los gatos se caracteriza por el inicio del proceso de desinapsis, es decir de separación de los elementos laterales y desaparición del elemento central (SYCP1) (**Figura 4.21**).

## Resultados

En base a los criterios expuestos en la metodología, se obtuvieron un total de 164 bivalentes (83 submetacéntricos, 70 metacéntricos, 11 acrocéntricos) analizables de 32 células (en fase de desinapsis inicial) en 2 individuos (FC1 y FC3).

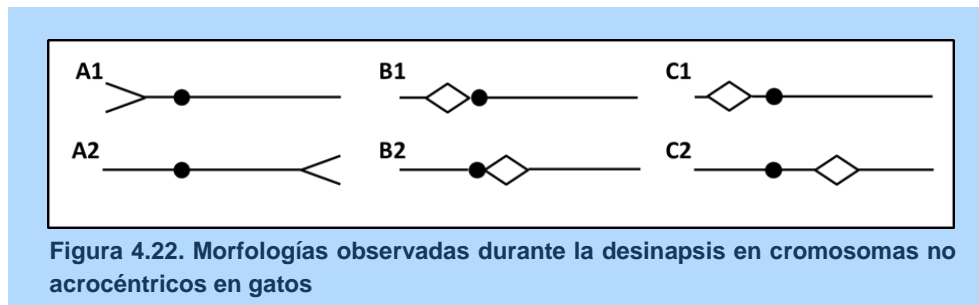


Los cromosomas no acrocéntricos (metacéntricos y submetacéntricos) se clasificaron, según morfología observada, en una de las siguientes categorías

- desinapsis en la región telomérica, que se extiende hasta un punto intersticial del brazo correspondiente (**Figura 4.22, A, A1** en brazo corto y **A2** en brazo largo)
- desinapsis intersticial hasta centrómero, que abarca desde un punto intermedio del SC, bien del brazo corto o largo, hasta el centrómero (**Figura 4.22, B1** y **B2**)

- desinapsis intersticial, que se extiende entre dos puntos intersticiales situados en el mismo brazo cromosómico (**Figura 4.22**, B, C1 en brazo corto y C2 en brazo largo)

Cabe resaltar que en un mismo SC se podían contabilizar uno o varios de estos tipos de desinapsis a la vez. Para el análisis se calcularon los porcentajes de cada uno de los tipos establecidos, agrupando a los cromosomas según su morfología.



Los porcentajes obtenidos para cada una de las morfologías se detallan en la **Tabla 4.15**. En el caso de los cromosomas submetacéntricos (**Tabla 4.15**) se observó una distribución relativamente homogénea de la desinapsis en las regiones telomérica (33,05%), intersticial hasta centrómero (30,76%) e intersticial (36,19%). En el caso de la desinapsis telomérica, ésta fue más frecuente en el brazo corto (22,86% frente a 10,18% en el brazo largo), observándose la relación inversa en las desinapsis intersticiales (4,75% en el brazo corto frente a 31,44% en el brazo largo). Dicha distribución fue además similar para ambos individuos.

En el caso de los cromosomas metacéntricos (**Tabla 4.15**) se observaron diferencias entre los dos individuos analizados. En el caso del individuo FC3 volvió a observarse una distribución relativamente homogénea de la desinapsis en las regiones telomérica (32,14%), intersticial hasta centrómero (33,93%) e intersticial (33,93%). Tanto la desinapsis telomérica como intersticial fueron más frecuentes en el brazo corto que en el brazo largo. En el individuo FC1 la desinapsis se concentró en la región intersticial (50,98%), seguida de la intersticial hasta centrómero (33,33%) y la telomérica (15,69%).

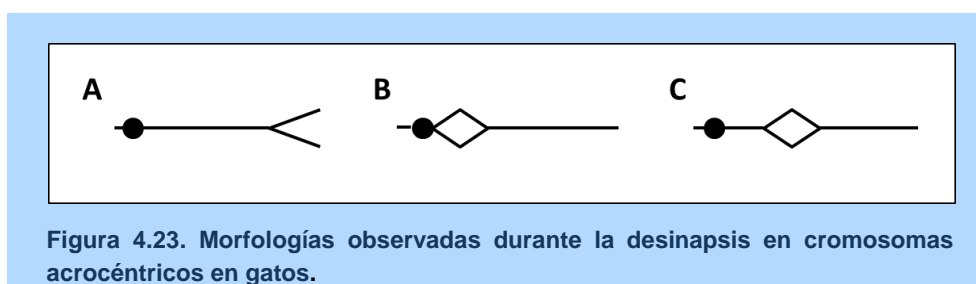
**Tabla 4.15. Análisis de la desinapsis de los cromosomas metacéntricos y submetacéntricos en gatos.**

Gato	Tipo	Tel p (A1)	Tel q (A2)	Tel total (A1+A2)	Cen (B)	I p (C1)	I q (C2)	I total (C1+C2)
FC1	Sub	20,27%	9,46%	29,73%	32,43%	4,05%	33,78%	37,84%
FC3	Sub	25,45%	10,91%	36,36%	29,09%	5,45%	29,09%	34,55%
<b>Media</b>	<b>Sub</b>	<b>22,86%</b>	<b>10,18%</b>	<b>33,05%</b>	<b>30,76%</b>	<b>4,75%</b>	<b>31,44%</b>	<b>36,19%</b>
FC1	Meta	13,73%	1,96%	15,69%	33,33%	21,57%	29,41%	50,98%
FC3	Meta	28,57%	3,57%	32,14%	33,93%	21,43%	12,50%	33,93%
<b>Media</b>	<b>Meta</b>	<b>21,15%</b>	<b>2,77%</b>	<b>23,91%</b>	<b>33,63%</b>	<b>21,50%</b>	<b>20,96%</b>	<b>42,45%</b>

A1, A2, B, C1 y C2 se corresponden con las morfologías de la Figura 4.22.

Para el análisis de la desinapsis en los cromosomas acrocéntricos, éstos se clasificaron en una de las tres categorías que se citan a continuación (**Figura 4.23**):

- desinapsis telomérica: presencia de desinapsis en la región telomérica del brazo largo, que se extiende hasta un punto intersticial (**Figura 4.23**, A)
- desinapsis que empieza en el (o se extiende hasta el) centrómero: en estos casos la desinapsis abarca desde el centrómero (generalmente no incluido en la región asinapsada) hasta un punto intermedio en el SC (**Figura 4.23**, B)
- desinapsis intersticial: la desinapsis se extiende entre dos puntos intersticiales (**Figura 4.23**, C)



En el caso de los cromosomas acrocéntricos (**Tabla 4.16**) también se observaron ligeras diferencias entre los dos individuos analizados. En ambos estaban presentes las desinapsis intersticiales y aquellas en las que un extremo era el centrómero, mientras que la telomérica del brazo largo sólo se observó en el individuo FC1.

**Tabla 4.16. Análisis de la desinapsis de los cromosomas acrocéntricos en gatos**

Gato	Tel q (A)	Cen (B)	I q (C)
FC1	12,50%	37,50%	50,00%
FC3	0,00%	55,56%	44,44%
<b>Media</b>	<b>6,25%</b>	<b>46,53%</b>	<b>47,22%</b>

A, B y C se corresponden con las morfologías de la Figura 4.23.

#### 4.3.4. Características sinápticas en perros

El estudio sináptico en los perros del presente estudio confirmó las observaciones realizadas en otras especies<sup>8,70,250,251</sup>: en el zigoteno se forman los elementos axiales, visibles en forma de fragmentos cortos de SYCP3 y con escasa asociación entre homólogos en el leptoteno. En el zigoteno la formación de dichos elementos laterales es completa y empieza a observarse el apareamiento entre homólogos. En el paquiteno ya ha finalizado el apareamiento y se pueden ver los 38 SCs de los autosomas y el cuerpo sexual en cada núcleo.

En esta especie no se determinaron características o procesos particulares como sí fue el caso de los gatos estudiados.

## 4.4. ANÁLISIS DEL CUERPO SEXUAL: MORFOLOGÍA, ESTADIOS DE PAQUITENO, RECOMBINACIÓN Y SINAPSIS

### 4.4.1. Morfología del cuerpo sexual durante el paquiteno de gatos y perros

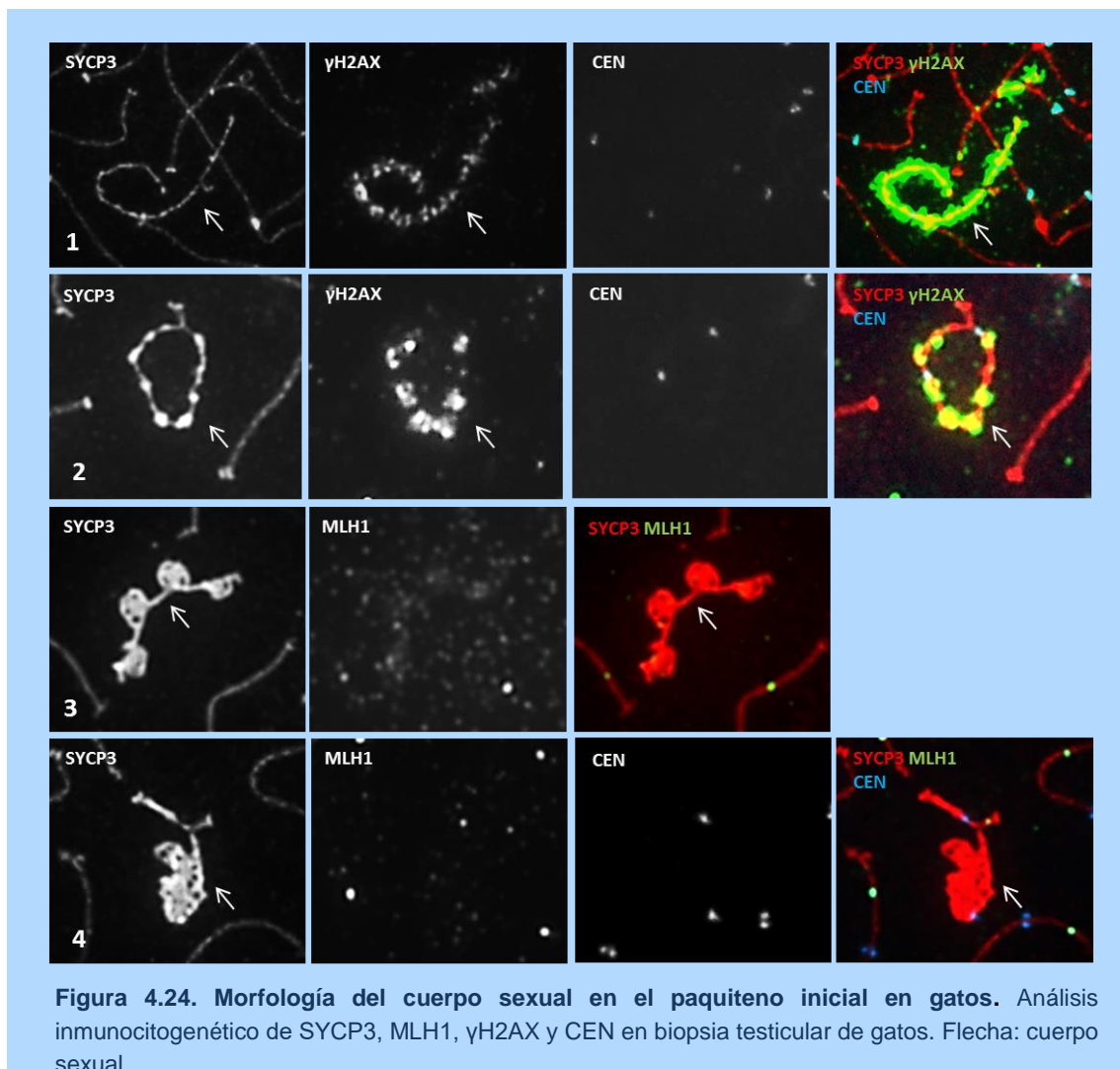
La temporalidad del paquiteno y por lo tanto del cuerpo sexual se determinó en base a la presencia de la proteína  $\gamma$ H2AX. Como se ha indicado anteriormente, y al igual que lo observado en otras especies, la presencia de  $\gamma$ H2AX es considerable en el paquiteno inicial (en autosomas) y va disminuyendo hasta quedar limitada al cuerpo sexual en el paquiteno medio y tardío<sup>253</sup>. Además, en gatos se tuvieron en cuenta otras variables establecidas en el presente estudio y que son: la presencia del agregado de SYCP3 (indicador de paquitenos muy iniciales), la presencia de las protuberancias teloméricas y la desinapsis de los autosomas (indicador de paquiteno tardío).

En gatos, durante la fase inicial del paquiteno el cuerpo sexual presentó una estructura lineal cuyo grosor se correspondía con el de los elementos laterales/axiales (Figura 4.24, 1). Los SCs de los cromosomas sexuales se distinguían fácilmente y se hallaban

## Resultados

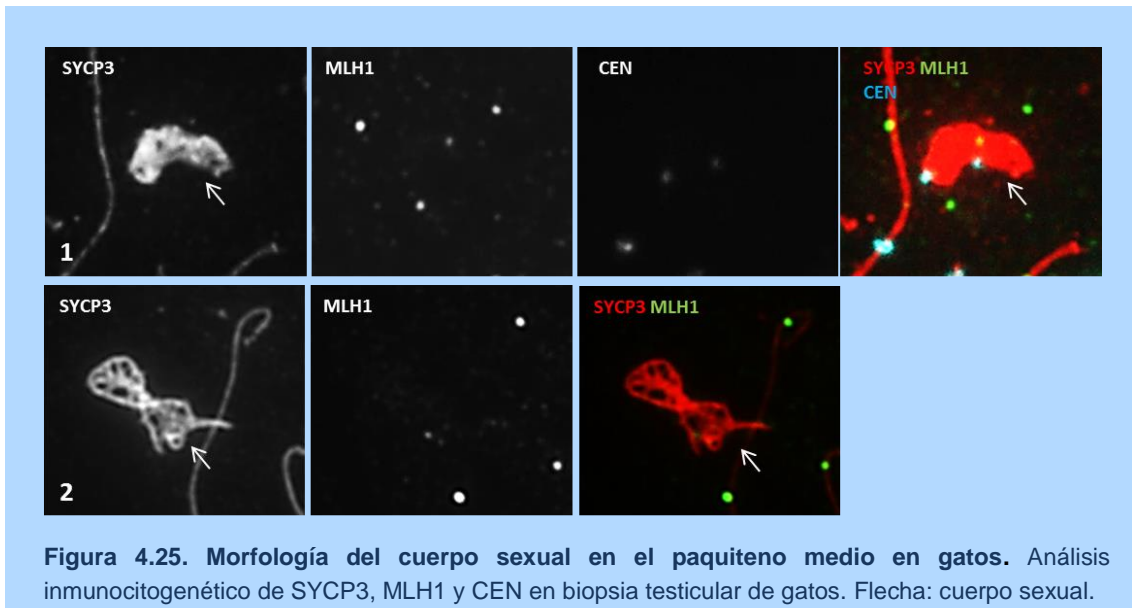
unidos en la región PAR. Dicha estructura lineal fue sufriendo un cambio de compactación gradual, que empezó con la aparición de estructuras globulares, pequeñas y numerosas al principio (Figura 4.24, 2), y de mayor tamaño y más escasas a medida que avanzaba el paquiteno (Figura 4.24, 3), constituyendo una sola estructura “globular” hacia el final del paquiteno inicial (Figura 4.24, 4).

En esta fase inicial, el cromosoma Y no pareció sufrir ningún tipo de compactación y conservó la estructura lineal.

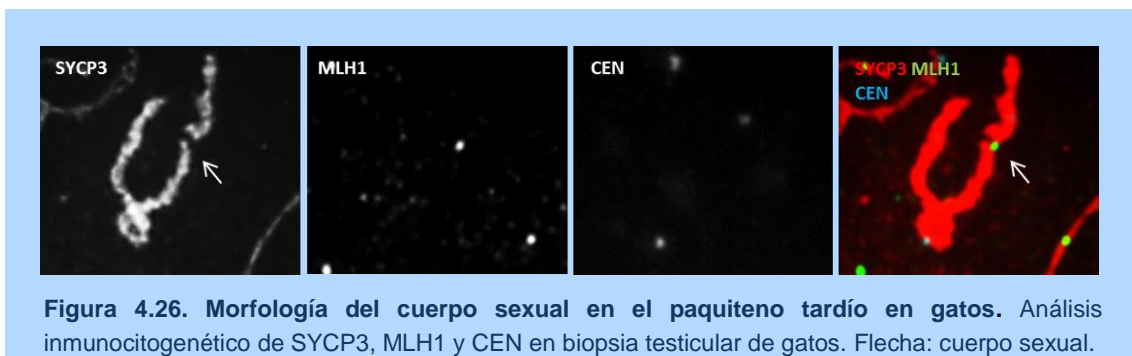


En el paquiteno medio (Figura 4.25), el cuerpo sexual presentó una estructura muy compactada en la cual ya no se podían distinguir los elementos laterales de los cromosomas sexuales.





Una vez alcanzado este grado de compactación máximo en el paquiteno medio, el cuerpo sexual sufrió un proceso de descompactación paulatino. Durante el progreso de dicho proceso, los SCs de los cromosomas sexuales volvían a presentar una estructura lineal, que se diferenciaba de la del paquiteno inicial por un mayor grosor. En ocasiones, los complejos sinaptonemales de los cromosomas sexuales estaban separados en la fase final del paquiteno (flecha en [Figura 4.26](#)). En algunos de estos cuerpos sexuales se observaba un punto de MLH1 en el espacio de separación existente entre los elementos laterales de los cromosomas X e Y.



Por lo que respecta al cuerpo sexual en perros, éste presentó siempre una estructura lineal siendo el grosor de los ejes de los cromosomas sexuales mayor que el de los autosomas.

#### 4.4.2. Estadios del paquiteno

En el presente estudio se analizaron los subestadios de paquiteno en humanos y gatos para determinar los valores en estas dos especies. En perros no se pudieron determinar los subestadios, ya que el criterio empleado fueron las distintas conformaciones que va adoptando el cuerpo sexual, y en el caso de esta especie siempre presenta la misma estructura lineal. Los estadios en humanos se clasificaron según Solari y Codina-Pascual<sup>148,149</sup> y en gatos según lo determinado en el presente estudio ([Apartado 4.4.1](#)). En humanos, además, los valores obtenidos se utilizaron para establecer si existe una asociación de este parámetro con infertilidad.

En los humanos, en el grupo control 28%, 38% y 33% de las células se clasificaron como paquiteno inicial, medio y tardío respectivamente. Para el grupo de los pacientes los resultados obtenidos fueron de 44%, 33% y 23%. Estos resultados no suponen una diferencia significativa.

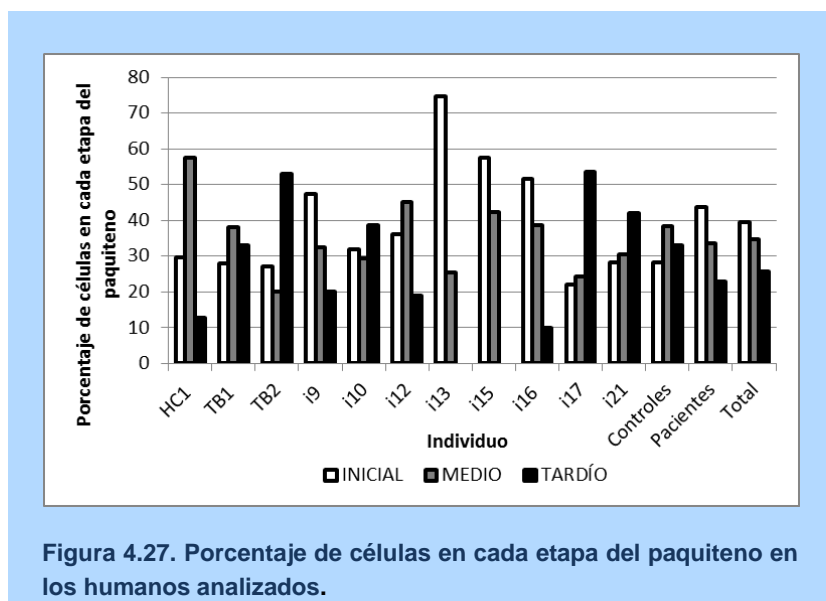


Figura 4.27. Porcentaje de células en cada etapa del paquiteno en los humanos analizados.

Tanto en el grupo control como el grupo de los pacientes se observaron diferencias interindividuales ([Figura 4.27](#)). El rango de células en paquiteno inicial fue de 27% a 30% en el grupo control y de 22% a 58% en el grupo de los infértiles. El de los paquitenos medios de 20% a 57% y de 24% a 45%, y el de los tardíos de 13% a 53% y de 0% a 54% respectivamente.

Por lo que respecta a los gatos, los núcleos se clasificaron como paquiteno inicial, medio, tardío y separación ([Apartado 4.4.1](#)). Se observaron diferencias significativas

entre los individuos. Así por ejemplo sólo 10 de los 21 individuos analizados presentaban espermatoцитos en el último subestadio del paquiteno, el que hemos denominado “separación”.

Dentro del grupo de 10 individuos con espermatoцитos en subestadio de “separación”, el porcentaje de células en este subestadio fue también muy variable. En este aspecto cabe destacar especialmente el individuo FC5, en el cual aproximadamente un 85% de las células se encontraban en este subestadio. La presencia de células en el subestadio inicial del paquiteno fue inferior al 20% en la mayoría de individuos (n=17), en tres de ellos se situó entre el 20% y el 40% y en el individuo FC10 fue superior al 80% (Figura 4.28).

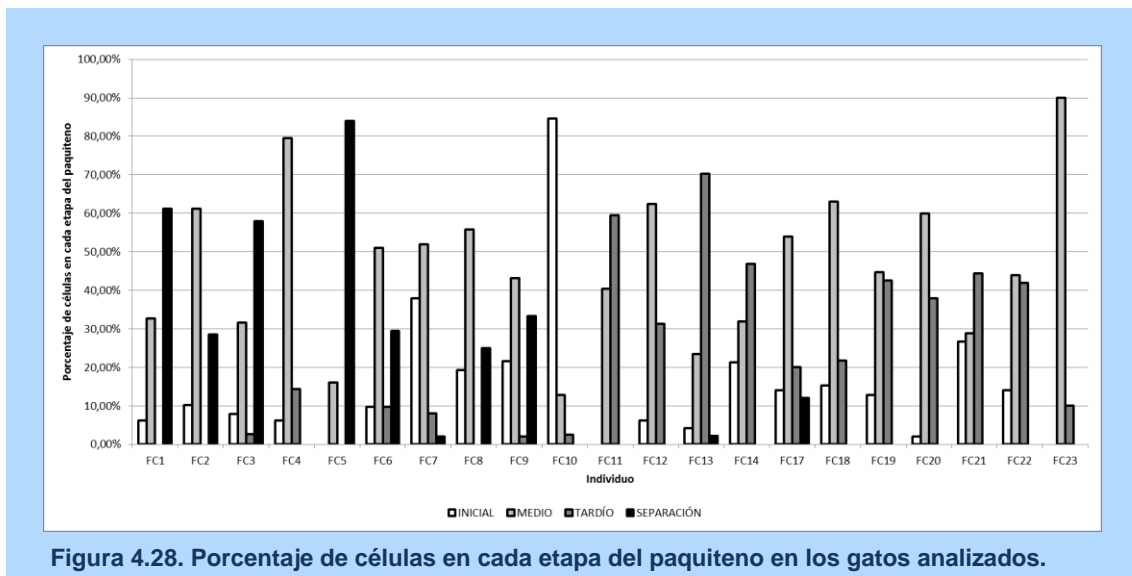


Figura 4.28. Porcentaje de células en cada etapa del paquiteno en los gatos analizados.

#### 4.4.3. MLH1 en el cuerpo sexual

Para las tres especies analizadas (humanos, gatos y perros) se determinó la **media de núcleos en paquiteno con un foco de recombinación en el cuerpo sexual** y la **relación del número medio de focos de MLH1 por núcleo con la presencia o ausencia de foco de MLH1 en el cuerpo sexual**. En humanos y gatos se determinó también el comportamiento de este valor durante los diferentes subestadios del paquiteno. Finalmente, en humanos, el primer valor se utilizó para establecer si existe una asociación de este parámetro con infertilidad.

La media de células en paquiteno con un foco de recombinación en el cuerpo sexual en individuos control fue de 74,2%, en los pacientes OA de 82,4% y en los pacientes NOA

de 72,5%, sin observarse una diferencia significativa entre los grupos. La media de todos los individuos fue de 78,4% ([Tabla 4.17](#)).

**Tabla 4.17. Análisis de la presencia de un foco de MLH1 en el cuerpo sexual en los individuos de este estudio.**

Individuo	MLH1 en XY (%)	MLH1/célula
HC1	56,8	51,83
TB1	85,3	51,58
TB2	80,6	51,75
<b>Media en controles</b>	<b>74,2</b>	<b>51,7</b>
i10	90,5	51,80
i13	76,9	50,03
i15	86,3	49,30
i16	82,2	53,26
i17	86,5	55,58
i21	72,0	52,65
<b>Media en OA</b>	<b>82,4</b>	<b>52,1</b>
i9	70,5	46,00
i12	74,4	51,33
<b>Media en NOA</b>	<b>72,5</b>	<b>48,7</b>
<b>Media</b>	<b>78,4</b>	<b>51,4</b>

La media de células en paquiteno con un foco de recombinación en el cuerpo sexual de los gatos fue de 75,61% observándose una variabilidad interindividual que fue desde 54,8% (individuo FC5) hasta 100,0% (individuo FC12). En los perros se observó un foco de MLH1 en un 76,56% de los cuerpos sexuales. La variabilidad interindividual se situó entre 62,50% y 88,0% ([Tabla 4.18](#)).

**Tabla 4.18. Análisis de la presencia de un foco de MLH1 en el cuerpo sexual en gatos y perros**

Individuo	MLH1 en XY (%)	MLH1/célula
FC1	72,5	47,8
FC2	64,0	46,76
FC3	55,3	48,58
FC4	64,0	44,08
FC5	54,8	48,90
FC6	75,0	51,50
FC7	77,1	49,20
FC8	78,9	46,79
FC9	82,9	52,46
FC10	92,3	50,92
FC11	60,9	52,22
FC12	100,0	43,15
FC13	92,6	47,41
FC14	92,9	52,11
FC17	89,3	52,11
FC18	82,8	48,93
FC19	73,3	47,90
FC20	59,3	47,89
FC21	56,0	47,44
FC22	75,8	52,76
FC23	88,2	49,15
<b>Media FC</b>	<b>75,61</b>	<b>48,96</b>
CF1	62,5	40,55
CF9	67,5	39,88
CF10	88,0	39,72
CF11	88,0	40,52
CF12	69,2	40,53
CF13	80,0	39,90
<b>Media CF</b>	<b>75,9</b>	<b>40,18</b>

Para el análisis de correlación entre el número de espermatoцитos con un foco de MLH1 en el cuerpo sexual y la tasa de recombinación general del individuo los resultados no mostraron relación directa entre ambos factores en ninguna de las tres especies (humanos  $R = 0,253$ ,  $p=0,304$ ; gatos  $R = 0,105$ ,  $p=0,635$ ; perros  $R = 0,346$ ,  $p=0,714$ ) (Figura 4.28).

## Resultados

Por lo que respecta al comportamiento de este valor durante los diferentes subestadios del paquiteno, en humanos la frecuencia con la que se detectó un foco de MLH1 en el cuerpo sexual se mantuvo relativamente constante a lo largo de esta fase de la meiosis y no se observó una diferencia significativa entre los subestadios ( $p > 0,01$ ). En gatos, sin embargo, dicha frecuencia disminuyó significativamente a medida que avanzaba el estadio de paquiteno. Dicha diferencia fue significativa para los subestadios inicial ( $p < 0,001$ ) y medio ( $p = 0,006$ ), pero no para el subestadio tardío ( $p = 0,444$ ) (Tabla 4.19).

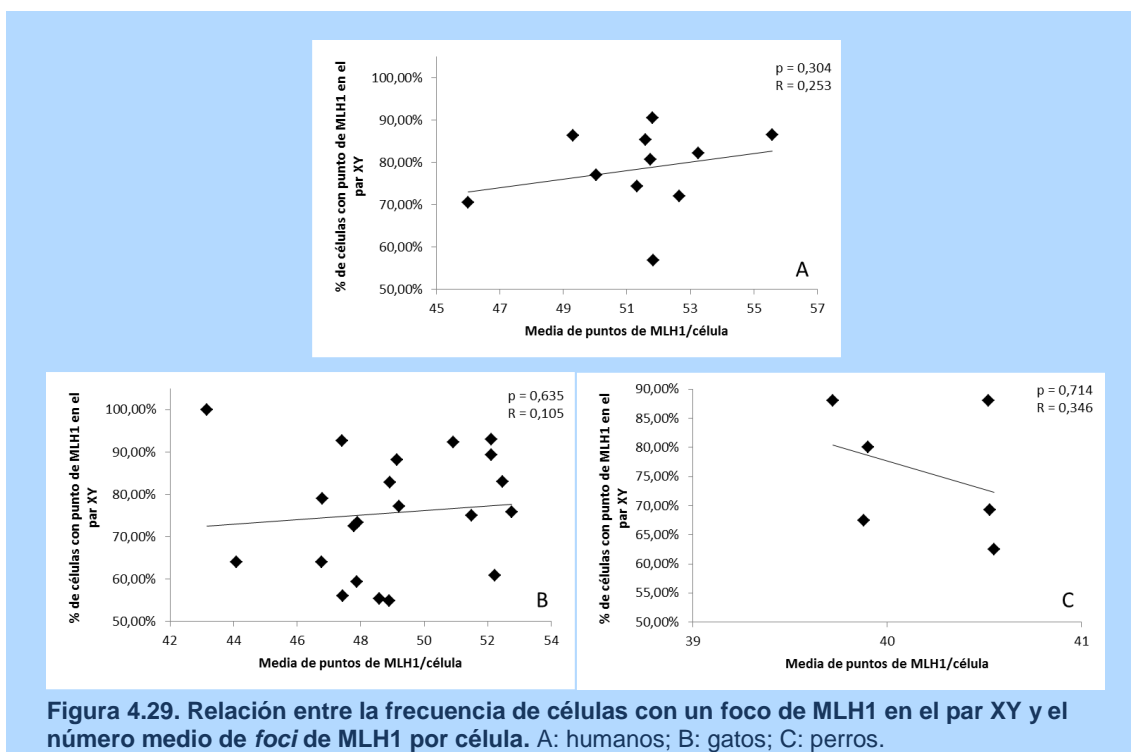


Tabla 4.19. Análisis de la presencia de un foco de MLH1 en el cuerpo sexual en los subestadios del paquiteno en humanos y gatos.

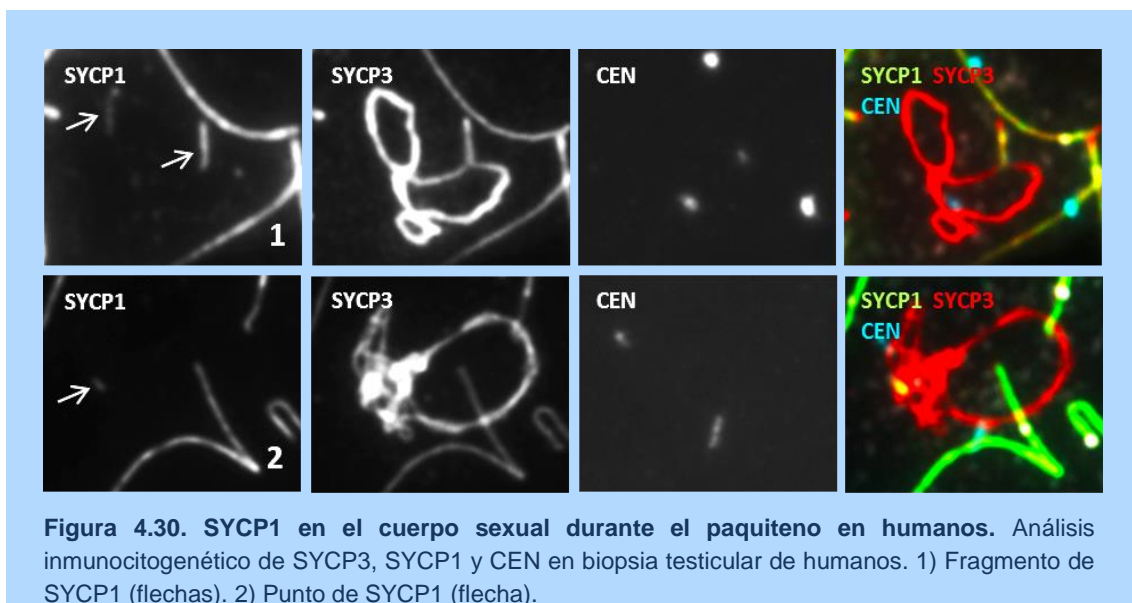
Subestadio	Humanos		Gatos	
	N	MLH1 en XY (%)	N	MLH1 en XY (%)
Inicial	191	81	85	85
Medio	185	77	235	79
Tardío	140	78	190	70
Separación			125	66
<b>Total</b>	<b>516</b>	<b>78</b>	<b>635</b>	<b>74</b>

#### 4.4.4. SYCP1 en el cuerpo sexual durante el paquiteno

La presencia de SYCP1 se analizó mediante tres aproximaciones diferentes. En el **primer análisis** se clasificaron los meiocitos en paquiteno en tres grupos según la presencia de la proteína SYCP1 en el cuerpo sexual, en humanos y en gatos. El análisis realizado en perros fue diferente, puesto que la morfología siempre lineal del cuerpo sexual en perros no permitió distinguir entre diferentes subestadios de paquiteno.

En humanos y gatos, se analizaron las células en base a los criterios descritos a continuación en relación con su avance a lo largo del paquiteno (inicial, medio y tardío). Los criterios establecidos pueden interpretarse como un indicativo de la cantidad de SYCP1, siendo mayor en el primer grupo (grupo F), menor en el segundo (grupo P) y nula en el tercero (grupo 'Sin') (**Figuras 4.30 y 4.31**):

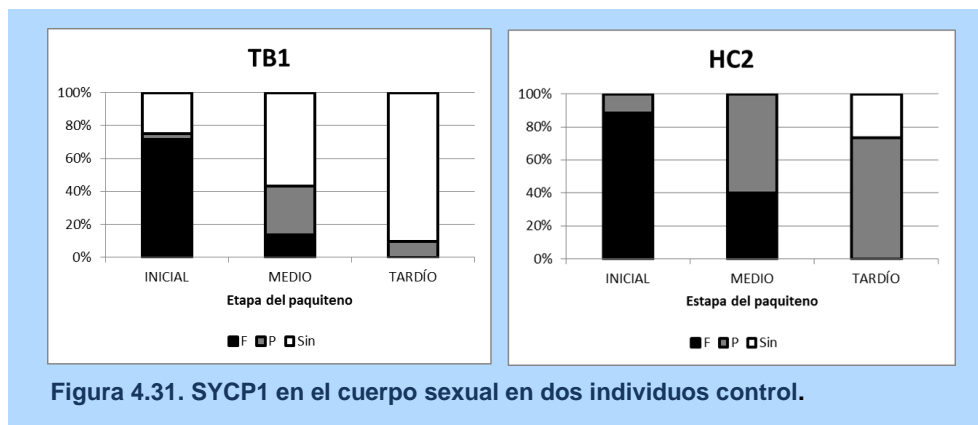
- Grupo F: aquellos meiocitos en paquiteno que presentaban al menos un fragmento de SYCP1 y en algunos casos adicionalmente al menos un punto de SYCP1 en el cuerpo sexual. (Mayor cantidad de SYCP1).
- Grupo P: aquellos meiocitos en paquiteno que presentaban al menos un punto de SYCP1 en el cuerpo sexual, aunque ningún fragmento de dicha proteína. (Menor cantidad de SYCP1).
- Grupo 'Sin': aquellos meiocitos que no presentaban SYCP1 en el cuerpo sexual. (Ausencia total de SYCP1).



**Figura 4.30. SYCP1 en el cuerpo sexual durante el paquiteno en humanos.** Análisis inmunocitogenético de SYCP3, SYCP1 y CEN en biopsia testicular de humanos. 1) Fragmento de SYCP1 (flechas). 2) Punto de SYCP1 (flecha).

## Resultados

En humanos se analizaron dos individuos control, TB1 y HC2. Se observó que el 75% de los meiocitos en paquiteno inicial del individuo TB1 y el 100% del individuo HC2 presentaban señal de SYCP1 en el cuerpo sexual (**Figura 4.31**). Este porcentaje fue inferior en los núcleos en subestadio de paquiteno medio del individuo TB1 (44%). En el individuo HC2, el 100% de los cuerpos sexuales en este estadio presentaron aún señal de SYCP1, si bien la cantidad de SYCP1 era menor, puesto que disminuyó el porcentaje de meiocitos en el grupo F y aumentó en el grupo P. En los meiocitos en paquiteno tardío la presencia de SYCP1 en el cuerpo sexual fue inferior al 10% en TB1 y al 75% en HC2. En este estadio la presencia de SYCP1 sólo se observó en forma de puntos (grupo P).

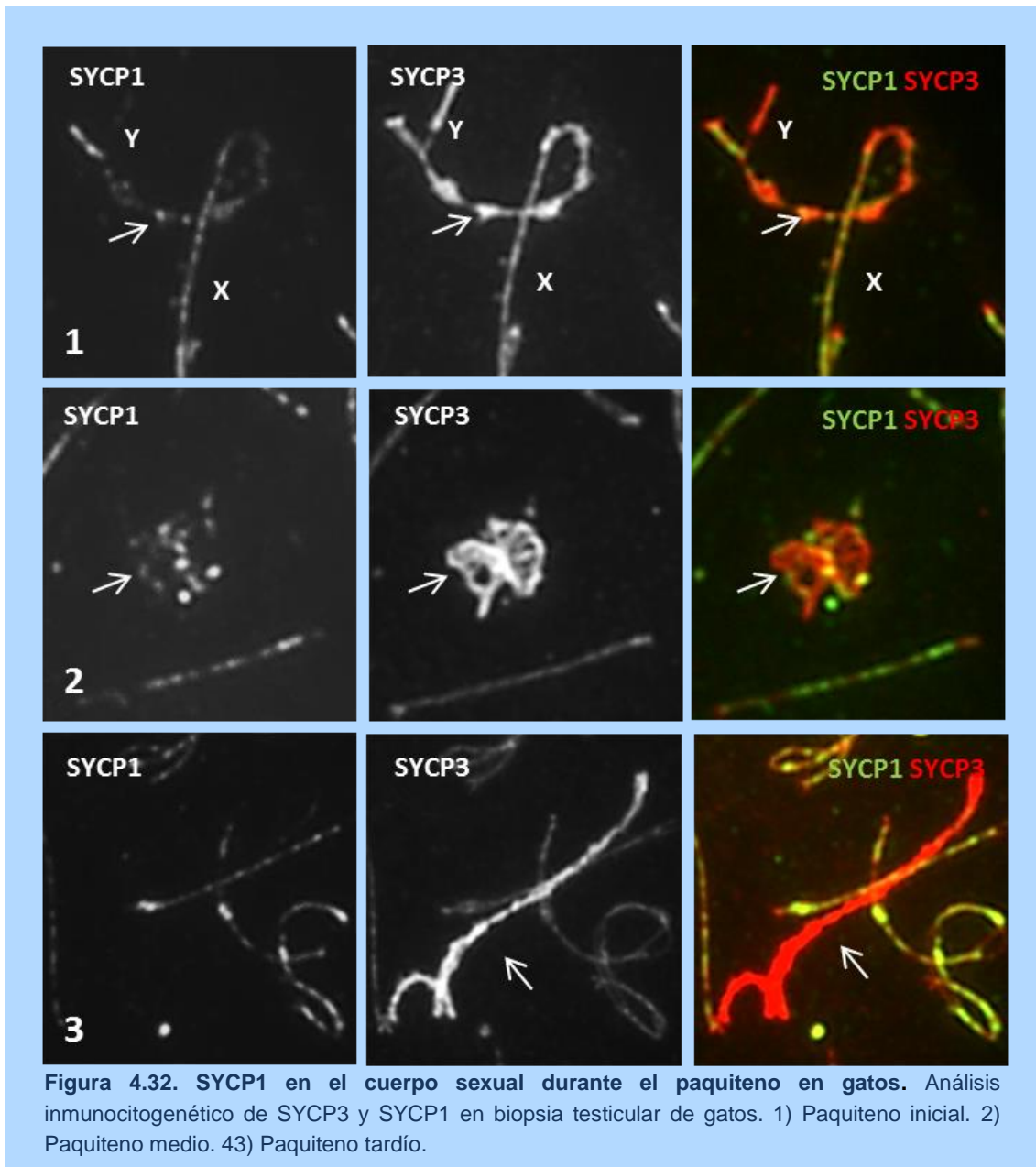


**Figura 4.31. SYCP1 en el cuerpo sexual en dos individuos control.**

En gatos se analizaron 38 células en diferentes subestadios de paquiteno en un individuo. Los resultados de este análisis indicaron que al inicio de paquiteno, la proteína SYCP1 se hallaba en casi todo el cuerpo sexual, a excepción del elemento lateral de la región no homóloga del cromosoma Y (**Figura 4.32**, 1).

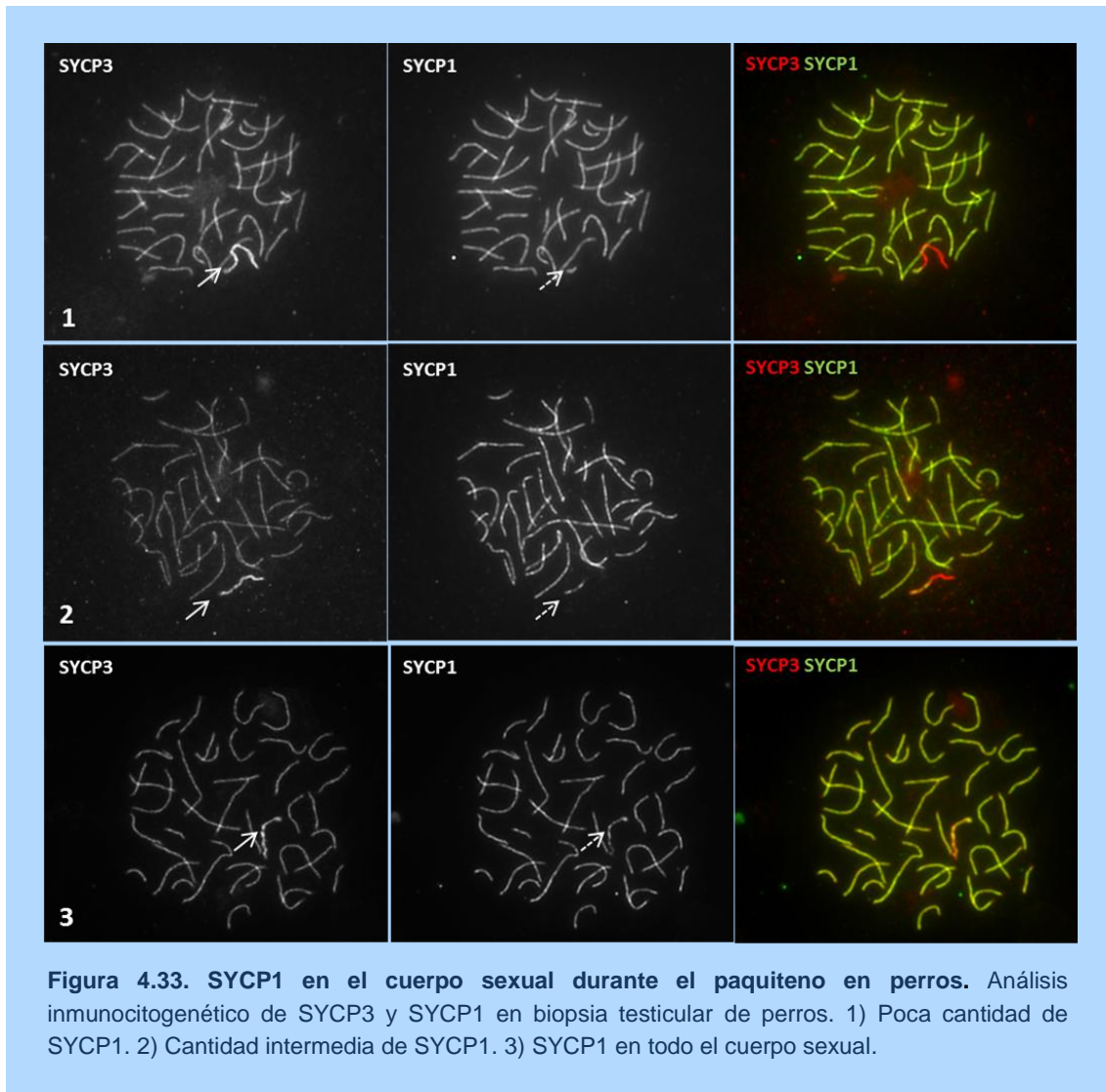
Ya en el paquiteno medio, la presencia de SYCP1 fue mucho menor, observándose una distribución puntual e irregular de la señal (**Figura 4.32**, 2). En el paquiteno tardío no se observó presencia de SYCP1 en el cuerpo sexual (**Figura 4.32**, 3).





Tal y como se ha comentado anteriormente, el análisis realizado en perros difirió ligeramente del realizado en gatos y humanos. Para investigar en detalle la presencia de la proteína SYCP1 en el cuerpo sexual en perros, se analizaron núcleos ( $n=24$ ) en paquíteno en tres individuos. Aunque la morfología lineal constante del cuerpo sexual no permitió distinguir entre diferentes subestadios de paquíteno, esta misma linealidad posibilitó la medición de la longitud del fragmento SYCP1 del par XY / cuerpo sexual (longitud del fragmento o fragmentos de SYCP1 / longitud del fragmento de SYCP3) en todas las células en paquíteno. El resultado se expresó en porcentaje aproximado. El valor inferior observado fue del 10% (en tres de los núcleos analizados), es decir no se encontró ningún cuerpo sexual en el que no hubiera SYCP1, y el valor máximo fue del

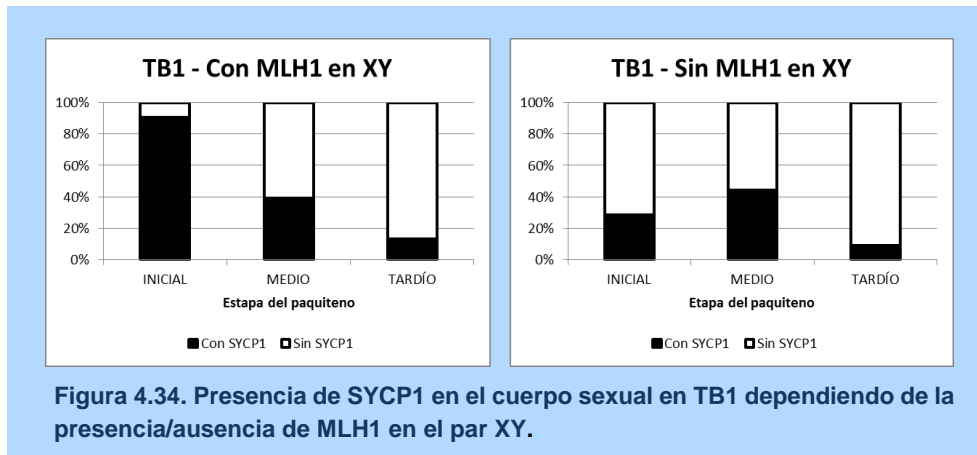
100% (en dos de los núcleos analizados) (**Figura 4.33**, 3). En el resto de núcleos se encontraron valores intermedios entre estos dos extremos (**Figura 4.33**, 1 y 2).



**Figura 4.33. SYCP1 en el cuerpo sexual durante el paquiteno en perros.** Análisis inmunocitogenético de SYCP3 y SYCP1 en biopsia testicular de perros. 1) Poca cantidad de SYCP1. 2) Cantidad intermedia de SYCP1. 3) SYCP1 en todo el cuerpo sexual.

La segunda y tercera aproximación del análisis de SYCP1 en el cuerpo sexual se realizó únicamente en humanos. Para el segundo análisis, se comparó la presencia de señal de SYCP1 en la muestras del individuo TB1 en relación con la presencia o no de un foco de MLH1 en el par XY. Se establecieron dos grupos.

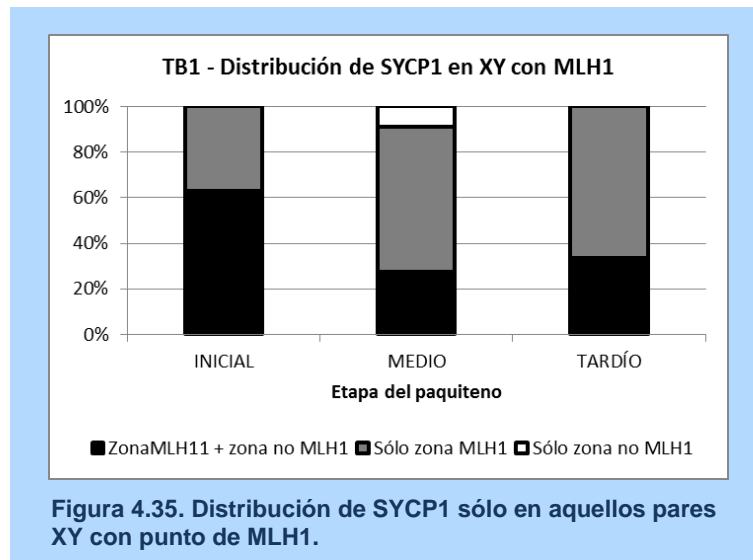
- Grupo 'Con': aquellos que presentaban señal de SYCP1 (bien punto o fragmento)
- Grupo 'Sin': aquellos que no presentaban señal de SYCP1.



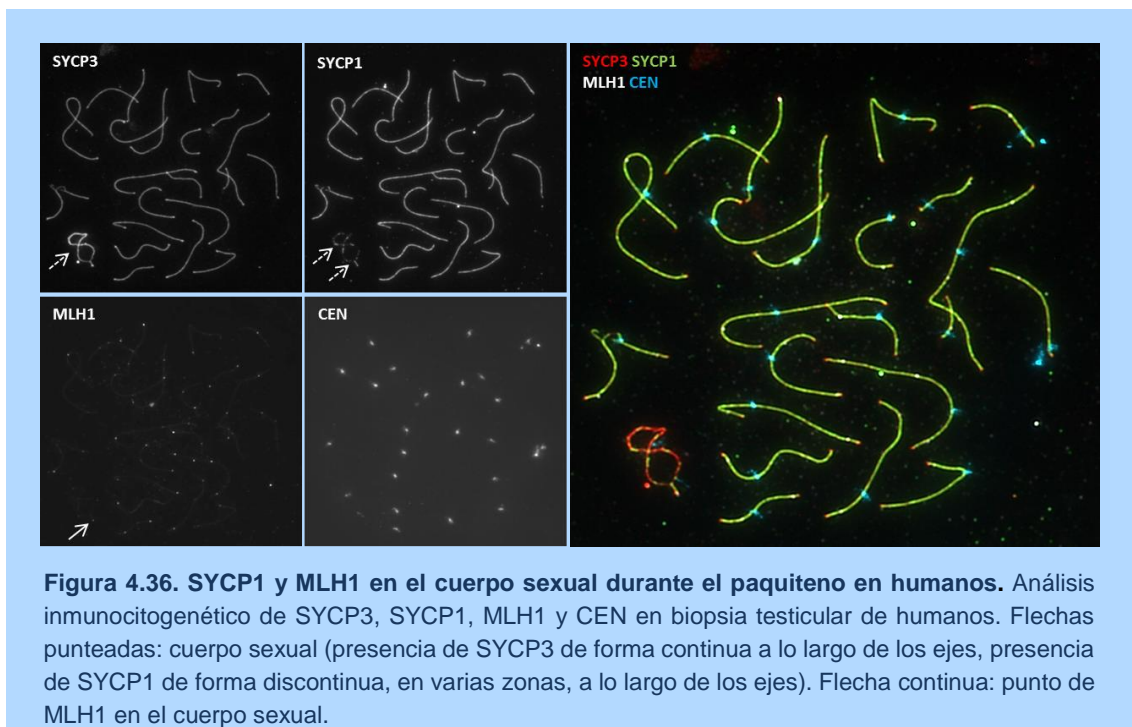
Se observó que en los meiocitos en paquiteno inicial con un foco de MLH1 más de un 90% presentan una señal de SYCP1, mientras que en aquellos sin foco de MLH1 dicha señal se observa sólo en menos de un 30% de las células (Figura 4.34). En los subestadios posteriores la presencia de una señal de SYCP1 es similar en las células sin y con foco de MLH1 en el cuerpo sexual (Figura 4.34).

En el **tercer análisis** realizado sobre las muestras del individuo TB1, para aquellos meiocitos con un foco de MLH1 y presencia de SYCP1 en el cuerpo sexual, se establecieron tres grupos. Se clasificaron los núcleos según su avance a lo largo del paquiteno (inicial, medio y tardío) y en base a:

- Grupo 'Zona MLH1 + zona no MLH1': aquellos meiocitos en paquiteno que presentaban señal de SYCP1 (bien punto o fragmento) tanto en la zona en la cual se halla el punto de MLH1 como en otras zonas en el cuerpo sexual (Figuras 4.35 y 4.36).
- Grupo 'Sólo zona MLH1': aquellos meiocitos en paquiteno que presentaban señal de SYCP1 (bien punto o fragmento) sólo en la zona en la cual se halla el punto de MLH1 en el cuerpo sexual (Figura 4.35).
- Grupo 'Sólo zona no MLH1': aquellos meiocitos en paquiteno que presentaban señal de SYCP1 (bien punto o fragmento) sólo fuera de la zona en la cual se halla el punto de MLH1 en el cuerpo sexual (Figura 4.35).



Como se puede observar en la **Figura 4.35**, la proteína SYCP1 colocaliza con MLH1 en la mayoría de los meiocitos, con la excepción de un 9% de los que se encuentran en el subestadio medio. Además, esta proteína también se halla en regiones que no colocalizan con MLH1 en porcentaje variable según los subestadios: 63% en paquiteno temprano, 28% en paquiteno medio y 33% en paquiteno tardío.



## 4.5. GENÉTICA

### 4.5.1. PRDM9

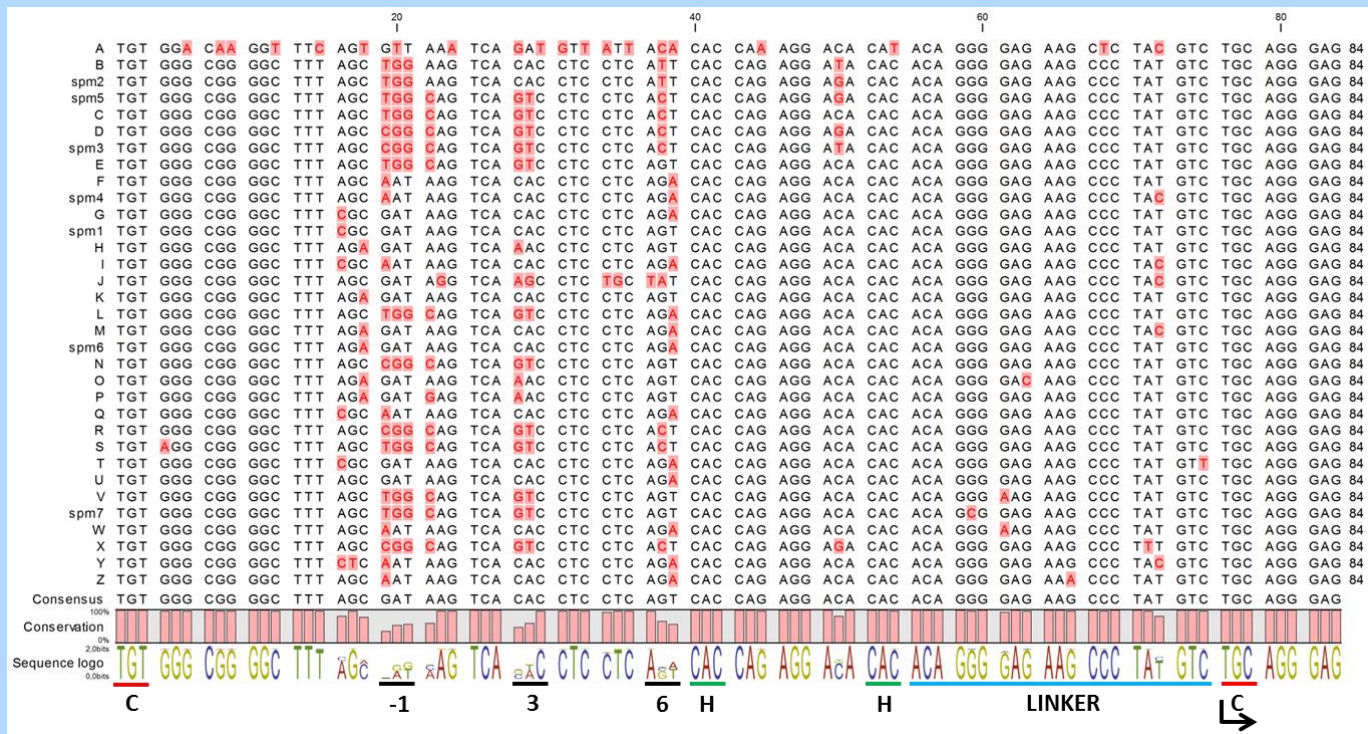
#### Humanos

##### Identificación de variantes en todos los individuos analizados

La región ZFCRT del gen *PRDM9* fue secuenciada en un total de 342 individuos (todos los del presente estudio). Los resultados obtenidos de la secuenciación se alinearon y compararon con las variantes alélicas descritas en la literatura <sup>29,101-104</sup>, confirmando e incrementando la extrema diversidad tanto de ZFCRT como de alelos de PRDM9. Las nuevas variantes alélicas encontradas en los individuos estudiados respondían a una de las dos situaciones siguientes:

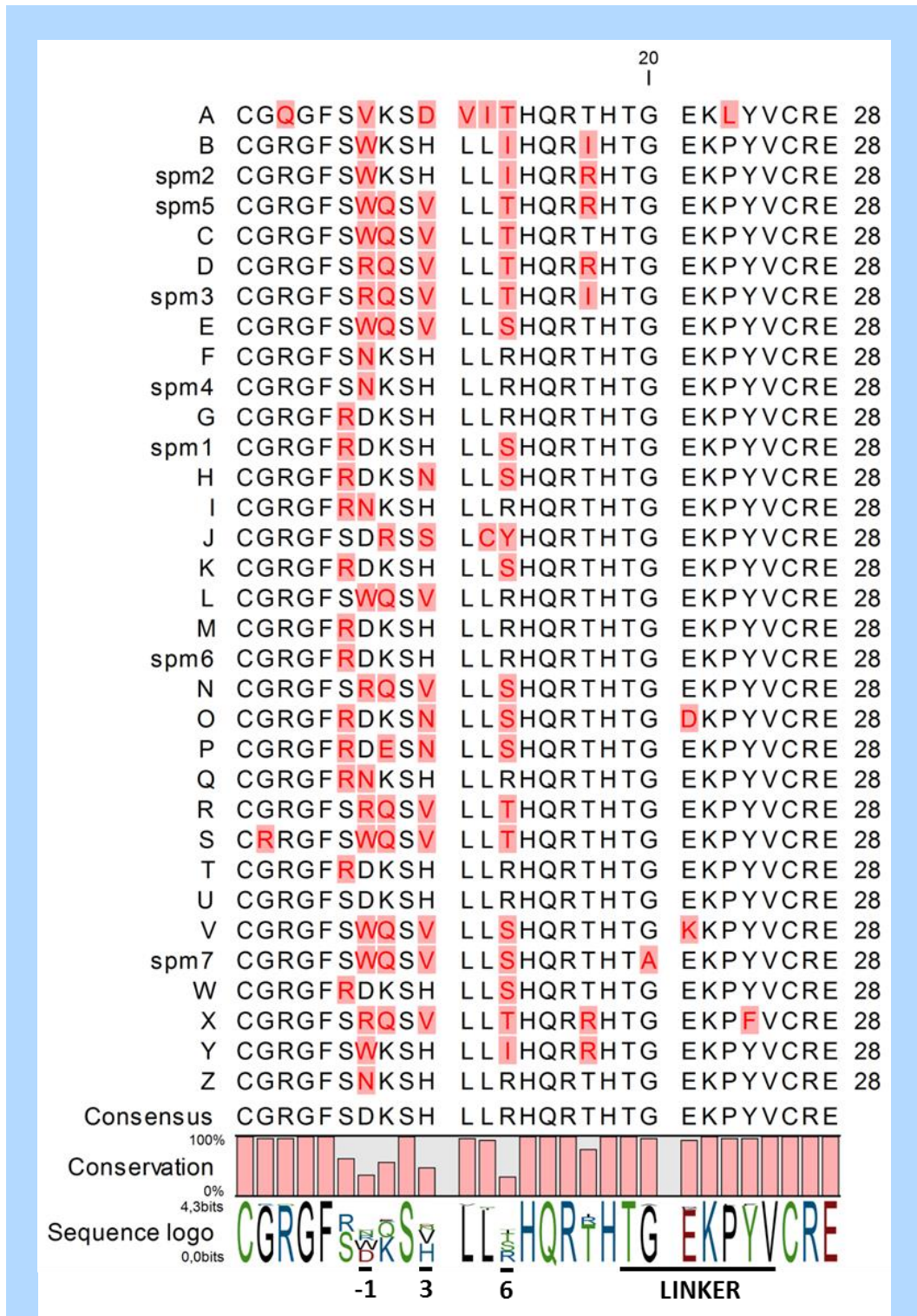
- 1) Alelos que contenían ZFCRT ya descritos aunque dispuestos en un orden diferente, no descrito hasta el momento.
- 2) Alelos que contenían nuevos ZFCRT no descritos anteriormente en la literatura. Las variantes se han designado según la nomenclatura establecida en los artículos más recientes de PRDM9.





**Figura 4.37. Secuencia de los ZFCRT de *PRDM9* descritos hasta la fecha.** ZFCRT A-V (4), ZFCRT W-Z (9) y ZFCRT spm1-7 (este estudio). Nota: los ZFCRT U and V descritos en Berg y col.<sup>102</sup> no se corresponden con los ZFCRT U y V descritos más tarde en 2013<sup>104</sup>. Por ello hemos renombrado estos cuatro ZFCRT empezando con la letra W. Nucleótidos: Todos los nuevos ZFCRT tenían una variante al compararlos con secuencias ya publicadas, excepto spm7 que tenía dos variantes (respecto a V).

Subrayado con: línea roja – codones para la primera (marcada con una flecha) y segunda cisteína del dominio dedo de zinc; línea verde – codones para la primera y segunda histidina del dominio dedo de zinc; línea negra – codones para los aminoácidos responsables para la unión a la secuencia específica de ADN; línea azul – nucleótidos que codifican los aminoácidos de la región linker. La secuencia logo muestra las frecuencias de los residuos en cada posición en este alineamiento (presentadas como la altura relativa de las letras).



**Figura 4.38. Secuencia de aminoácidos de los ZFCRT de PRDM9.** En el caso de spm1 tiene una variante comparado con G. No obstante su secuencia de aminoácidos es idéntica a K, del cual no obstante difiere en 2 nucleótidos. Las variantes en spm1 (s en<sup>254</sup>), spm4 (d en<sup>254</sup>) y spm 6 (g en<sup>254</sup>) son sinónimas. Las variantes en spm2, spm3 (j en<sup>254</sup>) y spm5 (b en<sup>254</sup>) son no sinónimas, llevando a un cambio de aminoácido, Ile, Arg y Thr respectivamente, en la posición anterior a la segunda histidina del dominio dedo de zinc, donde la mayoría de ZFCRT tiene una Thr. Cambios en esta posición también se encuentran en otros ZFCRT: B (Ile), D (Arg) y X (Arg). Las dos variantes en spm7 son no sinónimas (respecto a V) y se hallan en la región linker.

## Resultados

Tabla 4.20. Alelos *PRDM9*

Alelo	Repeats	Estructura	Alelo	Repeats	Estructura
A	13	ABCDDECFGHFIJ	L23	13	ABCDDECFHFQJ
B	13	ABCDDCCFGHFIJ	L24	13	ABCDDECFTPFQJ
C	14	ABCDDCCFKHLHIJ	L25	13	ABCDDECFUHFJI
D	14	ABCDDECFKGHFIJ	L26	13	ABCDDECFGHFQJ
E	8	ABCDHFIJ	L27	13	ABCDDVCFGHFIJ
F	11	ABCDDECCFMJ	L28	13	ABCDGHFIGHFIJ
H	13	ABCDnC?GGH??J	L29	15	ABCDECDCCFGHFIJ
I	16	ABCCDCCFKLHHHIJ	L30	14	ABCDDHCFKHLHIJ
K	16	ABCDDMMHH?GH??J	L31	10	ABECFGHFIJ
L1	9	ABCDGHFIJ	L32	13	ABCXDECFGHFIJ
L2	12	ABCDDCFGHFIJ	L33	14	ABCDDDECFGHFIJ
L3	12	ABCDECFGHFIJ	L34	13	ABCDDECFGHFYJ
L4	18	ABCDDCCDDCFKHLHIJ	L35	13	ABCDDECZGHFIJ
L5	10	ABCDDECFIJ	L36	13	ABRDDECFGHFIJ
L6	15	ABCDDCCCFKHLOIJ	L37	13	ABCDDECFGHFQJ
L7	12	ABCDDCCFGHFJ	L38	13	ABCDDECWGHFQJ
L8	15	ABCDDECCFKHLHIJ	<b>L39</b>	<b>9</b>	<b>ABCFGHFIJ</b>
L9	13	ABCDDECFGPFQJ	<b>L40</b>	<b>10</b>	<b>ABCDDECFQJ</b>
L10	12	ACDDECFGHFIJ	<b>L41</b>	<b>15</b>	<b>ABCDspm3DDECFGHFIJ</b>
L11	12	ABCDDECFGHIJ	<b>L42</b>	<b>13</b>	<b>ABCDDECFGspm1FIJ</b>
L12	13	ABCDDCCCFGHFJ	<b>L43</b>	<b>14</b>	<b>ABCDDECFGHFIJ</b>
L13	13	ABCDDECFGHQIJ	<b>L44</b>	<b>12</b>	<b>ABCDDECFGHFI</b>
L14	14	ABCDDCCFKHLOIJ	<b>L45</b>	<b>13</b>	<b>Aspm2CDDECZGHFIJ</b>
L15	13	ABCDDCCFKHLHI	<b>L46</b>	<b>13</b>	<b>ABCDDECspm4CHFIJ</b>
L16	13	ABCDRCFKHLHIJ	<b>L47</b>	<b>14</b>	<b>ABCDDCCFKHLspm6IJ</b>
L17	15	ABCDDKCCFKHLHIJ	<b>L48</b>	<b>13</b>	<b>ABCDDspm7CFGHFIJ</b>
L18	13	ABDDSCFKHLOIJ	<b>L49</b>	<b>14</b>	<b>ABCDDECFGHFQHJ</b>
L19	15	ABCDDCCFKHLHQIJ	<b>L50</b>	<b>17</b>	<b>ABCDDECDDECFGHFIJ</b>
L20	13	ABCDDECFGKFQJ	<b>L51</b>	<b>16</b>	<b>ABCDDECFKGKGHFIJ</b>
L21	14	ABCDDEECFGHFIJ	<b>L52</b>	<b>12</b>	<b>ABspm5DECFGHFIJ</b>
L22	14	ABCDDECFGHFIJ			

En negrita: nuevas variantes alélicas encontradas en los individuos del presente estudio

En el presente estudio se identificaron 13 nuevos alelos de *PRDM9* y 7 nuevos ZFCRT (Figura 4.37 secuencia de nucleótidos y Figura 4.38 secuencia de aminoácidos).



### Variantes de *PRDM9* en la población control y en padres transmisores de microdeleciones de *nov*

En nuestra población de estudio de padres transmisores de microdeleciones de *nov*, el alelo A se observó en un 87,5% de los cromosomas, el alelo B en un 6,3%, y los alelos L15 y L46 en un 3,1% respectivamente. No se observaron diferencias significativas ni nuevos alelos en esta población con respecto a la población control (**Tabla 4.21**).

### Variantes de *PRDM9* en la población control y en individuos infértiles

En nuestra población de estudio de individuos infértiles, el alelo A se observó en un 76,2% de los cromosomas, los alelos L1, L9 y L24 en un 4,8% respectivamente y los alelos L20, L26, C y E en un 2,4% respectivamente. No se observaron diferencias significativas ni nuevos alelos en esta población con respecto a la población control (**Tabla 4.21**).

### Análisis poblacional de *PRDM9*

Las frecuencias génicas de los distintos alelos descritos fueron calculadas para las poblaciones autóctonas de las islas de Mallorca, Menorca e Ibiza. Se calculó también para la población residente en Mallorca y para el total de los individuos autóctonos de las Islas Baleares (**Tabla 4.22**). En la población autóctona balear el alelo más común, A, se observó con una frecuencia alélica del 73,47% mientras que 22 alelos menos comunes supusieron una frecuencia conjunta del 27,67%. En el caso de la población residente en Mallorca se observaron 5 alelos nuevos (L42, L43, L44, L49 y L41).

La diversidad genética (heterozigosidad esperada) osciló entre 0,3829 (Menorca) y 0,4972 (Ibiza), con un valor medio (0,4526) para la población total de Baleares. En el análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg no se obtuvieron desviaciones significativas para ninguna de las poblaciones analizadas, una vez aplicada la corrección de Bonferroni. Las distancias genéticas ( $F_{ST}$ ) entre pares de poblaciones, no mostraron diferencias significativas entre las tres islas baleares, debido en gran parte a la clara predominancia del alelo A en todas ellas. Tampoco se observaron diferencias en las comparaciones basadas en el test exacto de Fischer.

Tabla 4.21. Frecuencia alélicas de *PRDM9* en la población control y poblaciones de estudio

Alelo	Control	Padres transmisores de microdeleciones de <i>novo</i>	Individuos infértiles
<b>N</b>	<b>103</b>	<b>22</b>	<b>21</b>
A	72,3	87,5	76,2
L24	5,3		4,8
L20	3,4		2,4
B	2,9	6,3	
L26	2,9		2,4
L19	2,4		
D	1,9		
L32	1,5		
C	1,5		
L9	1,0		4,8
L39	1,0		
L1	0,5		4,8
E	0,5		2,4
L15		3,1	
L40	0,5		
L41	0,5		
L42	0,5		
L43	0,5		
L44	0,5		
L45	0,5		
L46		3,1	

N: número de individuos

Tabla 4.22. Frecuencias alélicas de *PRDM9* en las poblaciones estudiadas

Alelo	Mallorca (autóctonos)	Mallorca (residentes)	Menorca	Ibiza	Baleares
<b>N</b>	<b>56</b>	<b>116</b>	<b>71</b>	<b>69</b>	<b>196</b>
A	0,7168	0,7069	0,7832	0,7029	0,7347
B	0,0443	0,0302	0,0210		0,0200
C	0,0354	0,0172	0,0350	0,0435	0,0380
D	0,0089	0,0216			0,0026
E		0,0043	0,0070	0,0073	0,0051
L1		0,0043		0,0073	0,0026
L11				0,0145	0,0051
L19	0,0177	0,0259	0,0140	0,0290	0,0200
L20	0,0266	0,0302		0,0073	0,0100
L24	0,0354	0,0603	0,0140	0,0870	0,0459
L26	0,0443	0,0216	0,0490	0,0217	0,0383
L39	0,0177	0,0216	0,0140		0,0010
L6	0,0177				0,0051
L8	0,0089				0,0026
L9	0,0177	0,0172	0,0280	0,0145	0,0200
L42		0,0043			
L46		0,0129		0,0073	0,0026
L43		0,0043			
L44		0,0043			
L40	0,0089	0,0043			0,0026
L45		0,0043			
L41		0,0043			
L50				0,0073	0,0026
L51				0,0145	0,0051
L52				0,0145	0,0051
L49				0,0217	0,0077
L47			0,0280		0,0102
L48			0,0070		0,0026

N: número de individuos

### Relación de las variantes de *PRDM9* con la tasa de recombinación

Varios autores han descrito la existencia de una relación entre el genotipo de *PRDM9* y la tasa de recombinación, tanto en ratones<sup>81,82,255</sup> como en humanos<sup>101,102,110,256,257</sup>.

En el presente estudio, al no observarse diferencias significativas en la tasa de recombinación entre pacientes y controles se estudió el conjunto de la población para analizar la relación entre *PRDM9* y frecuencia de recombinación homóloga. Para ello se agruparon a los individuos según tipo y longitud de sus alelos de *PRDM9*, resultando un total de tres genotipos diferentes. Debido a la predominancia de los alelos A y tipo-A (L24/L26) en la población, éste fue el grupo más representado (con 8 individuos), mientras que los otros dos grupos estaban formados por un único individuo.

Al comparar la tasa de recombinación (número medio de *foci* de MLH1 por núcleo) con los tres genotipos se observó una asociación significativa de la longitud del alelo de *PRDM9* y la tasa de recombinación ( $p < 0,001$ ) (contrastes de los efectos del modelo). Al comparar los grupos entre ellos se continuó observando una diferencia significativa entre todos ellos (comparaciones por pares, [Tabla 4.23](#)).

**Tabla 4.23. *PRDM9* y tasa de recombinación en humanos. Comparaciones por pares**

Genotipo	Comp. G	R (p)
A/A	A/C	0,000*
	A/E	0,000*
A/C	A/A	0,000*
	A/E	.
A/E	A/A	0,000*
	A/C	.

\*Resultados estadísticamente significativos. Comp. G: Comparación con genotipo; R: Tasa de recombinación

El individuo con el alelo más corto, E (9 ZFCRT) en estado de heterocigosis con A (13 ZFCRT), presentó la tasa de recombinación más baja (46,00 *foci* de MLH por núcleo de media). Dicha tasa de recombinación aumentó significativamente en los individuos homocigotos para el alelo A / tipo-A (13 ZFCRT) y volvió a aumentar significativamente en el individuo con el alelo C (14 ZFCRT) en estado de heterocigosis con A ([Tabla 4.24](#)).

Tabla 4.24. *PRDM9* y tasa de recombinación en humanos. Medias

Genotipo	I	N	R
A/A*	8	308	51,76
A/C	1	40	55,57
A/E	1	28	46,00

I: Número de individuos analizados; N: Número de núcleos analizados; R: Tasa de recombinación

## Gatos

### Identificación de variantes de *PRDM9* en gatos

Se amplificó el gen *PRDM9* en 20 individuos del presente estudio (todos excepto FC7 que no amplificó correctamente). El análisis electroforético del producto amplificado permitió observar que existen tres variantes de longitud en la población analizada, que se denominaron a, b y c. Se secuenció un homocigoto de longitud de cada una de las variantes (a/a, b/b y c/c). Los resultados obtenidos de la secuenciación se alinearon y compararon con la secuencia disponible (GenBank NC\_018737.1, 63863259-63897530).

Al analizar estas tres variantes de longitud se observó la presencia de heterocigosis en todas ellas. Es decir, en los tres individuos analizados se encontraron dos alelos con el mismo número de ZFCRT pero con diferente secuencia. Un análisis preliminar permitió definir que el número de ZFCRT era de 14, 11 y 9 para a, b y c respectivamente. La cantidad de SNPs en heterocigosis en comparación con la secuencia disponible en las bases de datos imposibilitó la determinación exacta de la secuencia de cada uno de los ZFCRT y en consecuencia de los alelos. Estos datos indican que la extrema diversidad de ZFCRT y alelos encontrada en humanos se mantiene e incluso magnifica en gatos.

### Relación de las variantes de *PRDM9* según su longitud con la tasa de recombinación

Se observó asociación estadísticamente significativa entre **tasa de recombinación** y las variantes alélicas de longitud de *PRDM9* ( $p < 0,001$ ) (contrastes de los efectos del modelo). Esta diferencia significativa se continuó observando, en la mayoría de los casos, al considerar los grupos de forma individual y compararlos entre ellos (comparaciones por pares, [Tabla 4.25](#)). La mayor tasa de recombinación se observó en

## Resultados

los heterocigotos de longitud a/b, seguidos de los homocigotos de longitud a/a, los heterocigotos de longitud b/c, los homocigotos de longitud b/b y por último los homocigotos de longitud c/c (Tabla 4.26).

**Tabla 4.25. PRDM9 y tasa de recombinación en gatos. Comparaciones por pares**

Genotipo	Comp. G	R (p)
a/a	a/b	0,000*
	b/b	0,007*
	b/c	0,024*
	c/c	0,000*
a/b	a/a	0,000*
	b/b	0,000*
	b/c	0,000*
	c/c	0,000*
b/b	a/a	0,007*
	a/b	0,000*
	b/c	0,741
	c/c	0,000*
b/c	a/a	0,024*
	a/b	0,000*
	b/b	0,741
	c/c	0,000*
c/c	a/a	0,000*
	a/b	0,000*
	b/b	0,000*
	b/c	0,000*

\*Resultados estadísticamente significativos. Comp. G: Comparación con genotipo; R: Tasa de recombinación

**Tabla 4.26. PRDM9 y tasa de recombinación en gatos. Medias.**

Genotipo	I	N	R
a/a	1	13	50,92
a/b	1	35	52,46
b/b	8	270	49,09
b/c	9	262	49,41
c/c	2	63	43,70

I: Número de individuos analizados; N: Número de núcleos analizados; R: Tasa de recombinación

## Perros

### Identificación de variantes de *PRDM9* en perros

El gen *PRDM9* se amplificó en seis perros. El análisis electroforético del producto amplificado permitió observar que todos los perros eran heterocigotos de longitud para alelos con el mismo número de ZFCR.

#### 4.5.2. *RNF212*

Diferentes autores han asociado el gen *RNF212* con el fenómeno de variación en la tasa de recombinación en humanos<sup>87,117,118</sup> y ganado<sup>119</sup>. En uno de los estudios, tres SNPs en el gen *RNF212* (rs3796619, rs1670533 y rs2045065) presentaron una asociación significativa con la frecuencia de recombinación<sup>87</sup>. La variación sobre la recombinación se halló tanto en hombres como en mujeres, aunque con efectos opuestos en ambos sexos. El SNP que presentó la asociación más fuerte con la tasa de recombinación en hombres fue rs3796619, resultando cada copia del alelo T en una disminución de la tasa de recombinación de 70,7 cM, en comparación con el alelo C. Para analizar dicha relación en nuestra población se agruparon a los individuos en tres grupos según el genotipo de *RNF212* (Tabla 4.27) y se compararon los resultados obtenidos en el estudio de recombinación homóloga.

Tabla 4.27. *RNF212* y tasa de recombinación en humanos. Medias

Genotipo	I	N	R
C/C	2	71	54,18
C/T	6	308	51,94
T/T	3	99	49,23

I: Número de individuos analizados; N: Número de núcleos analizados; R: Tasa de recombinación

Los resultados obtenidos confirmaron la asociación significativa de este SNP (rs3796619) con la **tasa de recombinación** ( $p=0,011$ ) (contrastes de los efectos del modelo). En los individuos de este estudio cada copia del alelo T, en comparación con el alelo C, resultó en una disminución media de la tasa de recombinación homóloga de 132,5 cM (de media). La diferencia significativa se continuó observando al considerar todos los grupos de forma individual y compararlos entre ellos (comparaciones por pares, Tabla 4.28).

**Tabla 4.28. *RNF212* y tasa de recombinación en humanos.** Comparaciones por pares

Genotipo	Comp. G	R
C/C	C/T	0,035*
	T/T	0,003*
C/T	C/C	0,035*
	T/T	0,039*
T/T	C/C	0,003*
	C/T	0,039*

\*Resultados estadísticamente significativos. Comp. G: Comparación con genotipo; N: Número núcleos analizados; R: Tasa de recombinación

### 4.5.3. Influencia conjunta de *PRDM9* y *RNF212*

Al analizar la influencia conjunta de *PRDM9* y *RNF212* sobre los distintos parámetros de la recombinación meiótica se observó que *PRDM9* y *RNF212* presentan efectos independientes sobre la **recombinación meiótica** (número de *foci* de MLH1) (Tabla 4.29).

**Tabla 4.29. *PRDM9* y *RNF212* y tasa de recombinación en humanos.** Estimaciones de los parámetros

Genotipo	I	N	R (p)
(Intersección)			0,000
[ <i>RNF212</i> =C/C]	2	71	0,000*
[ <i>RNF212</i> =T/C]	6	308	0,033*
[ <i>RNF212</i> =T/T]	3	99	.
[ <i>PRDM9</i> =A/A]	8	308	0,000*
[ <i>PRDM9</i> =A/C]	1	40	0,000*
[ <i>PRDM9</i> =A/E]	1	28	.

\*Resultados estadísticamente significativos. I: Número de individuos analizados; N: Número núcleos analizados; R: Tasa de recombinación

## 4.6. CASO I14

La aplicación de técnicas de inmunitogenética sobre los meiocitos del individuo i14 permitió observar un fenotipo característico, determinado por la presencia de un bloqueo meiótico en la fase de transición de zigoteno a paquiteno y de defectos sinápticos característicos. Este fenotipo fue muy similar al fenotipo descrito en otros trabajos



recogidos en la literatura<sup>237-239</sup>. De acuerdo con la presencia de bloqueo meiótico, durante el análisis inmunocitogenético tampoco se observaron espermátidas ni espermatozoides.

El grado de defectos sinápticos observados era variable y los núcleos se clasificaron en dos grupos de acuerdo al nivel de sinapsis observada:

- Tipo I: núcleos que contenían 46 elementos axiales completos, pero sin evidencia de asociación ni sinapsis entre cromosomas homólogos. Adicionalmente, se observó la presencia de la proteína  $\gamma$ H2AX y la ausencia de la proteína MLH1 (**Figura 4.39**, 1).

- Tipo II: núcleos que exhibían al menos sinapsis parcial entre cromosomas homólogos y, en algunos casos, incluso configuraciones sinápticas muy próximas a las características de la fase de paquitenio. Al igual que los núcleos clasificados como tipo I se observó la presencia de la proteína  $\gamma$ H2AX y la ausencia de la proteína MLH1. Igualmente, en ningún núcleo se observó un cuerpo sexual (**Figura 4.39**, 2).

Las claras similitudes fenotípicas que presentaba este paciente con otros pacientes descritos en la literatura sugerían la presencia de un elemento o defecto común en la meiosis de estos pacientes<sup>237-239</sup>. Ante la posibilidad de que este defecto tuviese un origen genético, se decidió realizar el análisis del exoma en el ADN de este paciente.

Los resultados de este análisis revelaron la existencia las mutaciones que se detallan a continuación:

- Una mutación no descrita previamente en el gen *TEX11*, en hemizigosis (cromosoma X, T>A 69.960.648; GRCh37.p13). Esta mutación está localizada en una región aceptora de *splicing*; el cambio se sitúa en el primer nucleótido de la secuencia conservada (AG) de la región 3' aceptora en la región 3'UTR del exón 12. Para analizar el efecto de dicha mutación sobre la expresión del gen se utilizó el programa *Human Splicing Factor* (<http://www.umd.be/HSF/>) diseñado para analizar las mutaciones intrónicas y exónicas que llevan a defectos de *splicing*. El resultado obtenido indicó que la mutación ocasionaba alteraciones en el proceso de *splicing*.

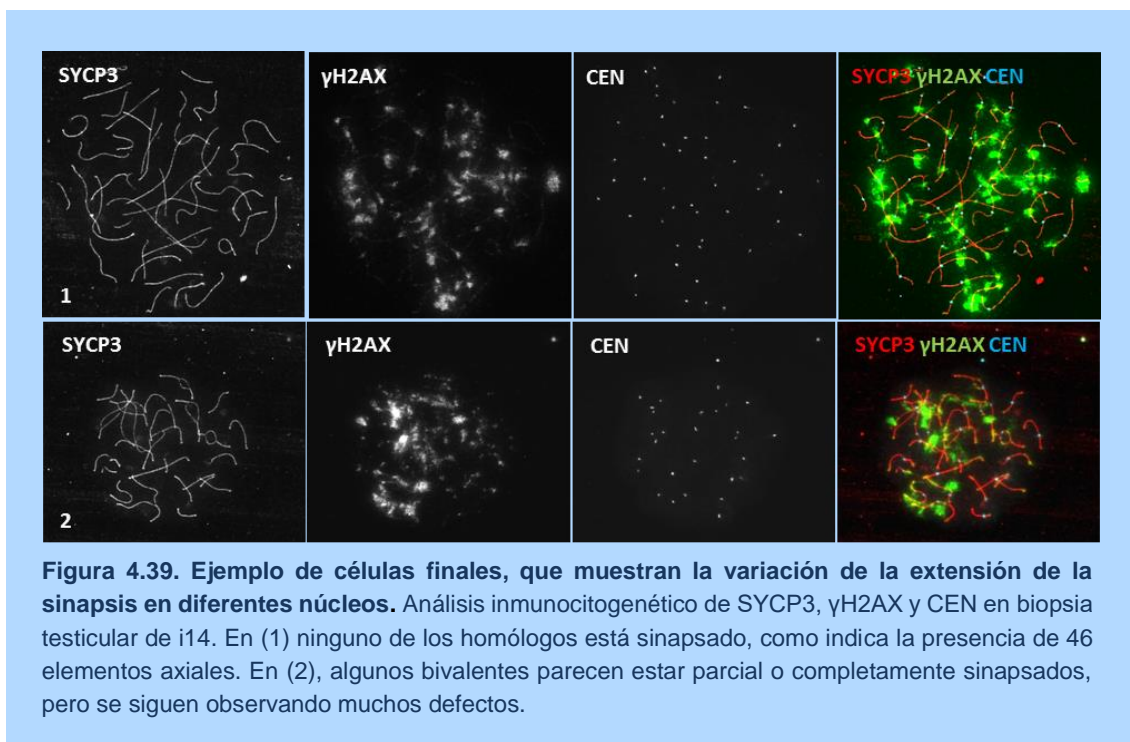
- Un SNP ya descrito en el gen *MSH5*, en homocigosis (cromosoma 6, A>G, 31,727,989; c.1859A>G, p.Lys620Arg), rs61748589 (frecuencia del alelo menos común, G, de 0,005%), que lleva a una mutación con cambio de sentido y con frecuencia del alelo menos común de 0,0016/8. Para analizar esta mutación se empleó el programa *UMD-Predictor* (<http://umd-predictor.eu/>). Este programa permite distinguir entre variantes neutrales y sustituciones patogénicas mediante el análisis de los siguientes datos: localización en la proteína, conservación, propiedades bioquímicas de los residuos *wild-*

## Resultados

*type* y mutante, y el impacto potencial de la variación sobre el ARNm. En base a estos parámetros, el programa determina un valor de patogenicidad, que es significativo si se sitúa por encima de 75. Valores por debajo de este límite se consideran polimorfismos. Para la mutación en el gen *MSH5* se obtuvo un valor de 41.

- Un SNP ya descrito en el gen *TOP2A*, en homocigosis (cromosoma 17, Chr 17, T>C, 38,555,150; c.3328A>G, p.Lys1110Glu), rs199941801 (frecuencia del alelo menos común, C, de 0,0001%), que lleva a una mutación con cambio de sentido. El valor de patogenicidad obtenido fue de 51.

- Un SNP ya descrito en el gen *NBN*, en homocigosis (cromosoma 8, C>T, 90,983,460; c.643C>T, p.Arg215Trp), rs34767364 (frecuencia del alelo menos común, T, de 0,002%), que lleva a una mutación con cambio de sentido. El valor de patogenicidad fue de 81.



## **5. DISCUSIÓN**



## 5.1. ANÁLISIS DE LA MEIOSIS Y SU RELACIÓN CON LA INFERTILIDAD

### 5.1.1 Recombinación meiótica e infertilidad

El término recombinación meiótica abarca varios tipos de mecanismos para la reparación de la ruptura de doble cadena del ADN típica de la fase inicial de la meiosis: la HR, la conversión génica y otros procesos independientes. Tal y como se ha presentado en los resultados, en el presente estudio se ha analizado específicamente la HR que resulta en la generación de COs, mediante la técnica de inmunocitogenética que permiten la localización de la proteína MLH1, presente en los nódulos de recombinación tardíos, de la proteína  $\gamma$ H2AX y de las proteínas del complejo sinaptonemal SYCP1 y SYCP3. La validez del conteo de puntos de MLH1 como método de análisis de la recombinación meiótica se comprobó en los primeros estudios que emplearon técnicas de inmunocitogenética sobre espermatoцитos<sup>51,258-260</sup>. Dichos estudios determinaron que el número y la localización de los *foci* de MLH1 en núcleos en fase de paquiteno concordaban tanto con los resultados obtenidos mediante otras mediciones directas - análisis de quiasmas - como con aquellos obtenidos mediante mediciones indirectas - análisis de ligamiento<sup>230</sup>.

Dado que el proceso de la recombinación meiótica es fundamental para la correcta progresión de la meiosis y por lo tanto para la generación de gametos funcionales, el presente estudio analizó la posible relación entre alteraciones de este proceso y problemas de fertilidad. Los resultados obtenidos no mostraron alteraciones importantes de los diferentes parámetros de la recombinación meiótica en los pacientes infértiles analizados.

### Relación de la recombinación con la infertilidad

A modo de resumen y para facilitar la discusión, los resultados referentes a los parámetros analizados de la recombinación meiótica se recogen en las **Tablas 5.1 y 5.2**. Tal y como se ha detallado en el **Apartado 4.1.1**, la **tasa de recombinación** medida como número de *foci* de MLH1 por núcleo no presentó diferencias significativas entre los individuos control y los grupos de pacientes OA y NOA. Tampoco se observó una diferencia significativa entre los dos grupos de pacientes entre sí (**Tabla 5.2**). Los valores de todos los individuos del estudio se hallaron dentro del rango control descrito en la literatura y en la mayoría de los casos se situaron próximos al valor superior de dicho rango (**Tabla 5.3**).

**Tabla 5.1. Infertilidad y parámetros de recombinación. Medias.**

Fenotipo	I	N	R	I	L (µm)
0	3	120	51,72	0,480	334,28
1	6	290/188*	52,47	0,462	304,41
2	2	68	48,77	0,492	285,82

I: Número de individuos analizados; N: número de paquitenos incluidos en el estudio; R: Tasa de recombinación; I: Interferencia; L: Longitud de los SCs; Fenotipos: 0 (fértil), 1 (OA) y 2 (NOA) \* Se analizaron 290 núcleos en el estudio de la tasa de recombinación y 188 en los estudios de interferencia y longitud de los SCs (no se disponía de estos datos para i13)

**Tabla 5.2. Infertilidad y parámetros de recombinación. Comparaciones por pares**

Fenotipo	Comp. G	R (p)	I (p)	L (p)
0	1	0,273	0,044*	0,054
	2	0,118	0,207	0,006*
1	0	0,273	0,044*	0,054
	2	0,065	0,000*	0,097
2	0	0,118	0,207	0,006*
	1	0,065	0,000	0,097

\*Resultados estadísticamente significativos

R: Tasa de recombinación; I: Interferencia; L: Longitud de los SCs; Comp. G: Comparación con genotipo; Fenotipos: 0 (fértil), 1 (OA) y 2 (NOA)

La relación entre una baja tasa de recombinación y problemas de fertilidad ha sido analizada por diversos autores, con resultados dispares. Así, estudios realizados por Gonsalves y col.<sup>233</sup>, Sun y col.<sup>234,261,262</sup> y Ma y col.<sup>263</sup> describieron la existencia de dicha relación en los pacientes que analizaron, mientras que otros trabajos<sup>149,264,265</sup> no la detectaron. En la mayoría de los artículos que analizaron la relación de este parámetro con problemas de fertilidad, la comparativa se realizó entre los resultados obtenidos a partir de los propios individuos control y los resultados de los pacientes analizados. Aquellos autores que compararon los resultados de los propios pacientes infértiles con los resultados de individuos control disponibles en la literatura llegaron a conclusiones diferentes: en el estudio de Ma y col.<sup>263</sup> la diferencia continuó siendo significativa mientras que en el estudio de Codina y col.<sup>149</sup> la diferencia entre la tasa de recombinación media de sus pacientes no resultó significativa en comparación con la de los controles de otros estudios<sup>233,234</sup>. No obstante, el citado estudio de Ma y col. analiza un caso muy concreto de un paciente con unas características meióticas particulares que no presentaba recombinación entre los cromosomas sexuales a pesar de la formación del cuerpo sexual y además presentaba una recombinación reducida en los

cromosomas 13 y 21<sup>263</sup>. Estos mismos autores, en otro estudio del mismo año en el que analizan tres pacientes infértiles (NOA) y un individuo control, no observan diferencias en la tasa de recombinación entre ambos grupos<sup>265</sup>. Ante estos resultados, los autores llegaron a la conclusión de que varones infértiles pueden tener un apareamiento y recombinación normales y no obstante presentar problemas de fertilidad.

Las causas de la discordancia detectada entre estos estudios pueden deberse por lo tanto a varios factores, entre los que se encuentran los siguientes: diferentes grupos étnicos, cantidades dispares y, en la mayoría de los casos, reducidas del número de muestras analizadas, fenotipos y genotipos diferentes de individuos control y pacientes analizados y la variabilidad interindividual del número de *foci* MLH1 por núcleo determinada en todos los estudios de los últimos años.

Los resultados del presente estudio refuerzan la hipótesis de que, dentro de un rango, la variabilidad de la tasa de recombinación es una característica individual no asociada a infertilidad, exceptuando aquellos casos en los que se observa una disminución severa del valor medio de *foci* de MLH1 por núcleo<sup>233</sup>. En estos casos, la baja tasa de recombinación puede provocar problemas durante la disyunción de los cromosomas homólogos y llevar a la generación de gametos con aneuploidías, un factor de riesgo significativo de abortos y anomalías en el desarrollo en humanos<sup>209,266</sup>. Así, la presencia de un mayor número de aneuploidías en espermatozoides de varones infértiles podría explicarse por un menor número de eventos de recombinación durante la meiosis <sup>264,267,268</sup>.

En cuanto a la **longitud media del conjunto de SCs autosómicos por núcleo**, ésta fue mayor en individuos control: 334,28  $\mu\text{m}$  vs. 285,82  $\mu\text{m}$  en pacientes NOA y 304,41  $\mu\text{m}$  en pacientes OA (**Tabla 5.1**). Estas diferencias no estarían asociadas a problemas en el avance de la meiosis puesto que según los resultados de nuestro análisis, el valor de la longitud media de los SCs es relativamente constante a lo largo de los diferentes subestadios de paquiteno (**Tablas 4.4 y 4.5**).

Tabla 5.3. Recombinación media y rango de *foci* de MLH1 en diferentes estudios inmunocitogenéticos en humanos.

Ref	I	N	F	Tasa	R	Rango medias
Barlow y col. <sup>51</sup>	C	1	ND	50,9±4,4	41-59	
Lynn y col. <sup>260</sup>	C	14	Ve, T, FQ	49,1±4,8	34-66	46,2±3,3 a 52,8±4,8
Gonsalves y col. <sup>233</sup>	C	17	Va, T	45,9±5,3		42,5±3,9 a 50,4±6,2
	P	49	OA	44,8±7,2		42,0±3,9 a 50,9±4,8
			NOA	40,0±12,2		4,2±2,4 a 48,9±7,4
Sun y col. <sup>234</sup>	C	6	Ca	40,6	21-62	
	P	1	NOA	32,7	1-60	
Sun y col. <sup>71</sup>	C	1	L	49,8±4,3	38-62	
Sun y col. <sup>261</sup>	C	11	T, CP, E, L, Ca	48,0±4,7	21-65	42,5±3,9 a 55,0±5,0
	P	23	OA	46,3 ± 6,1	4-64	32,3±15,1 a 48,9±7,4
			NOA	40,4±6,1	1-61	43,0± 8,8 a 52,6± 4,4
Codina-Pascual y col. <sup>149</sup>	C	5	Va, RVa	48,8±2,3	36-63	
	P	12	NOA, OA, AT, N	47,3±3,3	34-66	
Sun y col. <sup>85</sup>	C	10	T, RVa	49,7	21-67	46,4±5,5 a 53,2±4,9
Ma y col. <sup>265</sup>	C	1	RVa	49,5	39-59	
	P	3	NOA	49,1	37-67	
Ma y col. <sup>263</sup>	C	2	RVa	45,4±4,7		
	P	1	OAT	38,3±5,6		
Sun y col. <sup>262</sup>	C	12	ND	48,5±3,6		42,5±3,9 a 55,0±5,0
	P	29	NOA	42,7±8,2		32,3±15,1 a 55,7± 4,3

Ref: Referencia; I: Individuos; N: Número de individuos; F: Fenotipo; R: Rango; C: Control; P; Paciente; ND: No Detallado; Ve: Varicocele; T: Tumor testicular; FQ: Fibrosis Quística; Va: Vasectomía; Ca: Cáncer no reproductivo; L: Liposarcoma; CP: Cáncer de próstata; E: epididimitis; RVa: vasectomía reversa; OA: Azoospermia obstructiva, NOA: Azoospermia no obstructiva; OAT: Oligoastenoteratozoospermia; AT: Astenoteratozoospermia; N: Normozoospermia



Aunque estadísticamente los valores observados en el grupo control difieren significativamente de los hallados en individuos NOA, el número analizado de estos pacientes es pequeño para concluir que la longitud del SC puede ser un factor clave en la fertilidad del individuo (**Tabla 5.2**). De hecho, la variabilidad interindividual observada en la longitud media del conjunto de SCs autosómicos por célula, tanto entre individuos control como en individuos infértiles indica que posiblemente es una característica individual no asociada a la infertilidad de los pacientes del presente estudio, al igual que en el caso de la tasa de recombinación media. La longitud de los SCs se ha relacionado con diferentes fenómenos y condiciones, como el empaquetamiento del ADN alrededor del elemento lateral, la formación de complejos de cohesinas y condensinas paralelos al SC o la presencia de heterocromatina<sup>269,270</sup>.

Debido a la importancia del cuerpo sexual en la progresión de la meiosis, se analizó la recombinación en el cuerpo sexual y su posible relación con problemas de fertilidad. La **Tabla 5.4** resume los resultados obtenidos en el presente estudio y en trabajos previos.

**Tabla 5.4. Análisis de la presencia de un foco de MLH1 en el cuerpo sexual en diferentes estudios inmunocitogenéticos en humanos.**

Estudio	Individuos	F	MLH1 en XY (%)	Rango (%)
Barlow y col. <sup>51</sup>	Control	ND	56,5	
Sun y col. <sup>71</sup>	Control	L	73,0	
Codina-Pascual y col. <sup>149</sup>	Pacientes	NOA, OAT, AT, NOR	59,2	40,0 a 76,2
	Controles	Va, RVa	69,9	59,7 a 80,5
Ma y col. <sup>263</sup>	Pacientes	OAT	0,0	
	Controles	Va	80,2	
Sun y col. <sup>262</sup>	Pacientes	NOA	65,6	20 a 100
	Controles	ND	71,9	55 a 91
Ferguson y col. <sup>271</sup>	Controles	RVa	80,8	
Actual	Pacientes	NOA, OA	79,9	70,5 a 90,5
	Controles	T, H	74,2	56,8 a 80,6

F: fenotipo; ND: No Detallado; L: Liposarcoma; Va: Vasectomía; RVa: vasectomía reversa; NOA: Azoospermia no obstructiva; OAT: Oligoastenoteratozoospermia; AT: Astenoteratozoospermia; N: Normozoospermia T: Tumor testicular; H: Hidrocele

No se observaron diferencias significativas entre los individuos control y los infértiles en lo que respecta a la presencia de un foco MLH1 el cuerpo sexual. Estos datos se corresponden con los obtenidos en otros estudios de recombinación meiótica en

humanos. Como única excepción cabe mencionar el paciente mencionado con anterioridad en el cual no se observó recombinación en el cuerpo sexual, y que presentaba problemas de aneuploidías en los cromosomas 13, 18, 21 y XY<sup>263</sup> (**Tabla 5.4**).

### 5.1.1.2 Relación de la sinapsis con la infertilidad

En este estudio, todos los individuos analizados, tanto controles como pacientes infértiles, presentaron defectos sinápticos. La incidencia de dichos defectos mostró una gran variabilidad interindividual y no se observaron diferencias significativas entre los pacientes y la población control. Los resultados de otros estudios sobre la relación entre defectos sinápticos e infertilidad difieren bastante entre ellos (**Tabla 5.5**). Así por ejemplo, la incidencia de asinapsis en estos estudios se sitúa entre un 8% y un 64% en infértiles y un 3% y 11,7% en controles. La incidencia de *gaps* entre un 31% y un 68% en infértiles y un 26% y 50,2% en controles. Estas diferencias pueden deberse a cantidades dispares del número de muestras analizadas y a los fenotipos no homogéneos de individuos control y pacientes, así como a la variabilidad que se deriva de la técnica de extensión de SCs utilizada.

De acuerdo con la interpretación de varios autores, la presencia de zonas asinapsadas en la fase inicial y media del paquiteno puede explicarse por la propia dinámica del proceso sináptico, que avanza desde las zonas subtelméricas hacia los centrómeros<sup>19</sup>. Estas asinapsis se concentran preferentemente en las regiones pericentroméricas de cromosomas metacéntricos, subcentroméricas (brazo q) en los cromosomas submetacéntricos y teloméricas (brazo p) en los cromosomas acrocéntricos. Por ello, tal y como plantea un estudio anterior<sup>149</sup>, podría considerarse que la mayoría de las anomalías sinápticas encontradas en las fases inicial y media del paquiteno no son tales y sólo aquellos *gaps* y asinapsis que perduran hasta el paquiteno medio/tardío, y preferentemente en zonas no heterocromáticas, pueden relacionarse con problemas severos asociados a bloqueos parciales o totales de la meiosis y por lo tanto con diferentes fenotipos de problemas de fertilidad.

**Tabla 5.5. Datos sobre anomalías sinápticas disponibles en la literatura.**

Estudio	Individuos	F	Asinapsis (%)	Gaps (%)
Sun y col. <sup>234</sup>	Pacientes	NOA	64	68
	Controles	T	2,3	26
Guichaoua y col. <sup>272</sup>	Pacientes	NOA, OA	17,6 <sup>+</sup>	
	Controles	T, O	10,6	
Codina-Pascual y col. <sup>149</sup>	Pacientes	OAT, NOA, AT, NOR	11,2	58,8
	Controles	Va, RVa	11,7	50,2
Sun y col. <sup>261</sup>	Pacientes	NOA, OA	10 <sup>OA</sup> /32 <sup>NOA</sup>	31 <sup>OA</sup> /47 <sup>NOA</sup>
	Controles	T, TD, E, L	7,5	35
Sun y col. <sup>262</sup>	Pacientes	NOA	24	37
	Controles	ND	10	37
Tassistro y col. <sup>273</sup>	Pacientes	NOA, OZ	8,0	
	Controles	FQ, Va, A	3,0	
Presente estudio	Pacientes	NOA, OA	12 <sup>OA</sup> /18 <sup>NOA</sup>	10 <sup>OA</sup> /5 <sup>NOA</sup>
	Controles	T, H	14	8

F: Fenotipo; NOA: Azoospermia no obstructiva; T: Tumor testicular; OA: Azoospermia obstructiva; O: orquidectomía; OAT: Oligoastenoteratozoospermia; AT: Astenoteratozoospermia; NOR: Normozoospermia; Va: Vasectomía; RVa: vasectomía reversa; TD: Tumores diversos; E: Epididimitis; L: Liposarcoma; ND: No Detallado; FQ; Fibrosis quística; A: Agenesia

\*Media obtenida del resultado de OA 25,4% y NOA 9,8%

En base a este criterio, se consideró que sólo los pacientes i13, i14 e i16 presentaban problemas de sinapsis. El paciente i13, si bien es OA según parámetros clínicos, presentó anomalías severas en varios bivalentes y además un posible bloqueo meiótico en estadio medio del paquiteno, ya que en el análisis inmunocitogenético no se observaron células en estadios más tardíos. Además de las anomalías sinápticas mencionadas, en este paciente se observaron dos núcleos poliploides, caracterizados por la presencia de estructuras de apareamiento complejas (**Figura 4.8**). La presencia de un núcleo tetraploide en un individuo control fue descrita por Codina y col. en el año 2006. Los autores de este estudio propusieron que el origen más probable de esta anomalía eran procesos de endoreplicación pre-meióticos, que tienen lugar durante la etapa de división mitótica de las espermatogonias. Sus observaciones demostraron, además, que meiocitos tetraploides podían iniciar meiosis y que serían el origen de espermatozoides diploides<sup>274</sup>.

En el caso del individuo i16 no se detectó un bloqueo en el proceso meiótico, aunque sí una ralentización del mismo, puesto que el porcentaje de células en paquiteno medio y tardío fue inferior a la esperada (**Figura 4.27**). El bloqueo meiótico observado en el

paciente i14 se manifestó significativamente ya en la etapa de zigoteno, puesto que no se observaron núcleos en estadios posteriores. El fenotipo meiótico de este paciente y los posteriores estudios que se realizaron para determinar las causas del bloqueo se describen con más detalle en el [Apartado 4.6](#).

Por otra parte, en el caso del control HC1 la mayoría de *gaps* y asinapsis observados se encontraron en un bivalente que, por morfología y tamaño, correspondía seguramente al cromosoma 9. La elevada incidencia de anomalías sinápticas en este bivalente podría estar asociada a un polimorfismo en la región 9qh<sup>275</sup>. Aunque no se dispuso del cariotipo de este individuo control, se sospechó de posible polimorfismo en 9qh al analizar las imágenes de núcleos en paquiteno y observar una diferencia en la longitud de los elementos laterales que corresponderían a esta región ([Figura 5.1](#)).

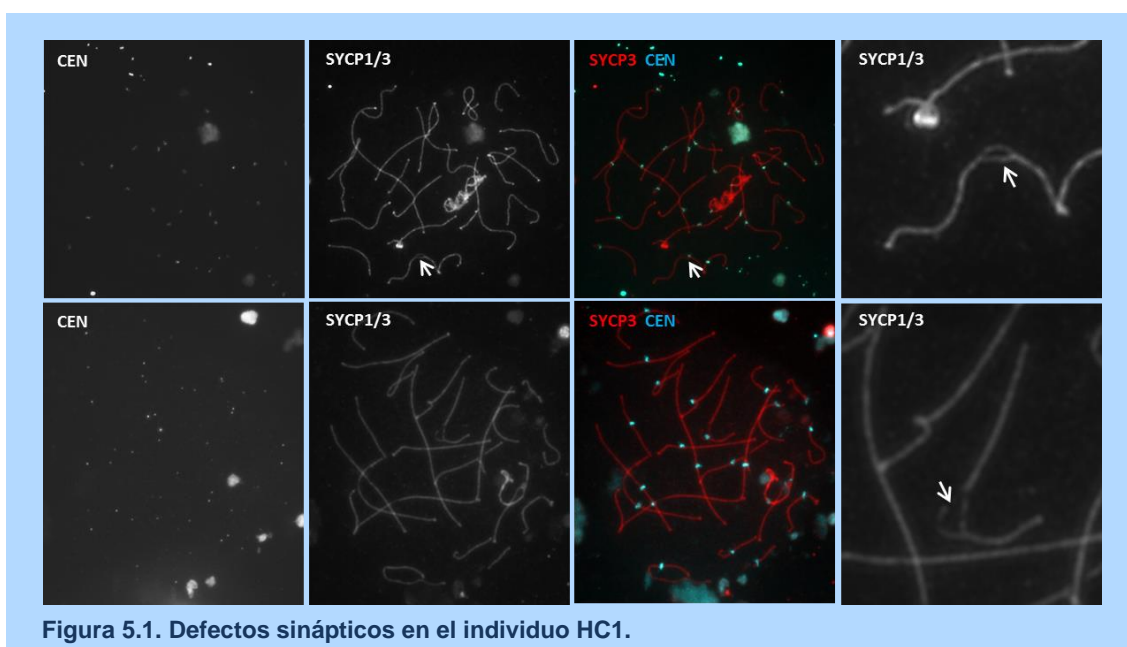


Figura 5.1. Defectos sinápticos en el individuo HC1.

Según los datos disponibles en la literatura, se calcula que la incidencia de anomalías sinápticas en varones infértiles varía entre el 3 y el 6%<sup>212,276</sup>. En el caso de individuos con azoospermia severa, esta incidencia se incrementa hasta el 17,6% y en individuos normozoospermicos con uno o más intentos fallidos de fecundación *in vitro* (IVF, *In Vitro Fertilization*) hasta el 27%<sup>212</sup>. Se sabe ya desde hace décadas que errores en la sinapsis están asociados con problemas de fertilidad<sup>277</sup> y que en mamíferos dicha asociación es más severa en machos que en hembras<sup>187</sup>.

El origen de los defectos sinápticos se relaciona con mutaciones en uno o varios genes involucrados en los procesos de sinapsis y reparación del ADN<sup>60,237,278-280</sup>; también

pueden estar causados por alteraciones sinápticas, como heterosinapsis<sup>281</sup>, *interlocking* de bivalentes o fibras nucleolares que conectan bivalentes independientes<sup>282</sup>. Todas estas causas pueden llevar a un bloqueo meiótico asociado a azoospermia o oligozoospermia<sup>281,283</sup>, o a formas más leves de infertilidad<sup>284</sup>. En la serie de pacientes analizados, el individuo i14 presentaba defectos sinápticos generalizados y los resultados del exoma indicaron claramente la presencia de un componente genético. Además, estudios recientes también han demostrado la influencia del medio ambiente sobre el proceso de sinapsis. Por ejemplo, Ali y col. demostraron que dosis bajas de bisfenol A (BPA, *Bisphenol A*) alteran la expresión de numerosos genes, especialmente aquellos involucrados en el inicio y la progresión de la meiosis, siendo las anomalías prevalentes aquellas que afectan a los SCs tales como asinapsis total y fragmentación múltiple<sup>285</sup>. Otros estudios han demostrado la relación de la proteína *Heat shock factor 2* (HSF2) con la progresión de la gametogénesis y con la presencia de defectos estructurales en los SCs<sup>286</sup>. Debido a que la producción de proteínas *heat shock* depende de la exposición a diferentes situaciones de estrés ambiental, tales como infección, inflamación, ejercicio, exposición a toxinas (etanol, arsénico, luz UV...), inanición, hipoxia, etc.<sup>287</sup>, la regulación de estas proteínas sería otro ejemplo de cómo factores ambientales podrían afectar el proceso sináptico durante la meiosis.

### 5.1.2. Genética e infertilidad

Como se ha indicado en la introducción, las causas genéticas se postulan responsables de un elevado porcentaje de casos de infertilidad. En el presente estudio se ha analizado en concreto la relación de *PRDM9* e infertilidad, dado el papel que juega el exón 11 de dicha proteína sobre el proceso de recombinación. No se hallaron en nuestra población de estudio diferencias significativas entre los controles y los pacientes infértiles ([Tabla 4.22](#)).

Dos de los primeros artículos que analizaron el gen *PRDM9* se centraron en la asociación de variables (SNPs) en este gen con infertilidad en pacientes NOA<sup>114,115</sup>. Los autores del primer estudio encontraron un SNP en el exón 6 que ocasionaba una mutación silenciosa y otro en el exón 9 que resultaba en una mutación sin sentido. Por ello sugirieron que estos SNPs podrían estar involucrados en la disrupción de la espermatogénesis en los pacientes analizados, si bien su estudio se limitaba sólo a 18 pacientes. En el segundo estudio encontraron numerosos SNPs en la región de los ZFCR. No obstante, con el conocimiento que hemos adquirido durante la realización del presente trabajo, consideramos muy probable que los polimorfismos que se mencionan

en el artículo de Irie y col. se correspondan con variantes alélicas presentes en la población general no relacionadas con el estatus de fertilidad del individuo.

En un estudio previo de nuestro grupo de investigación se detectó una variante en el exón 10 de un paciente infértil en estado de heterocigosis (16793A>G) que conlleva un cambio de aminoácido (Arg342Gly). El exón 10 forma parte del dominio central PR/SET, el cual posee función trimetilasa y puede ser responsable de la activación de los *hotspots* al actuar sobre la remodelación de la cromatina. El aminoácido cambiado no es invariable pero sí pertenece a los conservados en gran parte de la familia de las histona lisina metiltransferasas<sup>288</sup>. Dicho aminoácido se halla en la región conocida como 'pliegue *pseudoknot*', cuya función es poner en contacto los dos motivos secuenciales más conservados del dominio SET (RFINHCXPN y ELXFDY) para formar un sitio activo próximo al "bolsillo" donde se une el donante del grupo metilo y el surco de unión al péptido<sup>289</sup>. La implicación de este cambio en la infertilidad del paciente quedó por determinar. No obstante, en un artículo reciente sobre salud y efectos poblacionales de *knockout* genéticos raros en humanos adultos con padres emparentados, los autores identificaron una mujer *PRDM9 knockout* fértil<sup>290</sup>. La mutación (R345Ter) que presentaba dicha mujer se hallaba también en el exón 10 y resultaba en el truncamiento del dominio PR/SET, por lo que la proteína producida carece del dominio ZFCR.

El análisis de recombinación realizado en esta mujer y su familia demostró que las zonas de recombinación meiótica se hallaban lejos de los *hotspots* dependientes de *PRDM9*. Estas zonas de recombinación tampoco se localizaron en promotores ni en regiones ricas en GC, tal y como se ha observado en estudios que analizan modelos sin proteína *PRDM9* funcional, tales como ratones<sup>82,94</sup> y cánidos<sup>291</sup>. Por todo ello, y dado que la mutación no afectaba a la fertilidad de la mujer, los autores del artículo postularon una redundancia de *PRDM9* en humanos y por lo tanto la existencia de mecanismos alternativos para la localización de COs<sup>257,292</sup>. Aunque el hallazgo de un *PRDM9* no funcional en una mujer fértil podría sugerir que la mutación encontrada en el paciente infértil citado anteriormente no sería causa de infertilidad, no se puede descartar que, al igual que en otros genes relacionados con procesos meióticos, la mutación produzca efectos diferenciales en ambos sexos<sup>190</sup>.

## 5.2. ANÁLISIS DE LA RECOMBINACIÓN MEIÓTICA EN MAMÍFEROS

### 5.2.1. Variabilidad interindividual y entre especies en los procesos de recombinación meiótica

En el presente estudio se observaron diferencias en los diversos parámetros de recombinación meiótica (número de *foci* de MLH1 por núcleo, longitud de los SCs e interferencia) entre especies (Tabla 5.6) y entre los individuos de una misma especie. En el caso de las diferencias interindividuales, éstas fueron significativas en la mayoría de los casos.

Tabla 5.6. Parámetros de recombinación en las tres especies del presente estudio

Organismo	Valores	Foci MLH1	Longitud SCs
Humanos	Significancia <sup>1</sup>	<0,001	<0,001
	Diferencia entre extremos <sup>2</sup>	17%	21%
	Rango <sup>3</sup>	37 a 65	218,68 a 429,09
Gatos	Significancia <sup>1</sup>	<0,001	<0,001
	Diferencia entre extremos <sup>2</sup>	18%	34%
	Rango <sup>3</sup>	33 a 68	154,35 a 409,34
Perros	Significancia <sup>1</sup>	=0,002	
	Diferencia entre extremos <sup>2</sup>	2%	
	Rango <sup>3</sup>	37 a 46	

<sup>1</sup> Significancia de la diferencia interindividual

<sup>2</sup> Diferencia entre los dos valores medios extremos (el más bajo y el más alto) de todos los individuos

<sup>3</sup> Rango, valor mínimo y máximo observado en todos los núcleos analizados

### MLH1

En las tres especies analizadas en el presente estudio se observó que el **valor medio de foci de MLH1 por núcleo** presentaba una variabilidad interindividual significativa (Tabla 5.6). La diferencia entre los dos extremos de la media total para este rasgo fue similar en humanos y gatos (17% y 18% respectivamente) mientras que en perros la variación observada fue ostensiblemente menor (2%). Esta variabilidad interindividual ha sido observada previamente en humanos<sup>149</sup> y en otras especies de mamíferos: ratones<sup>80,293</sup>, cerdos<sup>6</sup> y primates, tanto macacos<sup>294</sup> como monos platirinos (*Cebus libidinosus*, *Cebus nigritus* y *Alouatta caraya*)<sup>295</sup>. En cambio, estudios previos realizados



en gatos<sup>9</sup> y perros<sup>10</sup> no determinaron diferencias significativas entre los individuos analizados; tampoco en el caso de la musaraña (*Sorex araneus*) se detectó variabilidad entre las tres subespecies analizadas (oxford, wirral y acrocéntrica)<sup>7</sup>. En un estudio de Segura y col., en el que se analizaba el valor medio de *foci* de MLH1 por núcleo en diversas especies de mamíferos tampoco se observaron diferencias significativas entre los ejemplares de una misma especie (*E. edwardii*), ni tan siquiera entre ejemplares del mismo grupo filogenético (dos especies de Macroscelidea y siete especies de Primates). Según los autores de este estudio, este hecho sugeriría que la frecuencia de recombinación puede evolucionar aunque dentro de ciertos límites. Estos límites vendrían impuestos por las características genéticas intrínsecas y la dinámica poblacional de cada taxón<sup>296</sup>. No obstante, el bajo número de individuos analizados de la misma especie (n = 4, *E. edwardii*) y de especies del mismo grupo filogenético es, posiblemente, demasiado bajo para reflejar de manera estadística la existencia de variabilidad, tanto interindividual como interespecífica.

Los resultados de recombinación obtenidos en gatos y perros en el presente estudio discrepan de los presentados por Borodin y col.<sup>9</sup> y Basheva y col.<sup>10</sup>. Estas diferencias pueden deberse a que los citados estudios analizaron una muestra reducida de tres individuos de tan sólo tres meses de edad. Puesto que los gatos alcanzan la madurez sexual entre los cuatro y los ocho meses, y los perros entre los seis y doce meses, es posible que los individuos de los estudios de Borodin y Basheva presentasen una meiosis inicial, inmadura aún y no completa, y que los resultados obtenidos no reflejen el proceso meiótico de los gatos y los perros adultos. Sirva como ejemplo el gato más joven del presente estudio de tan sólo cuatro meses de edad. Los núcleos que se encontraron en este espécimen se correspondieron, en su mayoría, con fases muy iniciales de paquiteno, hecho que podría reflejar una sincronización celular que correspondería al primer ciclo de espermatogénesis. La diferencia de edad de un mes entre el gato más joven del presente estudio y los gatos analizados en el estudio anterior podría, además, justificar el notable incremento de *foci* de MLH1 (50,92) respecto de los resultados observados por Borodin y col. (media de 42,5).

El **rango de *foci* de MLH1** por núcleo presentó también cierta variabilidad interindividual e interespecífica en las tres especies analizadas (**Tabla 5.6**). En lo que respecta al rango de *foci* de MLH1 en humanos, los valores son similares a los descritos en estudios previos de análisis directo de la recombinación situados entre 21 y 67 *foci* de MLH1 por núcleo (**Tablas 5.3 y 5.6**). Trabajos anteriores han establecido que en base al número máximo de *foci* de MLH1 por SC el valor máximo teórico de *foci* de MLH1 por núcleo en varones es de 78<sup>84</sup>. El valor máximo observado en nuestro estudio (65 *foci* de MLH1 por



núcleo) se sitúa por debajo de dicho valor teórico, al igual que el del artículo de Codina y col.<sup>84</sup> y que los obtenidos en todos los estudios previos (**Tabla 5.3**). El hecho de que no se alcance este máximo teórico se atribuye a la existencia de un posible mecanismo que controlaría el número de *foci* de MLH1 no sólo en su valor mínimo sino también máximo.

En perros, en cambio, tanto la variabilidad de este rango como la del número medio de *foci* de MLH1 por núcleo (reflejada en una desviación estándar media de 1,34) son menores que las determinadas en humanos (DE 4,96) y gatos (DE 5,31). El reducido rango de *foci* de MLH1 por núcleo en perros concuerda con las observaciones de un estudio previo en el que se analizó la evolución de los mecanismos que afectan la tasa de recombinación y la interferencia en mamíferos euterios<sup>296</sup>. Los autores observaron que, de las once especies analizadas, sólo *C. familiaris* y *L. catta* presentaron una reducción en la desviación estándar asociada a los valores medios de *foci* de MLH1 por núcleo. Esta reducción se refleja en la poca variación intercelular para este valor observada en estas especies, es decir, en un estrecho rango de *foci* de MLH1. En las otras nueve especies analizadas, las desviaciones estándar se situaron entre 3,1 y 6,2. Los autores del citado estudio concluyen que este hecho puede explicarse, al menos en parte, por la morfología de los cromosomas: las especies con mayor proporción de acrocéntricos presentan un rango de *foci* de MLH1 por núcleo más reducido en comparación con las especies cuyos cariotipos están formados por una mezcla de morfologías cromosómicas (metacéntricos, submetacéntricos, acrocéntricos)<sup>296</sup> (**Tablas 5.7 y 5.8**). En consecuencia, dichas especies presentan menores desviaciones estándar asociadas a los valores medios de *foci* de MLH1 por núcleo. Todos los cromosomas autosómicos de *C. familiaris* son acrocéntricos mientras que en el caso de *L. catta* 46 son acrocéntricos, 4 submetacéntricos y 4 metacéntricos. La influencia de la morfología cromosómica sobre el número, y también la distribución, de los *foci* de MLH1 en el núcleo podría deberse a las fuerzas que están asociadas con apareamiento y sinapsis durante el inicio de la profase meiótica<sup>296,297</sup>. Como se puede observar en la **Tabla 5.8**, las especies con mayor proporción de acrocéntricos presentan un rango de *foci* de MLH1 por núcleo más reducido (ratón, muntíaco, perro). Además, como han demostrado numerosos estudios, la importancia de la morfología cromosómica sobre la recombinación queda reflejada en el cumplimiento del requerimiento mínimo de un foco de MLH1 por SC que garantiza la correcta segregación de los homólogos durante la anafase I<sup>298,299</sup>. Algunos autores describen dicho fenómeno de forma ligeramente diferente, como una casi equivalencia 1:1 entre el número de *foci* de MLH1 por núcleo y el número de brazos autosómicos<sup>300,301</sup>.

**Tabla 5.7 Cariotipo de las especies de mamíferos**

Espece	2n	FNa	Descripción
Ratón <sup>302,303</sup>	40	38	19 pares de autosomas: todos acrocéntricos
Musaraña <sup>7,304</sup>	21-25	40	Variable <sup>7,304</sup>
<i>Cebus</i> <sup>295</sup>	54	72	26 pares de autosomas - 16 acrocéntricos - 8 submetacéntricos - 2 metacéntricos
<i>Alouatta</i> <sup>295</sup>	52	66	25 pares de autosomas - 15 acrocéntricos - 8 submetacéntricos - 2 metacéntricos
Cerdo <sup>305</sup>	38	60	18 pares de autosomas - 5 metacéntricos - 7 submetacéntricos - 6 acrocéntricos
Caballo <sup>306</sup>	64	88	31 pares de autosomas - 13 no acrocéntricos - 18 acrocéntricos
Visón <sup>307</sup>	30	54	14 pares de autosomas - 5 metacéntricos - 8 submetacéntricos - 1 acrocéntricos
Gatos <sup>308</sup>	38	68	18 pares de autosomas - 8 metacéntricos - 8 submetacéntricos - 2 acrocéntricos
Perros <sup>309</sup>	78	76	38 pares de autosomas: todos acrocéntricos
Humanos <sup>310</sup>	46	78	22 pares de autosomas: - 5 metacéntricos - 12 submetacéntricos - 5 acrocéntricos

FNa: número diploide de brazos autosómicos

En un estudio reciente que analizó varias especies de mamíferos se observó que la correlación entre el número de *foci* de MLH1 por núcleo y el número de brazos cromosómicos era más significativa que la correlación entre el número de *foci* de MLH1 por núcleo y el número de cromosomas (haploide)<sup>296</sup>. En la [Tabla 5.8](#) se puede observar

que los animales que más se desvían de la equivalencia ideal 1:1 (valores iguales o superiores a 1,3) son gatos y humanos.

**Tabla 5.8. Datos de la tasa de recombinación meiótica en diversas especies de mamíferos.**

Especie	Foci de MLH1 por célula							
	2n	FNa	N	FNa/2	C.	Media	VI	Rango
Ratón <sup>5</sup>	40	38	20	19	1,2	22,9	ND	ND
Cerdo <sup>6</sup>	38	60	19	30	1,1	32,0	30,19-37,33†	21-46
Caballo <sup>8</sup>	64	88	32	44	1,1	50,12	49,34-50,47	46-57
Musaraña <sup>7</sup>	20-33	40		20	1,1	21,9	21,6-22,3†	18-28
Macaco <sup>294</sup>	42	80	21	40	1,0	39,0	36,8-41,6	29-48
<i>C. libidinosus</i> <sup>295</sup>	54	72	27	36	1,1	41,3	ND	31-52
<i>C. nigritus</i> <sup>295</sup>	54	72	27	36	1,1	39,2	ND	31-46
<i>A. caraya</i> <sup>295</sup>	52	66	26	33	1,2	40,6	ND	31-50
Visón <sup>69</sup>	30	54	15	27	0,9	25,5	ND	ND
Muntíaco <sup>70</sup>	46	46	23	23	1,3	28,9	ND	25-34
Gato <sup>*,9</sup>	38	68	19	34	1,4	48,88*	43,15-52,76*	33-68*
						42,5	ND	27-55
Perro <sup>*,10</sup>	78	76	39	38	1,1	40,2*	39,72-40,55*	37-46*
						40,0	ND	36-44
Humano <sup>*,71</sup>	46	78	23	39	1,3	50,65*	45,34-55,58*	37-65*
						49,8		

2n: número diploide de cromosomas; FNa: número diploide de brazos autosómicos; C: número de *foci* de MLH1 por núcleo / (FNa/2); VI: Variación interindividual. ND: No disponible; \*: Presente estudio; †: Variabilidad entre razas

Musaraña: número de brazos autosómicos es constante (FNa=40). Número de cromosomas diploide (2n) varía entre 22 y 33. El origen de dicha variabilidad son fusiones Robertsonianas.

Además de la morfología cromosómica, la influencia de otros factores sobre la **tasa de recombinación** ha sido analizada por diferentes autores con resultados dispares. Así por ejemplo, respecto al factor edad, algunos autores han determinado la existencia de una asociación inversa entre ambas variables (a mayor edad, menor recombinación)<sup>11</sup>, mientras que otros trabajos no han hallado dicha asociación<sup>11,51,260</sup>. En el presente estudio se ha analizado un individuo humano de más de 90 años de edad con una tasa de recombinación situada dentro del rango control (51,83 *foci* de MLH1 por núcleo). Aunque se trata de un único caso, este resultado reforzaría la idea de que la tasa de recombinación no disminuye significativamente con la edad. Además, en un estudio reciente realizado en ratones, se ha observado que la tasa de recombinación es variable

a lo largo de la vida de los ratones macho, siendo en comparación baja en los individuos jóvenes y presentando los valores más elevados en los individuos de edad avanzada<sup>311</sup>.

La influencia de características fisiológicas de los individuos (varicocele, vasectomía, tumor testicular) sobre dicha tasa ha sido también desestimada en humanos<sup>260</sup>. Tampoco existe una variación significativa en el número medio de *foci* de MLH1 por núcleo entre paquitenos iniciales, medios y tardíos<sup>51,149,260</sup>. Dichos resultados concuerdan con los datos que hemos obtenidos en nuestro estudio para gatos y humanos. No obstante, aun no encontrando diferencias significativas, sí hemos observado una tendencia a alcanzar el máximo de recombinación posible en paquitenos medio y una subsecuente reducción posterior de *foci* de MLH1 hasta llegar a subestadios muy avanzados del paquitenos (Figura 4.2). Este comportamiento de la tasa de recombinación, con un máximo de *foci* de MLH1 en paquitenos medio también se observa en ratones, si bien en esta especie la diferencia observada por Baker y col. entre los subestadios sí fue significativa<sup>259</sup>.

Algunos autores ya han demostrado la influencia de factores genéticos<sup>81,87,117,118,312</sup> y ambientales sobre la tasa de recombinación<sup>313</sup> y, en el caso de las diferencias entre especies, la existencia de factores como la evolución del cariotipo de cada especie - resultado de los diversos eventos de fusión y de fisión - que ocasionan una variación en la tasa de recombinación<sup>75</sup>.

### Longitud de los SCs autosómicos

También la **longitud de los SCs autosómicos** presentó una elevada variabilidad interindividual en humanos y gatos. Esta variabilidad también se ha observado entre individuos de otras especies tales como ratón, caballo, muntíaco o macaco (Tabla 5.9). En alguno de estos estudios, la variabilidad se ha determinado incluso entre razas diferentes de una misma especie<sup>6,7</sup>.

**Tabla 5.9. Longitud media de los SCs por célula en mamíferos**

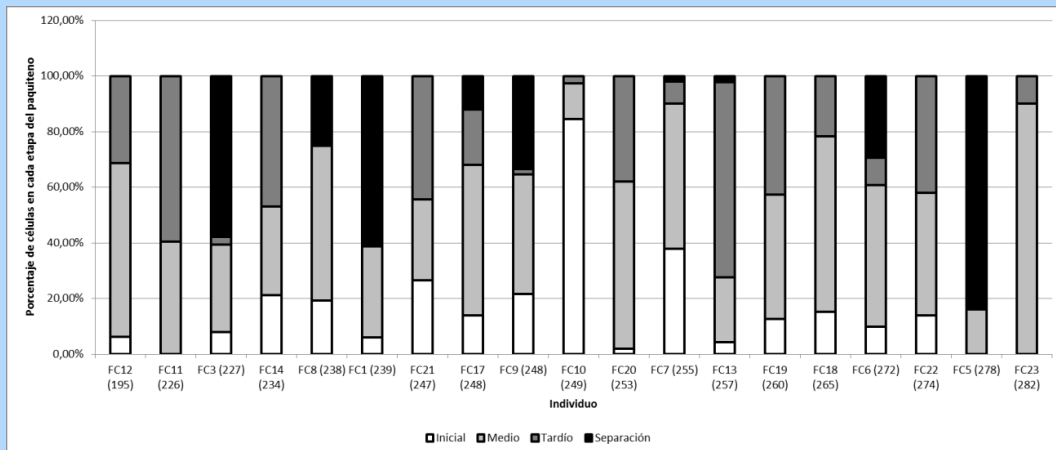
Especie	Long SCs (µm)	Variabilidad (µm)	Rango
Ratón <sup>5</sup>	163,7	ND	ND
Cerdo <sup>6</sup>	190,3	180-199 (10%)	142-269
Caballo <sup>8</sup>	254,6	230-282 (20%)	ND
Musaraña <sup>7</sup>	142,8	ND	ND
Visón <sup>69</sup>	161,4	ND	ND
Muntíaco <sup>70</sup>	301,5	ND	ND
Gato <sup>*,9</sup>	252,2*	195-282 (34%)*	154-409*
	193,5		141-293
Perro <sup>10</sup>	246,0	ND	ND
Humano <sup>*,71</sup>	313,8*	271-352 (23%)*	219-429*
	297,9	ND	194-307

ND: No disponible; \*: Presente estudio

Por lo que respecta a la variación de la longitud física de los SCs a lo largo de las diferentes fases del paquiteno, el análisis realizado en gato muestra cómo la media de la longitud de los SCs autosómicos va aumentando significativamente a lo largo de las fases del paquiteno (Tabla 4.4).

Esta variación se ha observado también en cerdos (*Sus scrofa domestica*)<sup>250</sup> y ratones<sup>314</sup>. En ratones, al igual que en gatos, dicha variación se caracteriza por un aumento de la longitud desde el paquiteno inicial hasta el tardío<sup>314</sup>. Por el contrario, en cerdo<sup>6</sup> y hámster<sup>315</sup> se observa un mayor estado de compactación de los SCs en el paquiteno medio y un estado más relajado en el paquiteno inicial y tardío. El comportamiento de los SCs en humano es similar al observado en cerdo, aunque en ninguno de los estudios realizados se observa una variación significativa, tan sólo una tendencia.

A pesar del aumento de la longitud a lo largo del paquiteno, no parece existir una relación directa entre la longitud media de los SCs autosómicos y el porcentaje de núcleos según los subestadios del paquiteno. Es decir, aquellos individuos con un mayor porcentaje de núcleos en fases más iniciales del paquiteno no presentan necesariamente los SCs más cortos, del mismo modo que los individuos con mayor porcentaje de núcleos en fases más tardías del paquiteno no presentan necesariamente los SCs más largos (Figura 5.2).



**Figura 5.2. Relación de la longitud media de los SCs por célula con porcentajes de células en diferentes estadios en cada individuo.** Los individuos están ordenados de izquierda a derecha según la longitud media de los SCs (en paréntesis).

La existencia de variación en la longitud media de los SCs a lo largo del paquiteno, llevó a Mary y col. a afirmar que el conocimiento de la longitud física de los SCs per se tiene un interés relativamente limitado<sup>6</sup>. Desde nuestro punto de vista, ésta es una afirmación discutible, pues en el presente estudio se ha observado que, al igual que otras medidas meióticas, es una característica propia de cada individuo que seguramente depende de múltiples factores, muchos de los cuales todavía se desconocen. Además, es una medida imprescindible para analizar otros parámetros de la recombinación como la interferencia, y por lo tanto necesaria para analizar los mecanismos meióticos.

Entre los factores que se barajan responsables de la determinación de la longitud de los SCs, Lynn apunta a la variación alélica en los *loci* que codifican proteínas involucradas en el apareamiento, sinapsis y recombinación de los cromosomas<sup>260</sup>. Así, genes tales como *SPO11*, *MRE11*, *RAD51* y *DMC1* pueden ser causantes de las diferencias en la longitud de los SCs. Igualmente, dos estudios recientes dirigidos al análisis de la recombinación meiótica en ratones han asociado la variación de la longitud media del conjunto de SCs autosómicos por núcleo a diferentes *backgrounds* genéticos. En ambos estudios se analizaron tres cepas diferentes de ratones: 129S4/SvJae, C57BL/6J, y BALB/c<sup>314</sup>, y CAST/EiJ, C3H/HeJ y C57BL/6J<sup>316</sup>. En el primero de dichos estudios observaron que la longitud total de los SCs autosómicos por núcleo en espermatocitos BALB/c era un 9% inferior que en las otras dos cepas. Los autores también observaron que en espermatocitos de la generación F1, híbridos tanto de BALB/c x 129S4/SvJae como de C57BL/6J x BALB/c la longitud total del conjunto de SCs autosómicos por núcleo era inferior a la cepa original (cepas madre). Este hecho indica la existencia de una base genética para la regulación de la longitud de los SCs. Al analizar la expresión

de determinados genes implicados en la arquitectura de los cromosomas meióticos, encontraron que los testículos de ratones BALB/c expresaban hasta seis veces menos ARNm de *Rec8* y cuatro veces menos de proteína REC8. Los autores de este estudio concluyen que el mecanismo que define la longitud SC opera a través de un proceso dependiente de REC8, proteína que participa en el ensamblaje y la función de los elementos axiales.

Las causas genéticas no serían las únicas a considerar. En dos estudios recientes se analizó la longitud media del conjunto de SCs autosómicos para la misma cepa de ratón<sup>314,316</sup>. Los resultados obtenidos fueron discordantes: en el estudio de Vranis y col.<sup>314</sup> la longitud media fue de  $161,9 \pm 18,1 \mu\text{m}$ , mientras que en el estudio de Baier y col.<sup>316</sup> el valor fue superior. Las diferencias se podrían atribuir a variaciones ambientales o a procedimientos experimentales diferentes o a ambos. No obstante, las causas experimentales quedarían descartadas en el caso del estudio de Baier y col. en el que se analizan dos *stocks* de una misma cepa procedentes de dos laboratorios independientes y en el que se obtienen diferencias significativas en cuanto a la longitud de los SCs:  $170,7 \pm 1,9 \mu\text{m}$  frente a  $167,1 \pm 3,3 \mu\text{m}$ <sup>316</sup>. Tal y como afirman los mismos autores del estudio, las diferencias observadas se deban probablemente a que los *stocks* han sido mantenidos en diferentes instalaciones, hecho que pondría de manifiesto la importancia de los factores ambientales sobre la regulación de los procesos meióticos. Estos factores ambientales podrían actuar a nivel genético, provocando la acumulación de mutaciones o polimorfismos diferentes en el ADN de las dos cepas a lo largo de las sucesivas generaciones o bien actuar a nivel epigenético. En este último supuesto, estudios recientes han comprobado cómo diferencias en la alimentación pueden provocar una expresión diferencial de ARNm y otras moléculas capaces de modificar el epigenoma y por tanto de modular la expresión de ciertos genes, entre ellos genes responsables de la espermatogénesis<sup>317-319</sup>. Estas modificaciones epigenéticas, además, pueden ser transmitidas a la descendencia y modular su fenotipo<sup>317,318</sup>.

## Interferencia

Al igual que en estudios previos<sup>71,320</sup>, el presente estudio confirma que el número de *foci* de MLH1 presentes en un SCs determina su distribución a lo largo de dicho SC y que la interferencia es similar para cada uno de ellos (**Tablas 4.6 y 4.7**). Cuando se compara el valor de la interferencia entre las especies analizadas en nuestro estudio, se observa que el valor de interferencia obtenido en humanos (67,5%) es notablemente superior al observado en gatos (51,6%). Este hecho se refleja también en un mayor porcentaje de

*foci* de MLH1 entre los cuales la interferencia es inferior al 20% en gatos (0,6% en humanos y 1,8% en gatos) y en un mayor porcentaje de SCs con mayor número de *foci* de MLH1 (Tabla 5.10). En este último caso el número de SCs con 3 y 4 *foci* de MLH1 en gatos (47,5%) es notablemente mayor que en humanos (35,1%). Además, en los gatos se observó que un 0,1% de los SCs poseía 7 *foci* de MLH1, incluso algunos casos de SCs con 8 *foci* (que no se han incluido en las tablas por ser el porcentaje inferior a 0,1%), mientras que en humanos el número máximo fue de 6 (Tabla 5.10). La presencia de zonas de iniciación intersticial de sinapsis que hemos observado en gatos pero no en humanos, también podría relacionarse con el mayor número de *foci* intersticiales de recombinación y, en consecuencia, con un menor valor de interferencia entre dichos *foci*.

En un estudio reciente, el valor de interferencia observado en otra especie de félido (tigre, *Panthera tigris*) también fue bajo<sup>296</sup>. La sintonía de estos resultados con los obtenidos en el presente estudio para los gatos confirma que el fenómeno de interferencia es menos rígido en los felinos. En el caso del tigre, esta especie presentó una relación DSBs/COs (*foci* RPA/*foci* MLH1) de 3:1, un valor notablemente mayor al de humanos y ratones (de 7:1 a 10:1)<sup>296</sup>. Por lo que respecta al número de *foci* de MLH1 en los SCs, en el tigre se observaron algunos que acumulaban hasta 9 *foci*<sup>296</sup>. Los autores del citado estudio sugirieron que el elevado número de COs no está directamente relacionado con el número inicial de DSBs y que serían procesos *downstream* (a lo largo de las fases más tardías de la profase I) los que determinarían la relación DSBs/COs final.

**Tabla 5.10. Comparativa entre humanos y gatos de la media del análisis del porcentaje de SCs según número de *foci* de MLH1 Porcentaje de SCs con 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 *foci* de MLH1.**

Especie	1 MLH1	2 MLH1	3 MLH1	4 MLH1	5 MLH1	6 MLH1	7 MLH1
Humanos	15,3%	47,4%	26,7%	8,4%	1,9%	0,3%	
Gatos	8,9%	37,4%	31,8%	15,7%	5,2%	0,9%	0,1%

El análisis de la interferencia en organismos eucariotas muestra que ésta actúa sobre un rango muy variable de longitud del ADN, desde unas pocas kilobases en la levadura hasta varias megabases en ratones y humanos<sup>75</sup>. Estudios de fusión de cromosomas y bisección realizados a principios del siglo XXI demostraron que la interferencia en una región cromosómica específica varía dependiendo del tamaño total y la estructura del cromosoma<sup>75</sup>. Estudios posteriores realizados en mamíferos confirman la relación entre



la fuerza de la interferencia y el tamaño de los cromosomas: a mayor tamaño, menor interferencia<sup>6,7,84,321,322</sup>. En nuestro estudio, el análisis del porcentaje de SCs según número de *foci* de MLH1, tanto en humanos como en gatos, confirmó la observación realizada en un estudio previo en humanos<sup>262</sup> de que existe relación directa entre una mayor tasa de recombinación media y un mayor número de SCs con un elevado número de *foci*. Este hecho indicaría que la recombinación se distribuye entre los diferentes cromosomas (SCs) y no únicamente entre cromosomas concretos. Es decir, el incremento de recombinación afecta a todos los cromosomas sin hacer distinciones, es pangénómico, hecho que se podría relacionar con la influencia de factores genéticos relacionados con secuencias de ADN de inicio de recombinación. Además, el hecho de observarse, tanto en gatos como en humanos, SCs con dos *foci* de MLH1 contiguos que presentan una interferencia inferior al 20% indica que los mecanismos responsables de la interferencia están sujetos a un sistema de control flexible y adaptable a circunstancias que pueden variar incluso entre núcleos.

### Localización de los *foci* de MLH1 en mamíferos

Al analizar los resultados obtenidos en estudios de recombinación mediante localización de MLH1 por técnica de inmunocitogenética es importante recordar que la resolución de la misma es de 10 Mb<sup>230</sup>, valor que equivale a unos 0,7  $\mu\text{m}$ . Esto implica que cada una de las regiones cromosómicas descritas en las **Figuras 4.3 y 4.4** se corresponde con varias megabases, a diferencia de los “*hotspots*” y “*coldspots*” descritos en estudios de recombinación por desequilibrio de ligamiento o de “genotipado” que se corresponden con unas pocas kilobases<sup>323</sup>.

Si se comparan los datos de las especies analizadas en el presente estudio, se puede observar un patrón similar en lo que respecta al efecto inhibitor del centrómero y la presencia de una concentración de la recombinación en los extremos distales. En los cromosomas submetacéntricos, esta concentración es más notable en el brazo corto, siendo la distribución en el brazo largo más uniforme. En acrocéntricos se observó también un máximo de recombinación próximo al centrómero y otro en el extremo distal. Estudios citogenéticos en otras especies animales muestran un patrón de distribución similar al descrito en el presente estudio, como es el caso de los peces<sup>324</sup>, pájaros<sup>325–327</sup> y en las diferentes especies de mamíferos analizadas: humanos<sup>71,84</sup>, ratón<sup>5</sup>, musaraña<sup>7</sup>, visón<sup>69</sup> y cerdo<sup>6</sup>.

La supresión de la recombinación en la región pericentromérica se ha interpretado como consecuencia de un efecto inhibitor ejercido por los bloques de heterocromatina centromérica que se sitúan en esta región cromosómica<sup>5</sup>. La supresión de la

recombinación en la zona distal, en cambio, se relaciona con el inicio del apareamiento y sinapsis, que se localiza en dicha región<sup>19,297,328</sup>. Además, la supresión de la recombinación en estas dos regiones se relaciona con efectos adversos sobre la reproducción. En humanos, por ejemplo, se ha demostrado que quiasmas en esas zonas a menudo conducen a errores en la segregación de cromosomas del tipo “no disyunción”<sup>266</sup>. Estos errores favorecen la aparición de gametos portadores de anomalías cromosómicas incompatibles con la generación de un individuo sano.

La única excepción al patrón de distribución generalizado en animales la hallamos en el grupo de los félidos (tigre<sup>296</sup> y gatos del presente estudio) que presentan una menor inhibición sobre la recombinación de la región centromérica y una distribución más uniforme de la recombinación a lo largo de los brazos cromosómicos (**Figura 4.4**). Esta distribución se caracteriza por una menor concentración de la recombinación en regiones subtelo méricas. En la región centromérica, la disminución de la inhibición puede explicarse en base a diferencias en la cantidad de heterocromatina pericentromérica en estas especies. De hecho, se ha observado que, en félidos, tanto la cantidad como la intensidad de tinción de la heterocromatina constitutiva (centromérica, telomérica y secuencias repetitivas) es menor que en otros mamíferos<sup>329</sup> e incluso parece estar ausente en algunas especies de este género<sup>330</sup>. Así, los resultados observados en gato en el presente estudio, junto con un menor efecto inhibitor del centrómero observado también en el tigre<sup>296</sup> concuerdan con la observación citogenética de una disminución el porcentaje de heterocromatina constitutiva en félidos. Por lo que respecta a la menor concentración de la recombinación en regiones subtelo méricas, ésta podría relacionarse con la ausencia de sinapsis en dichas regiones. De hecho, los resultados del estudio inmunocitogenético de colocalización de las proteínas SYCP1 y SYCP3 que hemos realizado, muestran cómo la asinapsis telomérica abarca mayor extensión en gatos que en humanos o en perros (**Figura 4.14**). En consecuencia, la falta de sinapsis no permitiría la recombinación en estas regiones. Finalmente, la distribución más uniforme de la recombinación a lo largo de los brazos cromosómicos podría también relacionarse con las zonas de iniciación intersticial de sinapsis que se han descrito en el presente estudio. Los nódulos de recombinación distribuidos de manera más uniforme podrían asumir una mayor importancia en el mantenimiento de la sinapsis en gatos. Esta mayor importancia se reflejaría en el proceso particular de desinapsis que se ha observado en el presente estudio.

## Correlación entre la longitud de los SCs y el número de *foci* de MLH1

Tanto para humanos como para gatos se observó una relación directa entre la longitud de los SCs y el valor medio de *foci* de MLH1 que presentan, es decir cuanto más largo es el SC más grande es el valor medio de *foci* de MLH1 en dicho SC. Estos resultados concuerdan con los estudios previos tanto en humanos<sup>5,71,84,260,320,331</sup> como en otras especies de mamíferos: ratones<sup>5</sup>, cerdos<sup>6</sup>, muntíacos<sup>70</sup>, musaraña<sup>7</sup>, macaco<sup>294</sup> y tigre<sup>296</sup>. Algunos de dichos estudios, en los cuales se analizaban de forma individual los SCs (FISH), permitieron también determinar que la longitud de los SCs se corresponde más con la longitud genética que con la longitud física<sup>71,84,218,260</sup>.

Este hecho es consecuencia, en parte, de la naturaleza de las medidas: la distancia genética deriva de la recombinación meiótica (COs) y su medición está basada en estudios de ligamiento, mientras que la distancia física hace referencia a la distancia en nucleótidos entre marcadores y su medición está basada en secuenciación y otras técnicas asociadas. Entre las dos medidas suele haber una relación 1:1, pero existen excepciones ya que, como se ha demostrado en el presente estudio y en estudios previos, tanto a gran (supresión en centrómero y abundancia en telómeros) como a pequeña escala (*hotspots*), la tasa de recombinación no es constante a lo largo de los cromosomas.

A modo de resumen, el análisis de la recombinación meiótica que se ha realizado en este estudio muestra que la variabilidad interindividual e intraindividual de los aspectos cuantitativos y cualitativos de la meiosis son sorprendentes en base al concepto que se tiene de la recombinación como proceso altamente regulado que garantiza una segregación correcta de los cromosomas homólogos, una correcta meiosis y, en última instancia, la evolución y la supervivencia de la especie. De ambos tipos de variabilidad, la intraindividual resulta tal vez más difícil de explicar, puesto que la interindividual podría justificarse en base a diferencias genéticas o diferencias ambientales, tal y como se ha comentado anteriormente. No obstante, estos dos factores no pueden ser los responsables únicos de las diferencias intraindividuales. Descartando las posibles limitaciones de la técnica, la explicación tal vez radique en una visión de la recombinación como un proceso caracterizado por productos intermedios metaestables y reversibles que se hallan sometidos a una regulación, positiva y negativa, que permite una flexibilidad en el proceso de obtención de los productos de recombinación (nCOs y COs), es decir, una capacidad de adaptación y de recuperación a partir de productos intermedios no deseados potencialmente dañinos para la célula. Estos aspectos definen

la solidez de un sistema bien diseñado que tiene que ser capaz de generar diversidad y a la vez mantener un genoma estable<sup>30</sup>.

### 5.2.2. Influencia de *PRDM9* y *RNF212* sobre la tasa de recombinación

#### Influencia de *PRDM9*

Los resultados obtenidos en este estudio, tanto en humanos como en gatos, confirman una relación compleja entre los genotipos de *PRDM9* y la tasa de recombinación. Esta relación parece estar determinada por la longitud de los alelos<sup>81</sup>, por el estado de homocigosidad o heterocigosidad de los mismos y por efectos de dominancia<sup>82,256,257,332</sup>.

Así por ejemplo, tanto en humanos como en gatos, se observó una influencia de la longitud de los alelos y el estado de heterocigosidad sobre la tasa de recombinación. En humanos, el individuo con genotipo A/E (13/9 ZFCR) presentó la tasa de recombinación más baja, seguido de los individuos con genotipo A/A o A/tipo-A (13/13 ZFCR) y el individuo con genotipo A/C (13/14 ZFCR) (**Tabla 4.24**). En el caso de los gatos, al considerar sólo los individuos homocigotos para alelos de la misma longitud se observó un aumento gradual de la tasa de recombinación desde el más corto hasta el más largo: c/c, b/b y a/a (**Tabla 4.26**). Los genotipos heterocigotos b/c y a/b no se situaron dentro del aumento gradual determinado exclusivamente por la longitud sino que presentaron una tasa de recombinación superior al homocigoto de mayor longitud. Este hecho concordaría con el efecto aditivo parcial de alelos en estado de heterocigosidad observado por Baker y col. en su estudio<sup>255</sup>. En el caso de los humanos no se pudo constatar este efecto aditivo al no contar el presente estudio con individuos homocigotos E/E y C/C.

En un artículo reciente en ratones, Capilla y col. también relacionaron alelos más cortos (menor número de ZFCR) con una menor tasa de recombinación. Los autores consideraron dos tipos de alelos: 10 (10 ZFCR) y N (11 ó 12 ZFCR) y tres grupos: ratones con alelos de 10 ZFCR (10/10), ratones con un alelo N (10/N) y ratones con dos alelos N (N/N). Al comparar la frecuencia de CO (número medio de *foci* de MLH1 *foci*/núcleo) observaron que los individuos homocigotos para alelos de 10 ZFCR mostraban de media un número de COs significativamente menor que los ratones 10/N y N/N<sup>81</sup>. Respecto al efecto de la longitud sobre el nivel de activación de los *hotspots*, es decir al inicio de la recombinación, los resultados son diversos. En un estudio realizado en ratones homocigotos para alelos de 9 y 13 ZFCR (dos líneas congénicas que sólo se diferenciaban en los alelos de *PRDM9*), los autores de dicho estudio observaron que el número de *hotspots* activados fue similar en ambas cepas<sup>82</sup>. No obstante, en otro estudio realizado con dos cepas diferentes de ratones (homocigotas

para un alelo de 11 y 12 ZFCR) el número de *hotspots* activado sí fue diferente: 18.849 y 28.475 respectivamente<sup>255</sup>. Estos resultados impiden determinar con claridad si la influencia de *PRDM9* sobre la recombinación homóloga tiene ya lugar en la activación de los *hotspots* o durante la resolución de los DSBs en COs. Otra posible explicación es la influencia de otros genes sobre el proceso. Esta idea vendría corroborada por el hecho de que en el primer estudio se trata de ratones congénicos<sup>82</sup> mientras que en el segundo no<sup>255</sup>.

Por lo que respecta al efecto de la heterozigosidad de *PRDM9* sobre la tasa de recombinación, estudios previos han observado un efecto de dominancia y un ligero efecto aditivo<sup>82,255</sup>. Dichos estudios detectaron un efecto de dominancia del alelo de mayor longitud sobre el de menor longitud. Brick y col. observaron que por lo que respecta a los *hotspots* activados en la generación F1 (heterozigota para los alelos descritos en el párrafo anterior), aproximadamente el 75% de los *hotspots* eran regiones activadas por el alelo de mayor longitud, mientras que el 25% restante eran regiones activadas por el otro alelo. También en humanos se ha observado evidencia de competición entre alelos de *PRDM9*<sup>101,102,256,257</sup>. En uno de estos estudios se analizó la tasa de recombinación en varios *hotspots* en hombres portadores de diversas combinaciones de alelos tipo A y tipo C. Los autores de dicho estudio observaron que los hombres homocigotos o heterocigotos para el alelo C tenían tasas de recombinación similares en *hotspots* C, pero las tasas de recombinación en *hotspots* A estaban reducidas en hombres heterocigotos *PRDM9A/C* al compararlos con hombres homocigotos *PRDM9A/A*. A escala global este hecho se reflejó en que sólo un 43% de los *hotspots* en el individuo AC coincidían con los *hotspots* definidos por el alelo A, siendo muy posible que el 57% restante estuviera definido por el alelo C<sup>257</sup>.

El mecanismo subyacente a la dominancia podría explicarse en base al descubrimiento de Baker y col. sobre la formación de heterómeros de *PRDM9 in vitro*<sup>255</sup>. Según la hipótesis propuesta por estos autores, en individuos heterocigotos, los heterómeros de *PRDM9* se dirigen preferentemente hacia los *hotspots* de la variante dominante. De este modo, la recombinación en los *hotspots* promovidos por alelo no dominante se vería reducida<sup>255</sup>. Otras posibles explicaciones serían diferencias en los niveles de expresión de alelos diferentes de *PRDM9*, la accesibilidad de la cromatina, competición entre motivos adyacentes, cofactores o marcas epigenéticas adicionales<sup>256,333–335</sup>.

### Influencia de *RNF212*

Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron una asociación significativa del SNP rs3796619 (situado en el gen *RNF212*) con la tasa de

recombinación. Dicho SNP fue identificado por Kong y col. como el SNP que presentó la asociación más fuerte con la tasa de recombinación en hombres, resultando cada copia del alelo T en una disminución de la tasa de recombinación de 70,7 cM, en comparación con el alelo C<sup>87</sup>. En los individuos de este estudio cada copia del alelo T, en comparación con el alelo C, supuso una disminución media de la tasa de recombinación de 132,5 cM.

Este valor es casi dos veces superior al obtenido en el estudio de Kong y col. de 70,7 cM. Uno de los posibles motivos de esta diferencia es el empleo de diferentes técnicas para analizar la relación. En el presente estudio se han utilizado técnicas de ICC mientras que el estudio de Kong y col. se realizó mediante análisis de desequilibrio de ligamiento. Los estudios directos de la recombinación mediante conteo de MLH1, entre los que se encuentra la ICC, permiten analizar un número elevado de espermatozoides. Este hecho aumenta el poder estadístico y la capacidad de detectar incluso variaciones pequeñas entre individuos. Por el contrario, los estudios indirectos, entre los que se halla el análisis de desequilibrio de ligamiento, pueden no ser tan precisos. Hasta la fecha, la mayoría de estudios de la variación de la tasa de recombinación han medido las tasas mediante patrones de herencia de marcadores en pedigrís humanos<sup>87,117,336</sup> o en cruces experimentales<sup>337-339</sup>. Las tasas de recombinación estimadas mediante estos métodos pueden generar cierta incertidumbre, debido a la segregación independiente de las cromátidas recombinantes durante la meiosis<sup>322</sup> y al número limitado de transmisiones meióticas que se pueden analizar por individuo.

### Influencia conjunta de *PRDM9* y *RNF212*

Tal y como se ha determinado en el presente estudio y en estudios previos, *PRDM9* y *RNF212* son proteínas que influyen en la tasa de recombinación. Según los conocimientos acumulados hasta el momento, se sabe que actúan en dos pasos diferentes y, hasta cierto punto, consecutivos de la recombinación: *PRDM9* determina la activación de los *hotspots* DSBs y *RNF212* influye sobre la resolución de los DSBs hacia COs.

El análisis efectuado en el presente estudio sobre la influencia conjunta de *PRDM9* y *RNF212* en la población estudiada permitió determinar que *PRDM9* y *RNF212* presentan efectos independientes sobre la **recombinación meiótica** (número de *foci* de MLH1) (**Tabla 4.29**). Es decir, la actuación de *RNF212* sobre la resolución hacia COs es independiente del número de DSBs generados por *PRDM9*. Este hecho concordaría con la hipótesis del estudio de Segura y col. que dice que un elevado número de COs no está necesariamente relacionado con un número inicial elevado de DSBs y que

serían procesos *downstream* (a lo largo de las fases más tardías de la profase I) los que determinarían la relación DSBs/COs final<sup>296</sup>. En este sentido, nuestros resultados y los del citado estudio no concuerdan con la propuesta realizada por otros grupos de investigación según los cuales la ventana temporal en la cual se establece la variación en la tasa de recombinación sucede antes de la formación de los DSBs<sup>316,340</sup>. Según Baier y col.<sup>316</sup>, la variación en la frecuencia de COs se debe exclusivamente a la arquitectura de la cromatina, es decir, al tamaño de los loops de cromatina y, en consecuencia, a la longitud de los SCs. Esta hipótesis es discutible, pues si se interpreta la recombinación como un proceso caracterizado por productos intermedios metaestables y reversibles sometidos a una regulación positiva y negativa que permite una flexibilidad en el resultado (nCOs y COs), resulta difícil creer que la determinación definitiva de los COs tenga lugar antes de la formación de los DSBs, y que eventos a lo largo del proceso como pueden ser, por ejemplo, la formación de los DSBs, el procesamiento de los intermediarios de la recombinación (p. ej. RNF212) y la resolución de los intermediarios (p. ej. MLH1 y MLH3), tengan una importancia menor. En su artículo sobre el análisis de las causas del dimorfismo sexual de la recombinación en la mayoría de especies de mamíferos, Gruhn y col.<sup>340</sup> corroboraron, al igual que otros estudios, que los niveles de recombinación son mayores en hembras que en machos y que la localización de los COs también es diferente. Los autores demostraron que estas diferencias ya se observan en la formación de los DSBs, por lo que concluyen que se establecen antes de la misma. Al igual que Baier atribuyen estas diferencias a la diferente longitud del SC y los loops de ADN.

Como se ha demostrado en este y otros estudios, si bien la influencia de ambos genes sobre la tasa de recombinación es patente, la magnitud de los efectos atribuibles a los mismos y los otros dos *loci* descritos en la literatura<sup>83,86</sup> es insuficiente para explicar las variaciones interindividuales de los niveles de recombinación encontrados en varias especies de mamíferos. Por ello cabe esperar que el número de genes involucrados en la determinación de la tasa de recombinación y otras variables meióticas sea mucho mayor. Así, la interacción de las diferentes variantes de cada gen que posea un individuo, unido a la influencia del medio ambiente, será la que determine finalmente los valores característicos de cada individuo. En esta línea, la variación observada en la recombinación meiótica se asemejaría a la variación observada en otros rasgos fenotípicos, como por ejemplo la estatura humana, que se estima que depende en un 20% del medio ambiente y en un 80% de la dotación genética<sup>341,342</sup>. Por lo que respecta a la influencia genética, en un artículo del año 2014 realizado sobre una muestra de 253.288 individuos, los autores detectaron 697 variantes que en su totalidad explicaban



un 20% de la heredabilidad de la estatura<sup>343</sup>. Estos datos confirman la complejidad genética que se esconde detrás de un rasgo fenotípico como es la estatura y que podría también subyacer a los diferentes procesos meióticos.

Por lo que respecta a los factores genéticos, se ha demostrado que el número inicial de DSBs viene determinado mayoritariamente por PRDM9 (cita de Paigen “*en base a los trabajos de Petukhova y Camerini-Otero se sabe que, a excepción de la región PAR, todos los DSBs ocurren en hotspots marcados por PRDM9*”<sup>344</sup>). No obstante, según un artículo reciente de Baker y col. realizado sobre la cepa de ratón B6, se estima que durante la meiosis de este organismo PRDM9 actúa aproximadamente sobre unas 5.000 regiones del ADN<sup>112</sup>. Esta estimación de las posiciones activadas por PRDM9 es 15 veces mayor que el número estimado de DSBs por célula meiótica en base a estudios de ICC<sup>77</sup>. Todo ello plantea la cuestión de cuáles son los factores adicionales que, transforman las zonas de unión de PRDM9 en DSBs. Además, Pratto y col. observaron, al comparar mapas de iniciación de recombinación entre individuos que compartían los mismos alelos de *PRDM9*, que la frecuencia de la iniciación de la recombinación variaba entre los mismos a nivel de los *hotspots*. Ya que los autores pudieron explicar sólo la mitad de la variación de la intensidad de los *hotspots* en base a cambios de secuencia en las zonas de unión de PRDM9 cabe esperar que el estado de la cromatina y otros factores influyan también sobre la tasa de recombinación<sup>257</sup>.

En lo que respecta a las influencias ambientales sobre la tasa de recombinación, la información disponible es todavía muy escasa. En un estudio reciente, Vrooman y col. describen cómo la exposición a estrógenos altera las espermatogonias en los testículos en desarrollo, reduciendo permanentemente los niveles de recombinación en adultos<sup>311</sup>.

### 5.3. PROCESOS SINÁPTICOS EN MAMÍFEROS

#### 5.3.1 Anomalías sinápticas en autosomas

En lo que respecta a la incidencia de anomalías sinápticas en humanos, ésta ya ha sido discutida en relación a su afectación en la fertilidad del individuo.

Por lo que respecta a los gatos, los resultados obtenidos indicaron cierta variabilidad interindividual en la población estudiada. Las anomalías sinápticas (*splits* y *gaps*) fueron poco frecuentes en los gatos. Así, tan sólo sólo se observaron en 7 de los 21 individuos analizados (incidencia  $\leq 4\%$ ). En el caso de los perros, la incidencia de anomalías sinápticas tipo gap o splits fue nula.



La baja frecuencia de este tipo de anomalías sinápticas en gatos se podría relacionar con el avance de la sinapsis observado en esta especie. A diferencia de lo descrito para humanos<sup>19</sup>, en gatos sí se observaron zonas de iniciación intersticiales en todos los tipos de cromosomas. Estas regiones, según lo postulado por otros artículos<sup>345,346</sup>, se corresponderían con zonas recombinación, que aportarían una mayor precisión al proceso sináptico. En conjunto, esta mayor densidad de puntos de iniciación de la sinapsis podría contribuir a una menor incidencia de *splits* y *gaps*.

La presencia de MSUC fue mayor en gatos que en humanos y perros. En este caso, un 66,67% de los individuos analizados presentó núcleos en paquiteno en los cuales uno o más bivalentes estaban afectados por este fenómeno de inactivación. Hasta el momento, el mecanismo de MSUC se ha observado en especies de laboratorio con algún tipo de anomalía cromosómica o en humanos con cariotipo alterado por la presencia de reorganizaciones cromosómicas o aneuploidías (**Tabla 5.11**). Según alcanza nuestro conocimiento, éste es el primer estudio en el que se describe este fenómeno en gatos de una población salvaje (n=21) y también en un individuo control humano sin problemas aparentes de fertilidad (HC1) y en uno de los perros analizados. Si bien no se analizó el cariotipo de ninguno de los participantes del estudio, cabe esperar que fuera normal en todos los casos ya que, a pesar de la presencia de MSUC en un porcentaje variable de las células analizadas, no se observaron figuras meióticas concordantes con la presencia de una reorganización o anomalía cromosómica, excepto en dos núcleos, uno en FC9 y otro en FC23, que presentaron un cuadrivalente (**Figura 4.10**).

Por lo que respecta a los tres individuos más afectados en gatos (FC10, FC14 y FC21), no se determinó ninguna característica común a ellos (edad, fenotipo) y diferente al resto de los individuos de la muestra que pudiera explicar una mayor incidencia de MSUC.

**Tabla 5.11. MSUC**

Artículo	Organismo	Genotipo
Baarends y col. <sup>179</sup>	Ratón	T(1;13)70H/T(1;13)1Wa (T/T'). Modelo de ratón con dos translocaciones diferentes pero casi idénticas entre los cromosomas 1 y 13 que causa problemas de apareamiento durante la profase meiótica
Turner y col. <sup>180</sup>	Ratón	T(X;16)16H. Modelo ratón con translocación recíproca X-autosoma, que produce un número de asociaciones cromosómicas con grados variables de asinapsis
Turner y col. <sup>176</sup>	Ratón	T(X;16)16H
Ferguson y col. <sup>271</sup>	Humano	Portador heterocigoto de una translocación recíproca t(8;13)(q21;p11)
Sciurano y col. <sup>347</sup>	Humano	Portador de una translocación robertsoniana t(13;14) , portador de una translocación (Y;15)(q11.1;q21). y portador de una translocación t(9;14)(p11;q11)
Homolka y col. <sup>348</sup>	Ratón	T(16;17)43H
Mahadevaiah y col. <sup>193</sup>	Ratón	Ratones <i>knockout</i> para <i>Dnmt3l</i> , <i>Msh5</i> y <i>Dmc1</i>
Kouznetsova y col. <sup>192</sup>	Ratón	Ratones <i>knockout</i> <i>Sycp1</i> , <i>Sycp3</i> y <i>Smc1β</i>
García-Cruz y col. <sup>169</sup>	Humano	47,XX+21
Naumova y col. <sup>349</sup>	Ratón	Cepa con translocación robertsoniana Rb(8.12) y cepa con tres translocaciones robertsonianas Rb(1.3), Rb(8.12) y Rb(9.14)

Las características que definen el MSUC observado en el presente estudio son SCs que presentan una mayor intensidad de fluorescencia de la proteína SYCP3 en los elementos laterales y una escasez o ausencia de SYCP1, junto con presencia de la proteína γH2AX en la región afectada. Estas características son también típicas del cuerpo sexual de los gatos en la fase tardía del paquiteno. Además, la ausencia de un foco de MLH1 en las regiones afectadas indicó la ausencia de recombinación en las mismas. De momento, no hay explicación aparente para la elevada frecuencia de MSUC en gatos en comparación con los otros mamíferos analizados. La diferencia observada en gatos y humanos respecto a la frecuencia de MSUC sugiere que el mecanismo de control de asinapsis meiótica es diferente en estas dos especies. También podría tratarse de mecanismos con bases similares que, por razones desconocidas, se realizara más lentamente en gatos que en humanos. Finalmente, también cabe considerar la posibilidad que el MSUC en gatos sea un fenómeno redundante, sin afectación biológica, consecuencia del exceso de proteína SYCP3 observada en los meiocitos de gatos.

### 5.3.2. Características de la sinapsis en autosomas

#### Presencia de SYCP1 en regiones asinapsadas

En el presente estudio se ha detectado señal de SYCP1 en un 76,7% de las regiones asinapsadas analizadas. En el 40% de ellas, la señal de SYCP1 colocalizaba completamente con la señal de SYCP3. En el 36,7% restante, la señal colocalizaba de manera fragmentaria y parcial (**Figura 4.12**).

Hasta el presente la proteína SYCP1 se ha considerado exclusiva de las regiones sinapsadas. No obstante, ya en uno de los primeros estudios meióticos que utilizó la técnica de ICG se observó su presencia en las regiones autosómicas no sinapsadas<sup>350</sup> e incluso en las zonas no sinapsadas del cuerpo sexual de algunas especies de mamíferos<sup>170,171</sup>. La presencia de SYCP1 en los elementos laterales de los cromosomas sexuales y la temporalidad que muestra dicha presencia podría sugerir un mecanismo sináptico en el que la unión de SYCP1 se realiza por defecto, es decir, independientemente de la presencia de dos elementos axiales homólogos. Así, tras la formación de los elementos axiales se produciría la unión del extremo C terminal de la proteína SYCP1 a dichos elementos. La sinapsis se iniciaría gracias a la interacción de los extremos N terminales de la proteína SYCP1 situada en elementos laterales opuestos y a la estabilización de dichas uniones mediante la unión de proteínas como CESC1 y SYCE1<sup>142</sup>. En el caso particular del cuerpo sexual, al no producirse la unión de los elementos axiales, la proteína SYCP1 se separaría del elemento lateral a medida que avanzase la profase. En el caso de las asinapsis localizadas en bivalentes autosómicos, la presencia de SYCP1 en dichas regiones podría interpretarse bien como un fracaso en el intento de unión de los extremos N-terminal de la proteína SYCP1, bien como una inestabilidad en dicha unión. En éste último caso, el resultado final sería la separación prematura de los elementos laterales. Dado que en la mayoría de las asinapsis detectadas no se halló señal de  $\gamma$ H2AX, el escenario más plausible sería éste último, una separación prematura de los elementos laterales tras finalizar la reparación de los DSBs.

#### Ausencia de SYCP1 en las regiones teloméricas

En el presente estudio se ha observado una ausencia de SYCP1 en las regiones teloméricas en humanos, gatos y perros. Esta observación podría concordar con el modelo de avance de la sinapsis descrito por Brown y col.<sup>19</sup>. Estos autores determinaron que la sinapsis procedía desde las regiones subtelo méricas y no desde las regiones teloméricas propiamente dichas. Observaron además, que la distancia del punto de

inicio de la sinapsis respecto al telómero era diferente según el bivalente analizado. En base a estas observaciones, los autores sugirieron dos posibles hipótesis: la existencia de secuencias específicas de inicio de sinapsis para cada cromosoma, situadas a diferentes distancias de los telómeros, o la existencia de una preferencia por la región subteloamérica, posiblemente atribuible a modificaciones en la cromatina que la hacen más accesible sin que exista la necesidad de secuencias específicas.

Además, la ausencia de sinapsis en la zona telomérica se podría relacionar de manera directa con la ausencia de recombinación en dicha región. Dicha supresión, al igual que lo que sucede en la supresión detectada en la región pericentromérica, se asocia a efectos de selección natural, ya que quiasmas en esas zonas a menudo conducen a errores en la segregación de cromosomas del tipo no disyunción<sup>266</sup>. Esta supresión en la zona telomérica se refuerza si en dicha zona se anula la posibilidad de sinapsis por ausencia de SYCP1.

### El proceso de sinapsis y desinapsis en los gatos

Los resultados obtenidos en el análisis de la sinapsis en gatos indicaron que las regiones terminales juegan un papel crucial en la iniciación de la sinapsis en gatos macho tanto para cromosomas no acrocéntricos como acrocéntricos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Brown y col. para el avance de la sinapsis en humanos<sup>19</sup>. No obstante, a diferencia de lo descrito en humanos, en gatos sí se observaron zonas de iniciación intersticiales en todos los tipos de cromosomas que podrían estar relacionadas con regiones de inicio de recombinación.

Concretamente, los cromosomas metacéntricos y submetacéntricos presentan dos regiones típicas para la iniciación de la sinapsis que se localizan en los extremos distales de ambos brazos. A partir de ellas, los elementos laterales extienden su sinapsis en dirección centromérica. En los cromosomas submetacéntricos la formación del SC en el brazo corto es posterior a la sinapsis del brazo largo. En el caso de los cromosomas acrocéntricos se observa que la sinapsis se inicia en la zona distal del brazo largo. En la mitad de los casos se observó además una región intersticial de inicio de sinapsis.

El análisis de proteínas del SCs permitió, además, describir características sinápticas particulares de los gatos. Una de estas características fue la presencia de un agregado de SYCP3, visible desde leptoteno hasta el inicio del paquiteno. En este caso, nuestra hipótesis es que su presencia indicaría la existencia de un mecanismo de depósito de proteína SYCP3, sintetizada desde el inicio de leptoteno, que se mantendría durante la meiosis para su utilización en determinados casos. Este reservorio podría ser necesario

para establecer y mantener la estructura del cuerpo sexual en gatos, el cual muestra un engrosamiento característico de los elementos laterales de los cromosomas sexuales a medida que avanza la meiosis I. También podría estar relacionado con el mecanismo de MSUC descrito anteriormente ([Apartado 5.3.1](#)). En sintonía con esta hipótesis de reservorio inicial, que se necesita para fases más tardías del paquiteno, la presencia de este agregado fue especialmente notable en el individuo FC10, de cuatro meses, cuyos núcleos se hallaban mayoritariamente en la fase inicial del paquiteno (primer ciclo de espermatogénesis). La presencia de estos agregados se ha observado también en espermatoцитos de otras especies<sup>127,297,351,352</sup> y en oocitos de humanos<sup>353</sup> y vacas<sup>354</sup>. En todos estos casos, a excepción de los oocitos en humanos, la presencia se limitó a fases muy iniciales (preleptoteno, leptoteno). En el caso de los oocitos en humanos, se llegó a observar hasta el estadio de paquiteno.

Otra de las características descritas fue la presencia de protuberancias esféricas en las regiones teloméricas, en las cuales sólo se observó la proteína SYCP3. Aunque esta característica se observa también en humanos y perros, en gatos es más pronunciada, indicando que, probablemente, la desinapsis telomérica abarca una región mayor en gatos que en humanos o perros. Este hecho podría explicar el diferente comportamiento a nivel de recombinación en las regiones teloméricas y subteloméricas observado entre humanos y gatos, donde el pico de recombinación del extremo del cromosoma se sitúa más cerca del telómero en humanos que en gatos.

Por lo que respecta a la desinapsis en gatos, hasta nuestro conocimiento es la única especie que inicia este proceso antes de la finalización de la etapa de paquiteno. En el presente estudio, 10 de los 21 individuos analizados presentaban este proceso desináptico característico. El hecho de no observarse esta fase en todos los individuos podría deberse a la zona testicular analizada.

En las otras especies analizadas hasta el momento, incluido humanos, la desinapsis se asocia con el inicio del diploteno que se caracteriza por una rápida desintegración de los SCs. La causa y el motivo de estas diferencias son desconocidos. Se requerirán estudios adicionales de los procesos de recombinación y sinapsis para determinarlos.

De manera general, se puede apreciar el proceso de desinapsis como el proceso inverso de la sinapsis, es decir, aquellas regiones que sinapsaron primero son generalmente las primeras en separarse. Una de las características observadas en el presente estudio es que la presencia de regiones asinapsadas en núcleos en estadio intermedio-final de paquiteno no va acompañada por depósitos de  $\gamma$ H2AX. Trabajos realizados por Turner y col. han demostrado que, en ratones, la señal de  $\gamma$ H2AX que se observa en el cuerpo

sexual, y también en las regiones en asinapsis, se corresponde con una nueva oleada de fosforilación y no con el mantenimiento de dicha señal desde el leptoteno<sup>180</sup>. Las regiones de desinapsis detectadas en el paquiteno de gatos, por lo tanto, se corresponden seguramente con regiones donde la reparación de los DSBs ha sido ya realizada y que, por razones que desconocemos, inician la separación de los homólogos antes de la finalización de paquiteno. Para afirmar que esta desinapsis ocurre durante el estadio de paquiteno y que no se trata de núcleos en estadio de diploteno nos basamos en las siguientes observaciones:

1. No se observa una gran disminución de *foci* de MLH1 indicativa de la finalización del proceso de recombinación. Además, la elevada presencia de un *foci* de MLH1 en uno o ambos extremos de la región desinapsada parece indicar que los *foci* de MLH1 limitan el proceso de separación, actuando como garante para evitar la separación precoz de los cromosomas homólogos. El mantenimiento de los *foci* de MLH1 más allá de la etapa de paquiteno tan sólo se ha observado en modelo ratón durante la meiosis femenina<sup>5</sup>. Aunque sería posible que la meiosis masculina en gatos tuviese un comportamiento similar, la frecuencia con la que se observa el fenómeno de desinapsis es muy elevada en todos los individuos que la presentaron. Dado que, conforme con lo observado hasta el momento en la espermatogénesis de mamíferos, la fase de diploteno es muy breve, la elevada presencia de núcleos que presentaron bivalentes en desinapsis indicaría que muy probablemente este fenómeno no esté relacionado con dicha fase.
2. Los cromosomas sexuales todavía se visualizaban como cuerpo sexual (**Figura 4.32**). En todas las especies de mamíferos analizadas hasta el momento, el cuerpo sexual tan sólo es visible durante la etapa de paquiteno<sup>355,356</sup>.
3. A diferencia de la señal que se observa durante el estadio de diploteno, la señal de SYCP3 de los elementos laterales no se encontraba fragmentada<sup>357,358</sup>, sino continua. Este hecho indicaría que los elementos laterales no han iniciado aún su desestructuración.

### Sinapsis en perros

La dinámica temporal y espacial de las proteínas SYCP1, SYCP3,  $\gamma$ H2AX y MLH1 fue similar a la descrita en la literatura para *H. sapiens* y otros mamíferos y no se observaron rasgos característicos o únicos en esta especie durante el proceso sináptico de los cromosomas autosómicos.

### 5.3.4. La recombinación y sinapsis del cuerpo sexual en mamíferos

#### Morfología del cuerpo sexual

El análisis de la morfología del cuerpo sexual en perros concuerda con observaciones anteriores de diversos autores<sup>170</sup>. Los cromosomas X e Y adoptan una estructura lineal que no varía a lo largo del paquiteno (**Figura 4.33**). En gatos, en cambio, la morfología del cuerpo sexual sí varía a lo largo del paquiteno. Las conformaciones que adopta son hasta cierto punto comparables a las típicas del cuerpo sexual de los humanos y, tal y como sucede en nuestra especie, pueden utilizarse como marcadores del estadio de paquiteno en que se halla el núcleo analizado. Uno de los aspectos diferenciales del cuerpo sexual en gatos es que, en ocasiones, los SCs de los cromosomas sexuales aparecen separados en la fase final del paquiteno, con un *foci* de MLH1 en el espacio de separación entre los cromosomas X e Y. Hasta el momento, es la única especie de mamífero analizada en la que se ha detectado este fenómeno. La presencia de este *foci*, sin que exista unión o contacto aparente con las proteínas de los SCs, sugiere que otras proteínas diferentes a las detectadas en este estudio serían responsables del mantenimiento de este *foci* de recombinación y también de evitar una separación prematura de los cromosomas sexuales.

#### Presencia de SYCP1 en el cuerpo sexual XY

En las tres especies de mamífero analizadas en el presente estudio se halló presencia de proteína SYCP1 en el cuerpo sexual, tanto en la región PAR como en otras regiones no homólogas de los cromosomas sexuales. La presencia de SYCP1 fuera de la región PAR del cuerpo sexual ha sido descrita en marsupiales<sup>359</sup>, ratones<sup>168</sup> y perros<sup>170</sup>. No obstante, en humanos sólo se había observado en la región PAR hasta el presente estudio<sup>168,171</sup>.

En humanos, la cantidad de dicha proteína no fue igual en los dos individuos analizados, aunque en ambos se observó la misma tendencia: mayor presencia de SYCP1 en el estadio inicial y disminución gradual hacia el paquiteno tardío. Según observaciones realizadas en el individuo HC1, dicha tendencia podría estar asociada a la presencia de un foco de MLH1, el cual actuaría como elemento estabilizador de los filamentos de SYCP1. En dicho individuo, más de un 90% de los meiocitos en paquiteno inicial con un foco de MLH1 presentaron una señal de SYCP1, mientras que en aquellos sin foco de MLH1 dicha señal se observó en menos de un 30% de las células. En los subestadios posteriores la presencia de una señal de SYCP1 fue similar en las células sin y con foco de MLH1 en el cuerpo sexual. El tamaño reducido de la muestra de biopsia del individuo

HC2 no permitió realizar una segunda ICG de marcaje de dicha proteína y por lo tanto no se pudo comprobar esta hipótesis.

El análisis realizado en gato mostró una presencia y distribución de proteína SYCP1 similar a la descrita en humanos.

En el caso del análisis en perro, todos los paquitenos analizados presentaron SYCP1 en el cuerpo sexual, si bien en cantidades variables. La morfología siempre lineal del cuerpo sexual en perros no permite distinguir entre diferentes subestadios de paquitenos, pero cabe esperar, por los resultados obtenidos en gatos y humanos, que los núcleos con mayor cantidad de SYCP1 se correspondan con paquitenos iniciales y se produzca igualmente una disminución gradual de la cantidad de esta proteína hacia el paquitenos tardío. Un estudio reciente en perros ha observado también la presencia transitoria de SYCP1 en el cuerpo sexual en regiones diferentes a la PAR<sup>170</sup>. No obstante, en este estudio la proteína SYCP1 no llega nunca a ocupar la totalidad de los ejes cromosómicos, tal y como hemos observado en algunos meiocitos del presente estudio. Federici y col. atribuyeron la señal de SYCP1 a un proceso de autosinapsis del cromosoma X, necesario para la reparación de los DSBs localizados en este cromosoma. Observaron también que la presencia de dicha proteína se asociaba a la pérdida de marcadores de reparación de DSBs, tales como la proteína  $\gamma$ H2AX. Ante esta observación, los autores hipotetizaron que la reparación de los DSBs se realizaría más rápidamente en estas zonas que en el resto del cromosoma X<sup>170</sup>.

Aunque la hipótesis planteada por Federici y col. es plausible, los resultados obtenidos en las tres especies analizadas en el presente estudio también podrían responder a un proceso de polimerización por defecto de la proteína SYCP1, de un modo similar a lo planteado anteriormente para las regiones no sinapsadas de los autosomas.

### MLH1 en el cuerpo sexual

En ninguna de las especies de este estudio (humanos, gatos, perros) se observó una asociación entre el número de espermatoцитos con un foco de MLH1 en el cuerpo sexual y la tasa de recombinación general del individuo. Esta observación coincide con la realizada en humanos<sup>85</sup> y cerdos<sup>6</sup> y no coincide con la realizada en muntíacos<sup>70</sup> y otro estudio con humanos<sup>149</sup>. En este último estudio se analizaron un total de 17 individuos (12 pacientes infértiles y 5 controles) y sí se determinó una relación entre ambas variables pues observaron una tasa de recombinación significativamente mayor en los núcleos con un foco de MLH1 en el par XY. Los autores de dicho estudio sugirieron que la frecuencia de un foco de MLH1 en el par XY podría ser un indicador de la frecuencia



de recombinación general y por lo tanto del éxito meiótico. Los datos obtenidos en este estudio no permitieron llegar a esta conclusión, tanto por la ausencia de dicha relación, como también por el caso de bloqueo meiótico (i13) que presenta un valor medio de MLH1 en XY dentro del rango normal. Teniendo en cuenta las divergencias observadas en estos tres estudios, se necesitan más datos para determinar si existe dicha relación y en tal caso su posible influencia sobre el éxito meiótico.

Por lo que se refiere a la temporalidad, en este estudio la frecuencia con la que se detectó un foco de MLH1 en el cuerpo sexual en humanos se mantuvo relativamente constante a lo largo del paquiteno y no se observó una diferencia significativa entre los estadios (Tabla 4.19). Estos resultados concuerdan con los descritos en dos estudios previos<sup>71,149</sup>. Sin embargo, el resultado observado en gatos (disminución gradual a lo largo de paquiteno) difiere del descrito para humanos y también es diferente al de los ratones, en los cuales el foco de MLH1 en el cuerpo sexual aparece en el paquiteno inicial y desaparece en el paquiteno medio<sup>258</sup>. Estas observaciones podrían indicar que en el caso de los gatos y especialmente en el de los ratones, la recombinación en los cromosomas sexuales se resuelva antes que en los autosomas, pero no en los humanos.

## 5.4 ANÁLISIS POBLACIONAL DE *PRDM9*

### 5.4.1. Diversidad alélica de *PRDM9*

En el presente estudio se identificaron 13 nuevos alelos de *PRDM9* y siete nuevos ZFCR. Estos nuevos alelos se suman a los ya descritos en la literatura<sup>29,101–105,246,254</sup>. Cuatro de los nuevos ZFCRT (spm1, spm3, spm6, spm5) y cuatro de los nuevos alelos (L39, L44, L50, L51) han sido descritos como mutantes *de novo* en un trabajo de Jeffreys y col. en el que se investiga la inestabilidad de *PRDM9 in vivo* en linfocitos y espermatozoides<sup>254</sup>.

Nuestros resultados demuestran que la inestabilidad de *PRDM9* detectada en el trabajo de Jeffreys y col.<sup>254</sup> tiene su reflejo a nivel poblacional. Es decir, las nuevas mutaciones que se producen durante la meiosis de un progenitor pueden transmitirse a la descendencia, generando un nuevo *pool* de individuos portadores de nuevos alelos de *PRDM9*. Teniendo en cuenta este hecho y el número (en el orden de cientos) de mutantes de *PRDM9* encontradas por Jeffreys y col., sólo cabe esperar que la variabilidad genética poblacional en humanos sea más elevada que la reflejada en la literatura. En este sentido, estudios recientes en ratones, tanto en poblaciones salvajes

como en población de laboratorio, han encontrado una elevada diversidad alélica. Así, Kono y col. encontraron 57 alelos diferentes en una muestra de 116 ratones<sup>360</sup>, mientras que Buard y col. encontraron 113 alelos en su muestra de 257 ratones<sup>361</sup>.

En nuestra población de estudio, la mayoría de los nuevos alelos identificados parecen haber evolucionado a partir del alelo A. El alelo L40 parece haber evolucionado de los alelos L9, L20 o L24 que presentan una frecuencia de 9,71% en la población. El alelo L47 parece haber evolucionado del alelo C que presenta una frecuencia del 3,5% en la población menorquina y el alelo L51 del alelo D a pesar de no hallarse en la población ibicenca estudiada. El origen del alelo L49 no es claro.

### Análisis de la población balear

Los resultados de las poblaciones baleares fueron comparados con los datos de las siguientes poblaciones de la bibliografía: África, Europa<sup>102</sup>, oeste de Europa<sup>103</sup>, franco-canadienses, Marruecos<sup>104</sup>, huteritas y muestras de población europea del CEPH<sup>29</sup>. Los datos de poblaciones indias, chinas o mejicanas<sup>362</sup> no se incluyeron pues se basaban en un número muy reducido y estadísticamente no significativo de individuos.

Como se puede observar en la **Tabla 5.12**, las poblaciones baleares estudiadas difieren significativamente de las demás de la bibliografía, excepto de la marroquí y de la muestra europea estudiada por Berg<sup>102</sup>. El test exacto de Fischer confirma estos resultados e indica que las diferencias entre la población balear y otras en la bibliografía son debidas principalmente a las frecuencias de los alelos A, L24 y L26. En la **Tabla 5.12** también se pueden observar las importantes diferencias entre la mayoría de poblaciones de la bibliografía. Además, es notable la diferencia de diversidad genética entre poblaciones, hallándose valores de heterozigosidad que oscilan entre 0,7599 en africanos y 0,2779 en franco-canadienses. La población del oeste de Europa muestra un valor extremadamente bajo de heterozigosidad (0,0530), posiblemente debido al método de genotipación empleado.

El análisis MDS (**Figura 5.3**), basado en las distancias genéticas entre poblaciones, refleja una clina del alelo A desde las poblaciones con origen en el norte-centro de Europa (frecuencia muy elevada (>0,900) y poca diversidad genética) hacia África (frecuencia mínima del alelo A (0,4569) y mucha diversidad alélica). También se observó que las poblaciones mediterráneas (Mallorca, Menorca, Ibiza y Marruecos) ocupan una posición intermedia entre estos dos extremos, de acuerdo con su posición geográfica y con otros resultados de estudios genéticos basados en otros marcadores<sup>363,364</sup>. Las poblaciones mallorquina e ibicenca son las poblaciones europeas que tienden más hacia

el polo africano. Por otra parte, la población menorquina es, en este gen, muy similar a la población marroquí y ambas se sitúan próximas a la población europea. Estos resultados concuerdan con los estudios de cromosoma Y que indican una importante contribución norteafricana a la población de Menorca<sup>365</sup>.

La vinculación con la población africana de las poblaciones mallorquina e ibicenca viene determinada en gran parte por los alelos C y L19, en la ibicenca también por L11. También es destacable la frecuencia elevada en las poblaciones baleares de los alelos L24 y L26, alelos presentes en la población europea<sup>102</sup>.

Por lo que respecta al análisis individual de cada isla, en Mallorca las frecuencias observadas de los alelos A y C muestran valores intermedios entre los de África y Europa, aunque son más cercanos a ésta última población. Respecto a Menorca, es destacable el hecho de que presenta las mayores frecuencias de los alelos L26 y L9, ambos presentes en Europa, así como la frecuencia polimórfica de un alelo no descrito hasta ahora (L47).

En la isla de Ibiza es notable la alta frecuencia de L24 (próxima al 9%). También llama la atención la cantidad de alelos nuevos detectados, todos ellos con frecuencias polimórficas (L49, L50, L51 y L52). Ibiza ha sido, históricamente, una población pequeña y consanguínea y este hecho se refleja en su pool genético, tal como han demostrado diversos trabajos, que han encontrado una importante deriva<sup>364,366-370</sup>. Por tanto, esta podría ser la causa de la inusual alta frecuencia del alelo L24. Estos estudios genéticos también han evidenciado el origen diferencial de su poblamiento inicial respecto a Mallorca y Menorca, ya que la isla no tuvo población estable hasta

## Discusión

Tabla 5.12. Valores de significación (P) de las comparaciones entre pares de poblaciones (FST).

	Mallorca (autóctona)	Mallorca (total)	Mallorca (residente)	Menorca	Ibiza	Franco-canadiense	Marruecos	Europa (oeste)	Europa	Africa	CEPH	Huteritas
<b>Mallorca (autóctona)</b>	*											
<b>Mallorca (total)</b>	0,97±0,01	*										
<b>Mallorca (residente)</b>	0,92±0,02	0,99±0,00	*									
<b>Menorca</b>	0,35±0,06	0,13±0,05	0,08±0,03	*								
<b>Ibiza</b>	0,39±0,05	0,39±0,05	0,40±0,04	0,05±0,01	*							
<b>Franco-canadiense</b>	<b>0,01±0,01</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,05±0,02</b>	<b>0,00±0,00</b>	*						
<b>Marruecos</b>	0,22±0,02	0,19±0,04	0,11±0,02	0,12±0,05	0,08±0,03	0,09±0,02	*					
<b>Europa (oeste)</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	*				
<b>Europa</b>	0,27±0,05	0,26±0,04	0,19±0,05	0,10±0,03	0,06±0,02	<b>0,00±0,00</b>	0,36±0,05	<b>0,00±0,00</b>	*			
<b>África</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	*		
<b>CEPH</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	0,16±0,03	0,06±0,03	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	*	
<b>Huteritas</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,01±0,01</b>	<b>0,00±0,00</b>	0,05±0,02	<b>0,00±0,00</b>	<b>0,00±0,00</b>	0,23±0,05	*

Valores significativos indicados en negrita

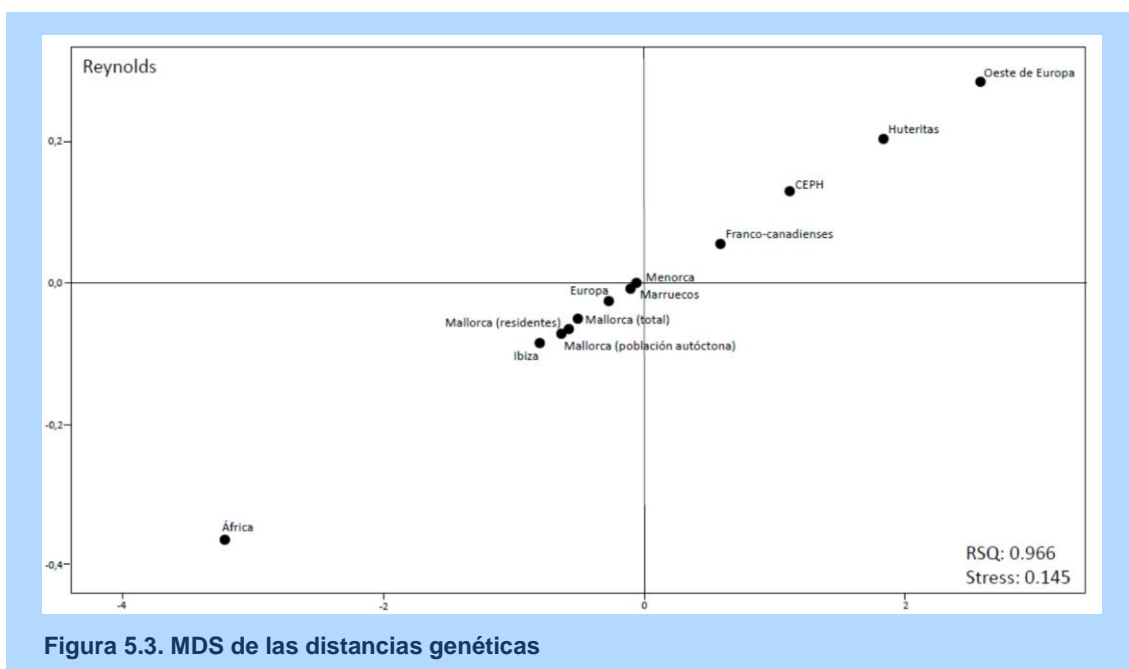


Figura 5.3. MDS de las distancias genéticas

mediados del siglo VII a.C. con la llegada de los fenicios. El estudio de las variantes alélicas del gen *PRDM9* en poblaciones del Mediterráneo oriental permitiría comprobar si los nuevos alelos encontrados en Ibiza proceden del poblamiento inicial fenicio-cartaginés de la isla.

### **PRDM9 y enfermedad**

Debido a su papel durante la recombinación homóloga, se ha sugerido que las variaciones en la secuencia de nucleótidos de *PRDM9* podrían estar relacionadas con diferentes patologías de origen meiótico (referencias). Así, SNPs en *PRDM9* se han asociado con infertilidad<sup>114,115</sup> y con la generación de anomalías genómicas *de novo*<sup>101,103,104,257</sup>.

Por lo que respecta a los resultados de nuestro estudio relacionados con la generación de anomalías *de novo*, hemos observado una mayor frecuencia del alelo A en los padres transmisores de una deleción *de novo* 22q11.2 que en la población control. Aunque el tamaño de la muestra es demasiado pequeño y posee poco poder estadístico, este resultado coincide con resultados de estudios previos que analizaron las posibles implicaciones de *PRDM9* como factor de riesgo para inestabilidad genómica<sup>101,103,257</sup>. Así por ejemplo, Berg y col. sugirieron que formas alélicas poco frecuentes de este gen protegían frente a reorganizaciones en dos minisatélites altamente inestables responsables de reorganizaciones *de novo*: CMT1A y HNPP<sup>101</sup>. En otro estudio más reciente sobre *PRDM9* y su papel en la recombinación, los autores encontraron que 14 de 27 puntos de ruptura asociados a síndromes de microdeleción o microduplicación

como Charcot-Marie-Tooth, Hunter, Potocki-Lupski o Smith-Magenis coincidían con *hotspots* definidos por el alelo A<sup>257</sup>. Los autores no encontraron puntos de ruptura causantes de enfermedades que coincidieran con *hotspots* DSB definidos por el alelo C llegando a la conclusión de que los individuos homocigotos para el alelo C no presentan riesgo para estas enfermedades y destacando la utilidad del genotipado de *PRDM9* para futuros estudios de anomalías genómicas.

Por otro lado, en un estudio reciente, Hussin y col., afirmaron que formas alélicas poco frecuentes de *PRDM9* se asociaron con leucemia infantil<sup>104</sup>. Los autores observaron una frecuencia estadísticamente significativa superior de alelos no A y alelos que denominaron “*k-finger*” en padres de niños con leucemia linfoblástica aguda (ALL, [Acute Lymphoblastic Leukemia](#)) (32,7% y 13,5% respectivamente) que en controles franco canadienses (15,1% y 3,3%, respectivamente). No obstante, en nuestra población control, la frecuencia de 27,67% de alelos no A y la frecuencia de 9,2% de alelos *k-finger* (C, D, L19, L20) son valores más próximos a los de los padres de niños con ALL que a los controles del estudio de Hussein. Los resultados de nuestro estudio demuestran que los alelos de *PRDM9* varían notablemente entre poblaciones y remarcan la necesidad de ser cauteloso a la hora de asociar alelos específicos con enfermedades en base a las frecuencias determinadas en ciertas poblaciones. Por ello, sería interesante replicar el estudio de Hussein en poblaciones como la reflejada en nuestro estudio y comprobar la correspondencia de resultados.

### 5.5 ANÁLISIS DEL EXOMA DE UN PACIENTE INFÉRIL

Las claras similitudes fenotípicas, detectadas mediante ICG, que presentaba un paciente NOA del presente estudio (i14) con otros descritos en la literatura, llevó a sospechar de un defecto común en la meiosis de todos ellos<sup>237–239</sup>. Ante la posibilidad de que este defecto tuviese un origen genético, se analizó el exoma de dicho paciente. Los resultados obtenidos identificaron el gen *TEX11* como posible candidato del bloqueo meiótico. En dos estudios realizados simultáneamente al nuestro se determinó que mutaciones en este gen eran causa probable de los problemas de infertilidad en los pacientes analizados<sup>83,123</sup>.

Como se ha descrito anteriormente, el fenotipo del paciente del presente estudio es similar al descrito para humanos<sup>123</sup> y ratones<sup>122</sup>. No obstante, los fenotipos humanos de este estudio y el previo realizado por Yatsenko y col. son más severos que el descrito para ratones. Así por ejemplo, en el caso del presente estudio no se observaron *foci* de

MLH1, que sí se observaron en ratones. Debido a que el análisis ICG no está disponible para los estudios de Yang y col. y Yatsenko y col., no es posible comparar los fenotipos meióticos en detalle y determinar con exactitud el grado de similitud. Todas estas observaciones sugieren que una o varias de las siguientes condiciones son responsables de las diferencias observadas entre humanos y ratones:

- la mutación en humanos es más grave que en ratones
- el papel de *TEX11* es ligeramente diferente en humanos
- influencia de otras mutaciones o polimorfismos como las observadas en este paciente sobre el fenotipo
- un contexto específico de cada especie, ya que *TEX11* es un gen que evoluciona rápidamente con sólo un 56% de homología a nivel de proteína entre ratones y humanos

La mutación encontrada en el paciente del presente estudio está localizada en la región SPO22 de la proteína y afecta el proceso de *splicing*. Por ello, proponemos que la estructura terciaria del dominio SPO22 y de toda la proteína se ve afectada por la mutación, influyendo negativamente sobre su función o estabilidad.

En resumen, *TEX11* sería por lo tanto un candidato óptimo que explicaría la infertilidad de este paciente. Tal y como se cita en dos estudios previos<sup>237,371</sup>, las causas de niveles elevados de asinapsis extensas y *gaps* se deben a defectos específicos que afectan a uno o dos de los pasos cruciales de la meiosis, recombinación o sinapsis, posiblemente debido a la presencia de mutaciones en genes claves del proceso. *TEX11* es un gen que influye sobre ambos procesos.

Por lo que respecta a las mutaciones encontradas en *MSH5* y en *TOP2A*, el análisis bioinformático concluyó que son probablemente no patogénicas. No obstante, teniendo en cuenta el rol de dichas proteínas durante la meiosis<sup>372,373</sup> y la asociación de *MSH5* con infertilidad en casos de fallo espermatogénico grave<sup>374-376</sup> y fallo ovárico prematuro<sup>377</sup>, no se puede destacar que, de alguna manera, estén influyendo en la severidad del fenotipo de nuestro paciente.

La mutación detectada en el gen de la nibrina (NBN) fue catalogada como patogénica por el programa UMD-Predictor. La proteína nibrina es un miembro del complejo de reparación de DSBs MRE11/RAD50. Se cree que participa en la reparación de DSBs y la activación del punto de control de daño inducido al ADN<sup>378,379</sup>. Mutaciones en este gen están asociadas con el síndrome de Nijmegen (NBS; OMIM 251260) y predisposición a cáncer<sup>380-383</sup>. La mutación encontrada en el presente estudio (R215W) afecta a la orientación relativa de los dos dominios BRCT de la proteína y dificulta la

unión de la histona  $\gamma$ H2AX tras la inducción de los DSBs, hecho que lleva a un retraso en la reparación de los mismos<sup>384</sup>. La mutación en este gen podría ser igualmente una causa adicional del fenotipo más severo de este individuo en comparación con los ratones del estudio de Yang y col.<sup>122</sup>

El análisis del exoma de este paciente confirma su utilidad diagnóstica en casos en los que la sospecha de anomalía genética es elevada por la presencia de fenotipos característicos. En esta misma línea, otros estudios han remarcado igualmente la validez de esta técnica para determinar la causa de enfermedad en pacientes no diagnosticados. Así por ejemplo, Yang y col. fueron capaces de diagnosticar un 25% de pacientes no diagnosticados con sospecha de desórdenes genéticos<sup>385</sup>. Según los autores del estudio, este porcentaje es superior al de pruebas genéticas más establecidas como cariotipo y *arrays* cromosómicos, que proporcionan una respuesta en un 15% a 20% de los casos<sup>385</sup>. En resumen, los resultados obtenidos en nuestro estudio validan la utilización del exoma en investigación básica dirigida al estudio de mutaciones genéticas que afectan a la fertilidad del individuo.



## **6. CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. El análisis inmunocitogenético de los procesos de recombinación y sinapsis cromosómica en autosomas y cuerpo sexual ha permitido determinar que la infertilidad atribuible a alteraciones en estos procesos se restringe a aquellos individuos que presentan desviaciones extremas respecto del rango control de estos parámetros.
2. La comparación de nuestros resultados inmunocitogenéticos con resultados publicados en la literatura ha permitido determinar la existencia de un fenotipo meiótico recurrente, caracterizado por bloqueo en la transición zigoteno-paquiteno.
3. La aplicación de técnicas de NGS (análisis del exoma) en el individuo infértil que presentaba el fenotipo recurrente ha permitido localizar una mutación en el gen *TEX11*, probablemente patogénica y responsable de las características asociadas a dicho fenotipo.
4. El análisis de la relación de las variantes alélicas del gen *PRDM9* con problemas de fertilidad y generación de síndromes de novo no detectó una asociación significativa en ningún caso.
5. La influencia del gen *RNF212* sobre la variabilidad interindividual observada en el presente estudio está asociada a la presencia de polimorfismos genéticos en dicho gen. Así, cada copia del alelo T en el SNP rs3796619 de dicho gen supone una disminución media de la tasa de recombinación de 132,5 cM en comparación con el alelo C.
6. Existe una relación compleja entre los genotipos de *PRDM9* y la tasa de recombinación, que parece estar determinada por la longitud de los alelos, por el estado de homocigosidad o heterocigosidad de los mismos y por efectos de dominancia.
7. Existe una gran variabilidad intraindividual de los aspectos cuantitativos y cualitativos de la recombinación y sinapsis en las tres especies analizadas. Esta variabilidad sugiere que, en mamíferos, dichos procesos y los factores que los controlan deben ser suficientemente flexibles para permitir generar diversidad, aunque dentro de unos márgenes que garanticen la estabilidad genómica.

8. Se han observado diferencias notables en los procesos de recombinación entre humanos y gatos. Así, en gatos se ha determinado la ausencia de picos de recombinación en las regiones subtelo méricas, un menor efecto inhibitor del centrómero y una distribución más uniforme a lo largo de los brazos cromosómicos. Estas dos últimas observaciones están relacionadas con la menor interferencia observada en esta especie.

9. Se han observado características sinápticas propias de gatos macho, no descritas hasta el momento, como la presencia de un reservorio de proteína SYCP3 desde leptoteno hasta paquiteno inicial, la separación prematura de los elementos laterales a partir de paquiteno tardío o la morfología propia del cuerpo sexual que, al igual que en humanos, puede asociarse al subestadio de dicha fase meiótica.

10. Se han detectado anomalías sinápticas en humanos, gatos y perros, aunque la incidencia de asinapsis, gaps y MSUC varió entre especies. Además, se ha descrito por primera vez en estas tres especies el fenómeno de MSUC en individuos sin alteraciones cromosómicas de poblaciones salvajes.

11. En el cuerpo sexual, se ha detectado presencia de proteína SYCP1 más allá de la región PAR en las tres especies analizadas. Dicha presencia podría relacionarse con un proceso de polimerización por defecto de la proteína SYCP1, que ayudaría a la reparación de los DSBs situados en el cromosoma X.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



1. Jane Reece *et al.* *Campbell Biology: 10th, Australian version. Campbell Biology* (2015).
2. Wilkins, A. S. & Holliday, R. The evolution of meiosis from mitosis. *Genetics* **181**, 3–12 (2009).
3. Cavalier-Smith, T. Origin of the cell nucleus, mitosis and sex: roles of intracellular coevolution. *Biol Direct* **5**, 7 (2010).
4. Marcon, E. & Moens, P. B. The evolution of meiosis: recruitment and modification of somatic DNA-repair proteins. *Bioessays* **27**, 795–808 (2005).
5. Froenicke, L., Anderson, L. K., Wienberg, J. & Ashley, T. Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 1353–1368 (2002).
6. Mary, N. *et al.* Meiotic Recombination Analyses of Individual Chromosomes in Male Domestic Pigs (*Sus scrofa domestica*). *PLoS One* **9**, e99123 (2014).
7. Borodin, P. M. *et al.* Recombination map of the common shrew, *Sorex araneus* (Eulipotyphla, Mammalia). *Genetics* **178**, 621–632 (2008).
8. Al-Jaru, a, Goodwin, W., Skidmore, J. & Khazanehdari, K. Distribution of MLH1 foci in horse male synaptonemal complex. *Cytogenet. Genome Res.* **142**, 87–94 (2014).
9. Borodin, P. M., Karamysheva, T. V & Rubtsov, N. B. [Immunofluorescent analysis of meiotic recombination and interference in the domestic cat]. *Tsitologiya* **50**, 62–66 (2008).
10. Basheva, E. a, Bidau, C. J. & Borodin, P. M. General pattern of meiotic recombination in male dogs estimated by MLH1 and RAD51 immunolocalization. *Chromosome Res.* **16**, 709–19 (2008).
11. Sun, F., Trpkov, K., Rademaker, A., Ko, E. & Martin, R. H. Variation in meiotic recombination frequencies among human males. *Hum Genet* **116**, 172–178 (2005).
12. Watanabe, Y. & Nurse, P. Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* **400**, 461–464 (1999).
13. Klein, F. *et al.* A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* **98**, 91–103 (1999).
14. Pezzi, N. *et al.* STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *FASEB J* **14**, 581–592 (2000).
15. Prieto, I. *et al.* Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat. Cell Biol.* **3**, 761–766 (2001).
16. Gerton, J. L. & Hawley, R. S. Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 477–487 (2005).
17. Nishant, K. T. & Rao, M. R. S. Molecular features of meiotic recombination hot spots. *Bioessays* **28**, 45–56 (2006).
18. Schmekel, K. *et al.* Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Exp Cell Res* **226**, 20–30 (1996).
19. Brown, P. W. *et al.* Meiotic synapsis proceeds from a limited number of subtelomeric sites in the human male. *Am J Hum Genet* **77**, 556–566 (2005).
20. Handel, M. A. & Schimenti, J. C. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet* **11**, 124–136 (2010).
21. Eijpe, M. Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J. Cell Biol.* **160**, 657–670 (2003).
22. Hann, M. C., Lau, P. E. & Tempest, H. G. Meiotic recombination and male infertility: from basic science to clinical reality? *Asian J. Androl.* **13**, 212–218 (2011).
23. Dernburg, A. F. *et al.* Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* **94**, 387–398 (1998).
24. Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G. & Pelletier, G. AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J.* **20**, 589–600 (2001).
25. Keeney, S., Giroux, C. N. & Kleckner, N. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**, 375–384 (1997).

26. McKim, K. S. & Hayashi-Hagihara, A. mei-W68 in *Drosophila melanogaster* encodes a Spo11 homolog: Evidence that the mechanism for initiating meiotic recombination is conserved. *Genes Dev.* **12**, 2932–2942 (1998).
27. Romanienko, P. J. & Camerini-Otero, R. D. The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell* **6**, 975–987 (2000).
28. Keeney, S. & Neale, M. J. Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem Soc Trans* **34**, 523–525 (2006).
29. Baudat, F. *et al.* PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science (80-. )*. **327**, 836–840 (2010).
30. Heyer, W. D., Ehmsen, K. T. & Liu, J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet* **44**, 113–139 (2010).
31. Harrison, J. C. & Haber, J. E. Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet* **40**, 209–235 (2006).
32. Burgoyne, P. S., Mahadevaiah, S. K. & Turner, J. M. The management of DNA double-strand breaks in mitotic G2, and in mammalian meiosis viewed from a mitotic G2 perspective. *Bioessays* **29**, 974–986 (2007).
33. Mimitou, E. P. & Symington, L. S. Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* **455**, 770–4 (2008).
34. Mimitou, E. P. & Symington, L. S. DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA Repair (Amst)*. **8**, 983–95 (2009).
35. Mimitou, E. P. & Symington, L. S. Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem Sci* **34**, 264–272 (2009).
36. Zhu, Z., Chung, W. H., Shim, E. Y., Lee, S. E. & Ira, G. Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* **134**, 981–994 (2008).
37. Zou, Y., Liu, Y., Wu, X. & Shell, S. M. Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses. *J Cell Physiol* **208**, 267–273 (2006).
38. Zou, L. & Elledge, S. J. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science (80-. )*. **300**, 1542–1548 (2003).
39. Egger, A. L., Inman, R. B. & Cox, M. M. The Rad51-dependent pairing of long DNA substrates is stabilized by replication protein A. *J. Biol. Chem.* **277**, 39280–39288 (2002).
40. Van Komen, S., Petukhova, G., Sigurdsson, S. & Sung, P. Functional cross-talk among Rad51, Rad54, and replication protein A in heteroduplex DNA joint formation. *J. Biol. Chem.* **277**, 43578–43587 (2002).
41. Sung, P. Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 28194–28197 (1997).
42. Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M. & Zhao, X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res* **40**, 5795–5818 (2012).
43. Maréchal, A. & Zou, L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).
44. Heyer, W. D., Li, X., Rolfmeier, M. & Zhang, X. P. Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res* **34**, 4115–4125 (2006).
45. Carpenter, A. T. Electron microscopy of meiosis in *Drosophila melanogaster* females: II. The recombination nodule—a recombination-associated structure at pachytene? *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3186–3189 (1975).
46. Moens, P. B., Marcon, E., Shore, J. S., Kochakpour, N. & Spyropoulos, B. Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *J. Cell Sci.* **120**, 1017–27 (2007).
47. Snowden, T., Acharya, S., Butz, C., Berardini, M. & Fishel, R. hMSH4-hMSH5 recognizes holliday junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol. Cell* **15**, 437–451 (2004).
48. Reynolds, A. *et al.* RNF212 is a dosage-sensitive regulator of crossing-over during mammalian meiosis. *Nat Genet* **45**, 269–278 (2013).
49. Oliver-Bonet, M., Campillo, M., Turek, P. J., Ko, E. & Martin, R. H. Analysis of replication protein A (RPA) in human spermatogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* **13**, 837–844 (2007).



50. Nishant, K. T., Chen, C., Shinohara, M., Shinohara, A. & Alani, E. Genetic analysis of baker's yeast Msh4-Msh5 reveals a threshold crossover level for meiotic viability. *PLoS Genet* **6**, (2010).
51. Barlow, A. L. & Hulten, M. A. Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur J Hum Genet* **6**, 350–358 (1998).
52. Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J. & Stahl, F. W. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**, 25–35 (1983).
53. Nassif, N., Penney, J., Pal, S., Engels, W. R. & Gloor, G. B. Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1613–25 (1994).
54. Allers, T. & Lichten, M. Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* **106**, 47–57 (2001).
55. Borner, G. V., Kleckner, N. & Hunter, N. Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell* **117**, 29–45 (2004).
56. Guillon, H., Baudat, F., Grey, C., Liskay, R. M. & de Massy, B. Crossover and Noncrossover Pathways in Mouse Meiosis. *Mol. Cell* **20**, 563–573 (2005).
57. Terasawa, M. *et al.* Meiotic recombination-related DNA synthesis and its implications for cross-over and non-cross-over recombinant formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5965–5970 (2007).
58. Santucci-Darmanin, S. *et al.* The DNA mismatch-repair MLH3 protein interacts with MSH4 in meiotic cells, supporting a role for this MutL homolog in mammalian meiotic recombination. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1697–1706 (2002).
59. Benet, J., Oliver-Bonet, M., Cifuentes, P., Templado, C. & Navarro, J. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet. Genome Res.* **111**, 281–90 (2005).
60. Edelmann, W. *et al.* Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell* **85**, 1125–1134 (1996).
61. Marcon, E. & Moens, P. MLH1p and MLH3p Localize to Precociously Induced Chiasmata of Okadaic-Acid-Treated Mouse Spermatocytes. *Genetics* **165**, 2283–2287 (2003).
62. Svetlanov, A., Baudat, F., Cohen, P. E. & De Massy, B. Distinct functions of MLH3 at recombination hot spots in the mouse. *Genetics* **178**, 1937–1945 (2008).
63. Wang, T.-F., Kleckner, N. & Hunter, N. Functional specificity of MutL homologs in yeast: Evidence for three Mlh1-based heterocomplexes with distinct roles during meiosis in recombination and mismatch correction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 13914–13919 (1999).
64. Kan, R. *et al.* Comparative analysis of meiotic progression in female mice bearing mutations in genes of the DNA mismatch repair pathway. *Biol Reprod* **78**, 462–471 (2008).
65. Kolas, N. K. *et al.* Localization of MMR proteins on meiotic chromosomes in mice indicates distinct functions during prophase I. *J. Cell Biol.* **171**, 447–458 (2005).
66. Serrentino, M. E. & Borde, V. The spatial regulation of meiotic recombination hotspots: are all DSB hotspots crossover hotspots? *Exp Cell Res* **318**, 1347–1352 (2012).
67. Kotwaliwale, C. V. Robustness in crossover regulation during meiosis. *Nat Cell Biol* **14**, 335–337 (2012).
68. Muller, H. The Mechanism of Crossing-Over. *Am. Nat.* **50**, 193–221 (1916).
69. Borodin, P. M., Basheva, E. A. & Zhelezova, A. I. Immunocytological analysis of meiotic recombination in the American mink (*Mustela vison*). *Anim. Genet.* **40**, 235–238 (2009).
70. Yang, Q. *et al.* Synapsis and meiotic recombination in male Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*). *PLoS One* **6**, e19255 (2011).
71. Sun, F. *et al.* Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 521–31 (2004).
72. Kleckner, N. *et al.* A mechanical basis for chromosome function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12592–12597 (2004).
73. King, J. S. & Mortimer, R. K. A polymerization model of chiasma interference and corresponding computer simulation. *Genetics* **126**, 1127–1138 (1990).
74. Foss, E. J. & Stahl, F. W. A test of a counting model for chiasma interference. *Genetics* **139**, 1201–1209 (1995).

75. Hillers, K. J. Crossover interference. *Curr. Biol.* **14**, R1036–R1037 (2004).
76. Martini, E., Diaz, R. L., Hunter, N. & Keeney, S. Crossover homeostasis in yeast meiosis. *Cell* **126**, 285–295 (2006).
77. Cole, F. *et al.* Homeostatic control of recombination is implemented progressively in mouse meiosis. *Nat Cell Biol* **14**, 424–430 (2012).
78. Berchowitz, L. E. & Copenhaver, G. P. Genetic interference: don't stand so close to me. *Curr Genomics* **11**, 91–102 (2010).
79. Koehler, K. E., Cherry, J. P., Lynn, A., Hunt, P. A. & Hassold, T. J. Genetic control of mammalian meiotic recombination. I. Variation in exchange frequencies among males from inbred mouse strains. *Genetics* **162**, 297–306 (2002).
80. Dumont, B. L. & Payseur, B. A. Genetic analysis of genome-scale recombination rate evolution in house mice. *PLoS Genet* **7**, e1002116 (2011).
81. Capilla, L. *et al.* Genetic recombination variation in wild Robertsonian mice: on the role of chromosomal fusions and Prdm9 allelic background. *Proc. Biol. Sci.* **281**, (2014).
82. Brick, K., Smagulova, F., Khil, P., Camerini-Otero, R. D. & Petukhova, G. V. Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature* **485**, 642–645 (2012).
83. Yang, F. *et al.* TEX11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse. *EMBO Mol. Med.* 1–13 (2015). doi:10.15252/emmm.201404967
84. Codina-Pascual, M. Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and effects on human male meiosis. *Mol. Hum. Reprod.* **12**, 123–133 (2006).
85. Sun, F. *et al.* Variation in MLH1 distribution in recombination maps for individual chromosomes from human males. *Hum Mol Genet* **15**, 2376–2391 (2006).
86. Stefansson, H. *et al.* A common inversion under selection in Europeans. *Nat Genet* **37**, 129–137 (2005).
87. Kong, A. *et al.* Sequence variants in the RNF212 gene associate with genome-wide recombination rate. *Science (80-. )*. **319**, 1398–1401 (2008).
88. Steinmetz, M. *et al.* A molecular map of the immune response region from the major histocompatibility complex of the mouse. *Nature* **300**, 35–42 (1982).
89. de Massy, B. Distribution of meiotic recombination sites. *Trends Genet* **19**, 514–522 (2003).
90. McVean, G. *et al.* The Fine-Scale Structure of Recombination Rate Variation in the Human Genome. *Science (80-. )*. **304**, 581 – 4 (2004).
91. Myers, S., Bottolo, L., Freeman, C., McVean, G. & Donnelly, P. A fine-scale map of recombination rates and hotspots across the human genome. *Science* **310**, 321–4 (2005).
92. de Massy, B. Initiation of meiotic recombination: how and where? Conservation and specificities among eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **47**, 563–99 (2013).
93. Tortereau, F. *et al.* A high density recombination map of the pig reveals a correlation between sex-specific recombination and GC content. *BMC Genomics* **13**, 12 (2012).
94. Hayashi, K., Yoshida, K. & Matsui, Y. A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* **438**, 374–378 (2005).
95. Mihola, O., Trachtulec, Z., Vlcek, C., Schimenti, J. C. & Forejt, J. A mouse speciation gene encodes a meiotic histone H3 methyltransferase. *Science (80-. )*. **323**, 373–375 (2009).
96. Willis, J. H. Genetics. Origin of species in overdrive. *Science* **323**, 350–351 (2009).
97. Ponting, C. P. What are the genomic drivers of the rapid evolution of PRDM9? *Trends Genet* **27**, 165–171 (2011).
98. Schwartz, J. J., Roach, D. J., Thomas, J. H. & Shendure, J. Primate evolution of the recombination regulator PRDM9. *Nat. Commun.* **5**, 4370 (2014).
99. Eram, M. S. *et al.* Trimethylation of histone h3 lysine 36 by human methyltransferase prdm9 protein. *J. Biol. Chem.* **289**, 12177–12188 (2014).
100. Kong, A. *et al.* Fine-scale recombination rate differences between sexes, populations and individuals. *Nature*

- 467, 1099–1103 (2010).
101. Berg, I. L. *et al.* PRDM9 variation strongly influences recombination hot-spot activity and meiotic instability in humans. *Nat. Genet.* **42**, 859–863 (2010).
  102. Berg, I. L. *et al.* Variants of the protein PRDM9 differentially regulate a set of human meiotic recombination hotspots highly active in African populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 12378–12383 (2011).
  103. Borel, C. *et al.* Evaluation of PRDM9 variation as a risk factor for recurrent genomic disorders and chromosomal non-disjunction. *Hum Genet* **131**, 1519–1524 (2012).
  104. Hussin, J. *et al.* Rare allelic forms of PRDM9 associated with childhood leukemogenesis. *Genome Res* (2013). doi:gr.144188.112 [pii]10.1101/gr.144188.112
  105. Alemany-Schmidt, A. *et al.* Geographical genetic variability: a factor to consider when assessing clinical implications of PRDM9. *Mol. Genet. genomic Med.* **2**, 201–3 (2014).
  106. Oliver, P. L. *et al.* Accelerated evolution of the Prdm9 speciation gene across diverse metazoan taxa. *PLoS Genet* **5**, e1000753 (2009).
  107. Thomas, J. H., Emerson, R. O. & Shendure, J. Extraordinary molecular evolution in the PRDM9 fertility gene. *PLoS One* **4**, e8505 (2009).
  108. Myers, S. *et al.* Drive Against Hotspot Motifs in Primates Implicates the PRDM9 Gene in Meiotic Recombination. *Science (80-. )*. **327**, 876–879 (2010).
  109. Myers, S., Freeman, C., Auton, A., Donnelly, P. & McVean, G. A common sequence motif associated with recombination hot spots and genome instability in humans. *Nat Genet* **40**, 1124–1129 (2008).
  110. Hinch, A. G. *et al.* The landscape of recombination in African Americans. *Nature* **476**, 170–175 (2011).
  111. Auton, A. *et al.* A fine-scale chimpanzee genetic map from population sequencing. *Science (80-. )*. **336**, 193–198 (2012).
  112. Baker, C. L., Walker, M., Kajita, S., Petkov, P. M. & Paigen, K. PRDM9 binding organizes hotspot nucleosomes and limits Holliday junction migration. *Genome Res.* **24**, 724–732 (2014).
  113. Baudat, F., Imai, Y. & de Massy, B. Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nat Rev Genet* **14**, 794–806 (2013).
  114. Irie, S. *et al.* Single-nucleotide polymorphisms of the PRDM9 (MEISETZ) gene in patients with nonobstructive azoospermia. *J Androl* **30**, 426–431 (2009).
  115. Miyamoto, T. *et al.* Two single nucleotide polymorphisms in PRDM9 (MEISETZ) gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with azoospermia by meiotic arrest. *J Assist Reprod Genet* **25**, 553–557 (2008).
  116. Hillmer, D., Wagner, A., Summerer, M., Daiber, V., Mautner, L., Messiaen, D., Cooper, H. K.-S. Fine mapping of meiotic NAHR-associated crossovers causing large NF1 deletions. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 484–96 (2016).
  117. Chowdhury, R., Bois, P. R., Feingold, E., Sherman, S. L. & Cheung, V. G. Genetic analysis of variation in human meiotic recombination. *PLoS Genet* **5**, e1000648 (2009).
  118. Fledel-Alon, A. *et al.* Variation in human recombination rates and its genetic determinants. *PLoS One* **6**, e20321 (2011).
  119. Sandor, C. *et al.* Genetic variants in REC8, RNF212, and PRDM9 influence male recombination in cattle. *PLoS Genet* **8**, e1002854 (2012).
  120. Wang, P. J., McCarrey, J. R., Yang, F. & Page, D. C. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat. Genet.* **27**, 422–426 (2001).
  121. Adelman, C. A. & Petrini, J. H. J. ZIP4H (TEX11) deficiency in the mouse impairs meiotic double strand break repair and the regulation of crossing over. *PLoS Genet.* **4**, e1000042 (2008).
  122. Yang, F. *et al.* Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor. *Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor.* 682–691 (2008). doi:10.1101/gad.1613608
  123. Yatsenko, A. N. *et al.* X-Linked TEX11 Mutations, Meiotic Arrest, and Azoospermia in Infertile Men. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2097–107 (2015).
  124. Lammers, J. H. *et al.* The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* **14**, 1137–1146 (1994).

125. Offenberg, H. H. *et al.* SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res* **26**, 2572–2579 (1998).
126. Severson, A. F., Ling, L., van Zuylen, V. & Meyer, B. J. The axial element protein HTP-3 promotes cohesin loading and meiotic axis assembly in *C. elegans* to implement the meiotic program of chromosome segregation. *Genes Dev* **23**, 1763–1778 (2009).
127. Llano, E. *et al.* Meiotic cohesin complexes are essential for the formation of the axial element in mice. *J. Cell Biol.* **197**, 877–885 (2012).
128. Pasierbek, P. *et al.* A *Caenorhabditis elegans* cohesion protein with functions in meiotic chromosome pairing and disjunction. *Genes Dev* **15**, 1349–1360 (2001).
129. Lee, J., Iwai, T., Yokota, T. & Yamashita, M. Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. *J Cell Sci* **116**, 2781–2790 (2003).
130. Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Gross, B. & Jessberger, R. Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6984–6998 (2001).
131. Blat, Y., Protacio, R. U., Hunter, N. & Kleckner, N. Physical and functional interactions among basic chromosome organizational features govern early steps of meiotic chiasma formation. *Cell* **111**, 791–802 (2002).
132. Liebe, B., Alsheimer, M., Höög, C., Benavente, R. & Scherthan, H. Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements. *Mol. Biol. Cell* **15**, 827–37 (2004).
133. Yuan, L. *et al.* The Murine SCP3 Gene Is Required for Synaptonemal Complex Assembly, Chromosome Synapsis, and Male Fertility. *Mol. Cell* **5**, 73–83 (2000).
134. Zetka, M. C., Kawasaki, I., Strome, S. & Müller, F. Synapsis and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* require HIM-3, a meiotic chromosome core component that functions in chromosome segregation. *Genes Dev.* **13**, 2258–2270 (1999).
135. Fraune, J., Schramm, S., Alsheimer, M. & Benavente, R. The mammalian synaptonemal complex: Protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Exp. Cell Res.* **318**, 1340–1346 (2012).
136. Sage, J. *et al.* The Sycp1 loci of the mouse genome: successive retropositions of a meiotic gene during the recent evolution of the genus. *Genomics* **44**, 118–126 (1997).
137. Sym, M., Engebrecht, J. A. & Roeder, G. S. ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell* **72**, 365–378 (1993).
138. Meuwissen, R. L. *et al.* A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J* **11**, 5091–5100 (1992).
139. Page, S. L. & Hawley, R. S. c ( 3 ) G encodes a *Drosophila* synaptonemal complex protein. *Genes Dev.* 3130–3143 (2001). doi:10.1101/gad.935001.axes
140. MacQueen, A. J., Colaiacovo, M. P., McDonald, K. & Villeneuve, A. M. Synapsis-dependent and -independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans*. *Genes Dev* **16**, 2428–2442 (2002).
141. Liu, J. G. *et al.* Localization of the N-terminus of SCP1 to the central element of the synaptonemal complex and evidence for direct interactions between the N-termini of SCP1 molecules organized head-to-head. *Exp. Cell Res.* **226**, 11–9 (1996).
142. Costa, Y. *et al.* Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J Cell Sci* **118**, 2755–2762 (2005).
143. Schramm, S. *et al.* A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genet* **7**, e1002088 (2011).
144. Hamer, G. *et al.* Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci* **119**, 4025–4032 (2006).
145. Davies, O. R., Maman, J. D. & Pellegrini, L. Structural analysis of the human SYCE2-TEX12 complex provides molecular insights into synaptonemal complex assembly. *Open Biol* **2**, 120099 (2012).
146. Solari, A. J. The behavior of the XY pair in mammals. *Int Rev Cytol* **38**, 273–317 (1974).
147. Kierszenbaum, A. L. & Tres, L. L. Nucleolar and perichromosomal RNA synthesis during meiotic prophase in the mouse testis. *J Cell Biol* **60**, 39–53 (1974).

148. Solari, A. J. Synaptosomal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma* **81**, 315–337 (1980).
149. Codina-Pascual, M. *et al.* Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum. Reprod.* **20**, 2133–2139 (2005).
150. Skaletsky, H. *et al.* The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* **423**, 825–837 (2003).
151. Galtier, N. Recombination, GC-content and the human pseudoautosomal boundary paradox. *Trends Genet* **20**, 347–349 (2004).
152. Ross, M. T. *et al.* The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* **434**, 325–337 (2005).
153. Blaschke, R. J. & Rappold, G. The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 233–239 (2006).
154. Helena Mangs, a & Morris, B. J. The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. *Curr. Genomics* **8**, 129–136 (2007).
155. Flaquer, A., Rappold, G. A., Wienker, T. F. & Fischer, C. The human pseudoautosomal regions: a review for genetic epidemiologists. *Eur J Hum Genet* **16**, 771–779 (2008).
156. Olivier, M., Breen, M., Binns, M. M. & Lust, G. Localization and characterization of nucleotide sequences from the canine Y chromosome. *Chromosom. Res* **7**, 223–233 (1999).
157. Young, A. C., Kirkness, E. F. & Breen, M. Tackling the characterization of canine chromosomal breakpoints with an integrated in-situ/in-silico approach: the canine PAR and PAB. *Chromosom. Res* **16**, 1193–1202 (2008).
158. Raudsepp, T. *et al.* A 4,103 marker integrated physical and comparative map of the horse genome. *Cytogenet Genome Res* **122**, 28–36 (2008).
159. Shiue, Y. L. *et al.* Synteny and regional marker order assignment of 26 type I and microsatellite markers to the horse X- and Y-chromosomes. *Chromosom. Res* **8**, 45–55 (2000).
160. Quilter, C. R. *et al.* A mapping and evolutionary study of porcine sex chromosome genes. *Mamm Genome* **13**, 588–594 (2002).
161. Murphy, W. J. *et al.* A 1.5-Mb-resolution radiation hybrid map of the cat genome and comparative analysis with the canine and human genomes. *Genomics* **89**, 189–196 (2007).
162. Pearks Wilkerson, A. J. *et al.* Gene discovery and comparative analysis of X-degenerate genes from the domestic cat Y chromosome. *Genomics* **92**, 329–338 (2008).
163. Raudsepp, T., Das, P. J., Avila, F. & Chowdhary, B. P. The Pseudoautosomal Region and Sex Chromosome Aneuploidies in Domestic Species. *Sex. Dev.* **6**, 72–83 (2012).
164. Van Laere, A. S., Coppieters, W. & Georges, M. Characterization of the bovine pseudoautosomal boundary: Documenting the evolutionary history of mammalian sex chromosomes. *Genome Res* **18**, 1884–1895 (2008).
165. Perry, J., Palmer, S., Gabriel, A. & Ashworth, A. A short pseudoautosomal region in laboratory mice. *Genome Res* **11**, 1826–1832 (2001).
166. Perry, J. & Ashworth, A. Evolutionary rate of a gene affected by chromosomal position. *Curr. Biol.* **9**, 987–989 (1999).
167. de Vries, F. A. T. *et al.* Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev.* **19**, 1376–89 (2005).
168. Pousette, A. *et al.* Presence of synaptonemal complex protein 1 transversal filament-like protein in human primary spermatocytes. *Hum. Reprod.* **12**, 2414–7 (1997).
169. Garcia-Cruz, R., Roig, I., Robles, P., Scherthan, H. & Caldas, M. G. ATR, BRCA1 and  $\gamma$ -H2AX localize to unsynapsed chromosomes at the pachytene stage in human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* **18**, 37–44 (2009).
170. Federici, F. *et al.* Incomplete meiotic sex chromosome inactivation in the domestic dog. *BMC Genomics* **16**, (2015).
171. Garcia-Cruz, R. *et al.* Pairing and recombination features during meiosis in *Cebus paraguayanus* (Primates: Platyrrhini). *BMC Genet.* **10**, 25 (2009).
172. Dietrich, A. J. J., van Marle, J., Heyting, C. & Vink, A. C. G. Ultrastructural evidence for a triple structure of the

- lateral element of the synaptonemal complex. *J. Struct. Biol.* **109**, 196–200 (1992).
173. del Mazo J, G.-A. L. Multistranded organization of the lateral elements of the synaptonemal complex in the rat and mouse. *Cytogenet Cell Genet* **41**, 219–24 (1986).
174. Page, J. *et al.* Involvement of synaptonemal complex proteins in sex chromosome segregation during marsupial male meiosis. *PLoS Genet.* **2**, 1240–1253 (2006).
175. Kelly, W. G. & Aramayo, R. Meiotic silencing and the epigenetics of sex. *Chromosom. Res.* **15**, 633–651 (2007).
176. Turner, J. M., Mahadevaiah, S. K., Ellis, P. J., Mitchell, M. J. & Burgoyne, P. S. Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids. *Dev Cell* **10**, 521–529 (2006).
177. Schimenti, J. Synapsis or silence. *Nat Genet* **37**, 11–13 (2005).
178. Kelly, W. G. *et al.* X-chromosome silencing in the germline of *C. elegans*. *Development* **129**, 479–492 (2002).
179. Baarends, W. M. *et al.* Silencing of unpaired chromatin and histone H2A ubiquitination in mammalian meiosis. *Mol Cell Biol* **25**, 1041–1053 (2005).
180. Turner, J. M. *et al.* Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet* **37**, 41–47 (2005).
181. Shiu, P. K., Raju, N. B., Zickler, D. & Metzberg, R. L. Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell* **107**, 905–16. (2001).
182. Guioli, S., Lovell-Badge, R. & Turner, J. M. Error-prone ZW pairing and no evidence for meiotic sex chromosome inactivation in the chicken germ line. *PLoS Genet* **8**, e1002560 (2012).
183. Namekawa, S. H. & Lee, J. T. XY and ZW: is meiotic sex chromosome inactivation the rule in evolution? *PLoS Genet* **5**, e1000493 (2009).
184. Schoenmakers, S. *et al.* Female meiotic sex chromosome inactivation in chicken. *PLoS Genet* **5**, e1000466 (2009).
185. Ichijima, Y. *et al.* MDC1 directs chromosome-wide silencing of the sex chromosomes in male germ cells. *Genes Dev* **25**, 959–971 (2011).
186. Fernandez-Capetillo, O. *et al.* H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell* **4**, 497–508 (2003).
187. de Boer, P. & de Jong, J. H. in *Fertility and Chromosome Pairing: Recent Studies in Plants and Animals* 37–76 (CRC Press, 1989).
188. De Rooij, D. G. & De Boer, P. Specific arrests of spermatogenesis in genetically modified and mutant mice. *Cytogenetic and Genome Research* **103**, 267–276 (2003).
189. Setterfield, L. A., Mahadevaiah, S. & Mittwoch, U. Chromosome pairing and germ cell loss in male and female mice carrying a reciprocal translocation. *J Reprod Fertil* **82**, 369–379 (1988).
190. Hunt, P. A. & Hassold, T. J. Sex matters in meiosis. *Science* (80-. ). **296**, 2181–2183 (2002).
191. Morelli, M. A. & Cohen, P. E. Not all germ cells are created equal: Aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* **130**, 761–781 (2005).
192. Kouznetsova, A. *et al.* BRCA1-mediated chromatin silencing is limited to oocytes with a small number of asynapsed chromosomes. *J Cell Sci* **122**, 2446–2452 (2009).
193. Mahadevaiah, S. K. *et al.* Extensive meiotic asynapsis in mice antagonises meiotic silencing of unsynapsed chromatin and consequently disrupts meiotic sex chromosome inactivation. *J. Cell Biol.* **182**, 263–276 (2008).
194. Burgoyne, P. S., Mahadevaiah, S. K. & Turner, J. M. a. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 207–216 (2009).
195. de Kretser, D. M. Male infertility. *Lancet* **349**, 787–790 (1997).
196. Dunson, D. B., Baird, D. D. & Colombo, B. Increased infertility with age in men and women. *Obs. Gynecol* **103**, 51–56 (2004).
197. Ferlin, A. *et al.* Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online* **14**, 734–745 (2007).
198. Tamowski, S., Aston, K. I. & Carrell, D. T. The use of transgenic mouse models in the study of male infertility.



- Syst. Biol. Reprod. Med.* **56**, 260–73 (2010).
199. Namiki, M. Genetic aspects of male infertility. *World J Surg* **24**, 1176–1179 (2000).
200. Reijo, R. *et al.* Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat. Genet.* **10**, 383–393 (1995).
201. Martin, R. H. Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Updat.* **14**, 379–390 (2008).
202. Cuppens, H. & Cassiman, J. J. CFTR mutations and polymorphisms in male infertility. *Int.J.Androl.* **27**, 251–256 (2004).
203. Foresta, C., Moro, E. & Ferlin, A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* **22**, 226–239 (2001).
204. Vogt, P. H. *et al.* Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* **5**, 933–943 (1996).
205. Nuti, F. & Krausz, C. Gene polymorphisms/mutations relevant to abnormal spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* **16**, 504–513 (2008).
206. Vogt, P. H. Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* **10**, 81–93 (2005).
207. Navarro-Costa, P., Goncalves, J. & Plancha, C. E. The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Hum Reprod Updat.* **16**, 525–542 (2010).
208. Shah, K., Sivapalan, G., Gibbons, N., Tempest, H. & Griffin, D. K. The genetic basis of infertility. *Reproduction* **126**, 13–25 (2003).
209. Hassold, T., Hall, H. & Hunt, P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet* **16 Spec No**, R203–8 (2007).
210. Egozcue, J. *et al.* Genetic analysis of sperm and implications of severe male infertility - A review. *Placenta* **24**, (2003).
211. Oliver-Bonet, M., Ko, E. & Martin, R. H. Male infertility in reciprocal translocation carriers: the sex body affair. *Cytogenet Genome Res* **111**, 343–346 (2005).
212. Egozcue, J. *et al.* Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet. Genome Res.* **111**, 337–342 (2005).
213. Mau-Holzmann, U. A. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet. Genome Res.* **111**, 317–336 (2005).
214. Georgiou, I. *et al.* Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. *Asian Journal of Andrology* **8**, 643–673 (2006).
215. Anton, E., Blanco, J., Egozcue, J. & Vidal, F. Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet. Genome Res.* **111**, 297–304 (2005).
216. Moradkhani, K. *et al.* Meiotic segregation of rare Robertsonian translocations: sperm analysis of three t(14q;22q) cases. *Hum Reprod* **21**, 1166–1171 (2006).
217. Moradkhani, K. *et al.* Rare Robertsonian translocations and meiotic behaviour: sperm FISH analysis of t(13;15) and t(14;15) translocations: a case report. *Hum Reprod* **21**, 3193–3198 (2006).
218. Oliver-Bonet, M. *et al.* Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Hum Reprod* **20**, 683–688 (2005).
219. Roux, C. *et al.* Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenet Genome Res* **111**, 291–296 (2005).
220. McCallum, T. *et al.* Unilateral renal agenesis associated with congenital bilateral absence of the vas deferens: phenotypic findings and genetic considerations. *Hum Reprod* **16**, 282–288 (2001).
221. De Gendt, K. *et al.* A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1327–32 (2004).
222. Walsh, T. J., Pera, R. R. & Turek, P. J. The genetics of male infertility. *Semin Reprod Med* **27**, 124–136 (2009).
223. O'Flynn O'Brien, K. L., Varghese, A. C. & Agarwal, A. The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertil. Steril.* **93**, 1–12 (2010).

224. Vidal, F. *et al.* Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males. *Hum Genet* **60**, 301–304 (1982).
225. Navarro, J. *et al.* A new synaptic anomaly: irregular synaptonemal complexes. *Hum Genet* **72**, 272–274 (1986).
226. Navarro, J. *et al.* Meiotic chromosome studies and synaptonemal complex analyses by light and electron microscopy in 47 infertile or sterile males. *Hum Reprod* **1**, 523–527 (1986).
227. Ashley, T. An integration of old and new perspectives of mammalian meiotic sterility. *Results Probl Cell Differ* **28**, 131–173 (2000).
228. Roeder, G. S. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev* **11**, 2600–2621 (1997).
229. Ross, L. O., Maxfield, R. & Dawson, D. Exchanges are not equally able to enhance meiotic chromosome segregation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4979–4983 (1996).
230. Lynn, A., Ashley, T. & Hassold, T. Variation in Human Meiotic Recombination. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **5**, 317–349 (2004).
231. Lamb, N. E. *et al.* Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet* **14**, 400–405 (1996).
232. Lamb, N. E. *et al.* Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. *Hum Mol Genet* **6**, 1391–1399 (1997).
233. Gonsalves, J. *et al.* Defective recombination in infertile men. *Hum Mol Genet* **13**, 2875–2883 (2004).
234. Sun, F. *et al.* Meiotic defects in a man with non-obstructive azoospermia: case report. *Hum Reprod* **19**, 1770–1773 (2004).
235. Jamsai, D. & O'Bryan, M. K. Mouse models in male fertility research. *Asian J Androl* **13**, 139–151 (2011).
236. Scieurano, R. B., Rahn, M. I., Pigozzi, M. I., Olmedo, S. B. & Solari, A. J. An azoospermic man with a double-strand DNA break-processing deficiency in the spermatocyte nuclei: case report. *Hum Reprod* **21**, 1194–1203 (2006).
237. Judis, L., Chan, E. R., Schwartz, S., Seftel, A. & Hassold, T. Meiosis I arrest and azoospermia in an infertile male explained by failure of formation of a component of the synaptonemal complex. *Fertil. Steril.* **81**, 205–209 (2004).
238. Topping, D. *et al.* Synaptic defects at meiosis I and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* **21**, 3171–3177 (2006).
239. Miyamoto, T. *et al.* Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet* **362**, 1714–1719 (2003).
240. Lyons, R. E. *et al.* Evidence for positive selection of taurine genes within a QTL region on chromosome X associated with testicular size in Australian Brahman cattle. *BMC Genet.* **15**, 6 (2014).
241. de Camargo, G. M. F. *et al.* Non-synonymous mutations mapped to chromosome X associated with andrological and growth traits in beef cattle. *BMC Genomics* **16**, 384 (2015).
242. Tang, L., Zeng, W., Clark, R. K. & Dobrinski, I. Characterization of the porcine testis-expressed gene 11 (Tex11). *Spermatogenesis* **1**, 147–151 (2011).
243. Albert Levan, Karl Fredga, A. A. S. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **52**, 201–220 (1964).
244. Muñoz-Fuentes, V., Di Rienzo, A. & Vilà, C. Prdm9, a major determinant of meiotic recombination hotspots, is not functional in dogs and their wild relatives, wolves and coyotes. *PLoS One* **6**, e25498 (2011).
245. Crowe, M. L. SeqDoC: rapid SNP and mutation detection by direct comparison of DNA sequence chromatograms. *BMC Bioinformatics* **6**, 133 (2005).
246. Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* **10**, 564–567 (2010).
247. Takezaki, N., Nei, M. & Tamura, K. POPTREE2: Software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with windows interface. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 747–752 (2010).
248. Felsenstein, J. PHYLIP—Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**, 163–166 (1989).



249. Sokal Rohlff FJ, R. R. *The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. (Freeman, New York, 1994).
250. Villagomez, D. A. Zygotene-pachytene substaging and synaptonemal complex karyotyping of boar spermatocytes. *Hereditas* **118**, 87–99 (1993).
251. Goetz, P., Chandley, a C. & Speed, R. M. Morphological and temporal sequence of meiotic prophase development at puberty in the male mouse. *J. Cell Sci.* **65**, 249–263 (1984).
252. Chandley, a C. Asymmetry in chromosome pairing: a major factor in de novo mutation and the production of genetic disease in man. *J. Med. Genet.* **26**, 546–552 (1989).
253. Mahadevaiah, S. K. *et al.* Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* **27**, 271–276 (2001).
254. Jeffreys, A. J., Cotton, V. E., Neumann, R. & Lam, K. W. Recombination regulator PRDM9 influences the instability of its own coding sequence in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 600–605 (2012).
255. Baker, C. L. *et al.* Multimer Formation Explains Allelic Suppression of PRDM9 Recombination Hotspots. 1–24 (2015). doi:10.1371/journal.pgen.1005512
256. Segurel, L., Leffler, E. M. & Przeworski, M. The case of the fickle fingers: how the PRDM9 zinc finger protein specifies meiotic recombination hotspots in humans. *PLoS Biol* **9**, e1001211 (2011).
257. Pratto, F. *et al.* Recombination initiation maps of individual human genomes. *Science (80-. )*. **346**, 1256442–1256442 (2014).
258. Anderson, L. K., Reeves, A., Webb, L. M. & Ashley, T. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics* **151**, 1569–1579 (1999).
259. Baker, S. M. *et al.* Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet* **13**, 336–342 (1996).
260. Lynn, A. *et al.* Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science (80-. )*. **296**, 2222–2225 (2002).
261. Sun, F. *et al.* Immunofluorescent synaptonemal complex analysis in azoospermic men. *Cytogenet Genome Res* **111**, 366–370 (2005).
262. Sun, F. *et al.* Abnormal progression through meiosis in men with nonobstructive azoospermia. *Fertil. Steril.* **87**, 565–71 (2007).
263. Ma, S., Ferguson, K. A., Arsovska, S., Moens, P. & Chow, V. Reduced recombination associated with the production of aneuploid sperm in an infertile man: a case report. *Hum. Reprod.* **21**, 980–5 (2006).
264. Sun, F. *et al.* 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).
265. Ma, S., Arsovska, S., Moens, P., Nigro, M. & Chow, V. Analysis of early meiotic events and aneuploidy in nonobstructive azoospermic men: A preliminary report. *Fertil. Steril.* **85**, 646–652 (2006).
266. Hassold, T. & Hunt, P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 280–291 (2001).
267. Martin, R. H. Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. *Reprod. Toxicol.* **22**, 142–7 (2006).
268. Ferguson, K. A., Wong, E. C., Chow, V., Nigro, M. & Ma, S. Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2870–2879 (2007).
269. Stack, S. M. Heterochromatin, the synaptonemal complex and crossing over. *J. Cell Sci.* **71**, 159–176 (1984).
270. Wood, A. J., Severson, A. F. & Meyer, B. J. Condensin and cohesin complexity: the expanding repertoire of functions. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 391–404 (2010).
271. Ferguson, K. A., Chow, V. & Ma, S. Silencing of unpaired meiotic chromosomes and altered recombination patterns in an azoospermic carrier of a t(8;13) reciprocal translocation. *Hum Reprod* **23**, 988–995 (2008).
272. Guichaoua, M. R. *et al.* Meiotic anomalies in infertile men with severe spermatogenic defects. *Hum. Reprod.* **20**, 1897–902 (2005).
273. Tassistro, V., Ghalamoun-Slami, R., Saias-Magnan, J. & Guichaoua, M. R. Chronology of meiosis & synaptonemal complex abnormalities in normal & abnormal spermatogenesis. *Indian J Med Res* **129**, 268–278

- (2009).
274. Codina-Pascual, M., Navarro, J., Egozcue, J. & Benet, J. A human tetraploid pachytene spermatocyte as the possible origin of diploid sperm: A case report. *Hum. Reprod.* **21**, 1795–1797 (2006).
  275. Codina-Pascual, M. *et al.* Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes. *Hum. Reprod.* **21**, 1490–1497 (2006).
  276. Vincent, M. C. *et al.* Cytogenetic investigations of infertile men with low sperm counts: a 25-year experience. *J Androl* **23**, 15–18 (2002).
  277. Egozcue, J. *et al.* Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum. Genet.* **65**, 185–188 (1983).
  278. Baarends, W. M., van der Laan, R. & Grootegoed, J. A. DNA repair mechanisms and gametogenesis. *Reproduction* **121**, 31–39 (2001).
  279. Grootegoed, J. *et al.* Genes and infertility: from yeast to mouse and man. *Hum. Reprod.* **14**, 1 (1999).
  280. Hassold, T. Mismatch repair goes meiotic. *Nat. Genet.* **13**, 261–2 (1996).
  281. Saadallah, N. & Hultén, M. EM investigations of surface spread synaptonemal complexes in a human male carrier of a pericentric inversion inv(13) (p12;q14): the role of heterosynapsis for spermatocyte survival. *Ann Hum Genet* **50**, 369–383 (1986).
  282. Guitart, M., Ponsà, M., Coll, M. D. & Egozcue, J. New data on the synaptic process of *Mesocricetus auratus*: connecting fibers, telomere association and heterosynapsis. *Genetica* **74**, 105–112 (1987).
  283. Navarro, J. *et al.* Sperm chromosome studies in an infertile man with partial, complete asynapsis of meiotic bivalents. *Hum Reprod* **5**, 227–9 (1990).
  284. Templado, C., Vidal, F., Marina, S., Pomerol, J. & Egozcue, E. A new meiotic mutation: desynapsis of individual bivalents. *Hum. Genet.* **59**, 345–348 (1981).
  285. Ali, S. *et al.* Exposure to low-dose bisphenol a impairs meiosis in the rat seminiferous tubule culture model: A physiotoxicogenomic approach. *PLoS One* **9**, (2014).
  286. Kallio, M. *et al.* Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J.* **21**, 2591–2601 (2002).
  287. Santoro, M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology* **59**, 55–63 (2000).
  288. Qian, C. & Zhou, M. M. SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2755–2763 (2006).
  289. Dillon, S. C., Zhang, X., Trievel, R. C. & Cheng, X. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol* **6**, 227 (2005).
  290. Narasimhan, V. *et al.* Health and population effects of rare gene knockouts in adult humans with related parents. *bioRxiv* **8624**, 1–8 (2015).
  291. Axelsson, E., Webster, M. T., Ratnakumar, A., Ponting, C. P. & Lindblad-Toh, K. Death of PRDM9 coincides with stabilization of the recombination landscape in the dog genome. *Genome Res.* **22**, 51–63 (2012).
  292. Lichten, M. Putting the Breaks on Meiosis. *Science* **350**, 6263 (2015).
  293. Dumont, B. L. & Payseur, B. A. Evolution of the genomic recombination rate in murid rodents. *Genetics* **187**, 643–657 (2010).
  294. Hassold, T., Hansen, T., Hunt, P. & VandeVoort, C. Cytological studies of recombination in rhesus males. *Cytogenet. Genome Res.* **124**, 132–8 (2009).
  295. Garcia-Cruz, R. *et al.* A comparative study of the recombination pattern in three species of Platyrrhini monkeys (primates). *Chromosoma* **120**, 521–30 (2011).
  296. Segura, J. *et al.* Evolution of recombination in eutherian mammals: insights into mechanisms that affect recombination rates and crossover interference. *Proc. Biol. Sci.* **280**, 20131945 (2013).
  297. Scherthan, H. *et al.* Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol* **134**, 1109–1125 (1996).
  298. Jones, G. The control of chiasma distribution. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **38**, 293–320 (1984).

299. Jones, G. H. & Franklin, F. C. H. Meiotic Crossing-over: Obligation and Interference. *Cell* **126**, 246–248 (2006).
300. Dutrillaux, B. Role of chromosomes in evolution: a new interpretation. *Ann Genet* **29**, 69–75 (1986).
301. Pardo-Manuel de Villena, F. & Sapienza, C. Recombination is proportional to the number of chromosome arms in mammals. *Mamm Genome* **12**, 318–322 (2001).
302. Schnedl, W. The karyotype of the mouse. *Chromosoma* **35**, 111–116 (1971).
303. Miller, O. J. *et al.* Identification of the mouse karyotype by quinacrine fluorescence, and tentative assignment of seven linkage groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 1530–3 (1971).
304. Bengtsson, B. O. & Frykman, I. Karyotype evolution: Evidence from the common shrew (*Sorex araneus* L.). *J. Evol. Biol.* **3**, 85–101 (1990).
305. Gustavsson, I. Standard karyotype of the domestic pig. Committee for the Standardized Karyotype of the Domestic Pig. *Hereditas* **109**, 151–7 (1988).
306. Richer, C. L. *et al.* Standard karyotype of the domestic horse (*Equus caballus*). *Hereditas* **112**, 289–293 (1990).
307. Hameister, H. *et al.* Zoo-FISH analysis: The American mink (*Mustela vison*) closely resembles the cat karyotype. *Chromosom. Res.* **5**, 5–11 (1997).
308. Lyons, L. a. Genetic testing in domestic cats. *Mol. Cell. Probes* **26**, 224–230 (2012).
309. Ostrander, E. A. & Ruvinsky, A. *The genetics of the dog.* (CABI).
310. Bender, M. & Kastenbaum, M. Statistical Analysis of the Normal Human Karyotype. *Am J Hum Genet* **21**, 322–351 (1969).
311. Vrooman, L. A., Nagaoka, S. I., Hassold, T. J. & Hunt, P. A. Evidence for paternal age-related alterations in meiotic chromosome dynamics in the mouse. *Genetics* **196**, 385–396 (2014).
312. Fledel-Alon, A. *et al.* Broad-scale recombination patterns underlying proper disjunction in humans. *PLoS Genet* **5**, e1000658 (2009).
313. Vrooman, L. A., Oatley, J. M., Griswold, J. E., Hassold, T. J. & Hunt, P. A. Estrogenic Exposure Alters the Spermatogonial Stem Cells in the Developing Testis, Permanently Reducing Crossover Levels in the Adult. *PLOS Genet.* **11**, e1004949 (2015).
314. Vranis, N. M., van der Heijden, G. W., Malki, S. & Bortvin, A. Synaptonemal complex length variation in wild-type male mice. *Genes (Basel)*. **1**, 505–520 (2010).
315. Moses, M. J. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). II. Morphology of the XY pair in spread preparations. *Chromosoma* **60**, 127–137 (1977).
316. Baier, B., Hunt, P., Broman, K. W. & Hassold, T. Variation in Genome-Wide Levels of Meiotic Recombination Is Established at the Onset of Prophase in Mammalian Males. *PLoS Genet.* **10**, e1004125 (2014).
317. Dada, R. *et al.* Epigenetics and its role in male infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* **29**, 213–223 (2012).
318. Soubry, A., Hoyo, C., Jirtle, R. L. & Murphy, S. K. A paternal environmental legacy: Evidence for epigenetic inheritance through the male germ line. *BioEssays* **36**, 359–371 (2014).
319. McKay, J. A. & Mathers, J. C. Diet induced epigenetic changes and their implications for health. *Acta Physiol. (Oxf)*. **202**, 103–18 (2011).
320. Laurie, D. & Hultén, M. Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann. Hum. Genet.* **49**, 189–201 (1985).
321. Petkov, P. M., Broman, K. W., Szatkiewicz, J. P. & Paigen, K. Crossover interference underlies sex differences in recombination rates. *Trends in Genetics* **23**, 539–542 (2007).
322. Broman, K. W., Rowe, L. B., Churchill, G. A. & Paigen, K. Crossover interference in the mouse. *Genetics* **160**, 1123–1131 (2002).
323. Schneider, J. a, Peto, T. E. a, Boone, R. a, Boyce, A. J. & Clegg, J. B. Direct measurement of the male recombination fraction in the human beta-globin hot spot. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 207–15 (2002).
324. Moens, P. B. Zebrafish: chiasmata and interference. *Genome* **49**, 205–208 (2006).
325. Pigozzi, M. I. & Solari, a J. Recombination nodule mapping and chiasma distribution in spermatocytes of the

- pigeon, *Columba livia*. *Genome* **42**, 308–14 (1999).
326. Pigozzi, M. I. Distribution of MLH1 foci on the synaptonemal complexes of chicken oocytes. *Cytogenet. Cell Genet.* **95**, 129–133 (2001).
327. Calderón, P. L. & Pigozzi, M. I. MLH1-focus mapping in birds shows equal recombination between sexes and diversity of crossover patterns. *Chromosom. Res.* **14**, 605–612 (2006).
328. Zickler, D. & Kleckner, N. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* **33**, 603–754 (1999).
329. Kalat, M., Mayr, B. & Schleger, W. Sequential Counterstainenhanced Banding: Heterochromatin Characterization in The Domestic Cat (*Felis Catus*). *Caryologia* **43**, 183–189 (1990).
330. Pathak, S. & Wurster-Hill, D. Distribution of constitutive heterochromatin in carnivores. *Cytogenet Cell Genet* **18**, 245–54 (1977).
331. Hultén, M. Chiasma distribution at diakinesis in the normal human male. *Hereditas* **76**, 55–78 (1974).
332. Baker, C. L. *et al.* PRDM9 Drives Evolutionary Erosion of Hotspots in *Mus musculus* through Haplotype-Specific Initiation of Meiotic Recombination. *PLoS Genet.* **11**, e1004916 (2015).
333. Neumann, R. & Jeffreys, A. Polymorphism in the activity of human crossover hotspots independent of local DNA sequence variation. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1401–11 (2006).
334. Petes, T. D. Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nat Rev Genet* **2**, 360–369 (2001).
335. Pan, J. *et al.* A hierarchical combination of factors shapes the genome-wide topography of yeast meiotic recombination initiation. *Cell* **144**, 719–731 (2011).
336. Coop, G., Wen, X., Ober, C., Pritchard, J. K. & Przeworski, M. High-Resolution Mapping of Crossovers Recombination Patterns Among Humans. *Science (80-. )*. **319**, 1395–1398 (2008).
337. Paigen, K. *et al.* The recombinational anatomy of a mouse chromosome. *PLoS Genet* **4**, e1000119 (2008).
338. Grey, C., Baudat, F. & de Massy, B. Genome-Wide Control of the Distribution of Meiotic Recombination. *PLoS Biol.* **7**, e35 (2009).
339. Parvanov, E. D., Ng, S. H., Petkov, P. M. & Paigen, K. Trans-regulation of mouse meiotic recombination hotspots by Rcr1. *PLoS Biol* **7**, e36 (2009).
340. Gruhn, J. R., Rubio, C., Broman, K. W., Hunt, P. a. & Hassold, T. Cytological studies of human meiosis: Sex-specific differences in recombination originate at, or prior to, establishment of double-strand breaks. *PLoS One* **8**, 1–15 (2013).
341. Silventoinen, K. *et al.* Heritability of adult body height: a comparative study of twin cohorts in eight countries. *Twin Res.* **6**, 399–408 (2003).
342. Visscher, P. M. *et al.* Assumption-free estimation of heritability from genome-wide identity-by-descent sharing between full siblings. *PLoS Genet.* **2**, 0316–0325 (2006).
343. Wood, A. R. *et al.* Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nat. Genet.* **46**, 1173–86 (2014).
344. Paigen, K. & Petkov, P. Meiotic DSBs and the control of mammalian recombination. *Cell Res* **22**, 1624–1626 (2012).
345. Leu, J. Y., Chua, P. R. & Roeder, G. S. The meiosis-specific Hop2 protein of *S. cerevisiae* ensures synapsis between homologous chromosomes. *Cell* **94**, 375–386 (1998).
346. Santos, J. L. The relationship between synapsis and recombination: two different views. *Heredity (Edinb)*. **82**, 1–6 (1999).
347. Sciarano, R., Rahn, M., Rey-Valzacchi, G. & Solari, A. J. The asynaptic chromatin in spermatocytes of translocation carriers contains the histone variant gamma-H2AX and associates with the XY body. *Hum Reprod* **22**, 142–150 (2007).
348. Homolka, D., Ivanek, R., Capkova, J., Jansa, P. & Forejt, J. Chromosomal rearrangement interferes with meiotic X chromosome inactivation. *Genome Res.* **17**, 1431–1437 (2007).
349. Naumova, A. K. *et al.* Dynamics of Response to Asynapsis and Meiotic Silencing in Spermatocytes from Robertsonian Translocation Carriers. *PLoS One* **8**, e75970 (2013).

350. Heyting, C. *et al.* Identification of two major components of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat. *Eur J Cell Biol* **43**, 148–154 (1987).
351. Pfeifer, C., Thomsen, P. D. & Scherthan, H. Centromere and telomere redistribution precedes homologue pairing and terminal synapsis initiation during prophase I of cattle spermatogenesis. *Cytogenet. Cell Genet.* **93**, 304–314 (2001).
352. Saito, K., Sakai, C., Kawasaki, T. & Sakai, N. Telomere distribution pattern and synapsis initiation during spermatogenesis in zebrafish. *Dev. Dyn.* **243**, 1448–1456 (2014).
353. Roig, I. *et al.* Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes. *Chromosoma* **113**, 22–33 (2004).
354. Pfeifer, C., Scherthan, H. & Thomsen, P. D. Sex-specific telomere redistribution and synapsis initiation in cattle oogenesis. *Dev. Biol.* **255**, 206–215 (2003).
355. Khalil, A. M., Boyar, F. Z. & Driscoll, D. J. Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16583–16587 (2004).
356. Solari, a. J. Sex chromosomes and sex determination in vertebrates. *CRC Press* **168**, 161–168 (1994).
357. Kouznetsova, A., Novak, I., Jessberger, R. & Hoog, C. SYCP2 and SYCP3 are required for cohesin core integrity at diplotene but not for centromere cohesion at the first meiotic division. *J Cell Sci* **118**, 2271–2278 (2005).
358. Qiao, H. *et al.* Interplay between Synaptonemal Complex, Homologous Recombination, and Centromeres during Mammalian Meiosis. *PLoS Genet.* **8**, e1002790 (2012).
359. Franco, M. J., Sciurano, R. B. & Solari, A. J. Protein immunolocalization supports the presence of identical mechanisms of XY body formation in eutherians and marsupials. *Chromosom. Res* **15**, 815–824 (2007).
360. Kono, H. *et al.* Prdm9 polymorphism unveils mouse evolutionary tracks. *DNA Res.* **21**, 315–326 (2014).
361. Buard, J. *et al.* Diversity of Prdm9 zinc finger array in wild mice unravels new facets of the evolutionary turnover of this coding minisatellite. *PLoS One* **9**, e85021 (2014).
362. Parvanov, E. D., Petkov, P. M. & Paigen, K. Prdm9 controls activation of mammalian recombination hotspots. *Science (80-. )*. **327**, 835 (2010).
363. Tomas, C. *et al.* X-chromosome SNP analyses in 11 human Mediterranean populations show a high overall genetic homogeneity except in North-west Africans (Moroccans). *BMC Evol. Biol.* **8**, 75 (2008).
364. Ferragut, J. F., Bentayebi, K., Castro, J. A., Ramon, C. & Picornell, A. Genetic analysis of 12 X-chromosome STRs in Western Mediterranean populations. *International Journal of Legal Medicine* **129**, 253–255 (2015).
365. Adams, S. M. *et al.* The Genetic Legacy of Religious Diversity and Intolerance: Paternal Lineages of Christians, Jews, and Muslims in the Iberian Peninsula. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 725–736 (2008).
366. Picornell, A. *et al.* Genetic variation in the population of Ibiza (Spain): genetic structure, geography, and language. *Hum. Biol.* **68**, 899–913 (1996).
367. Picornell, A., Gómez-Barbeito, L., Tomàs, C., Castro, J. A. & Ramon, M. M. Mitochondrial DNA HVRI variation in Balearic populations. *Am. J. Phys. Anthropol.* **128**, 119–130 (2005).
368. Tomàs, C., Jiménez, G., Picornell, A., Castro, J. A. & Ramon, M. M. Differential maternal and paternal contributions to the genetic pool of Ibiza Island, Balearic Archipelago. *Am. J. Phys. Anthropol.* **129**, 268–278 (2006).
369. Rodríguez, V. *et al.* Genetic sub-structure in western Mediterranean populations revealed by 12 Y-chromosome STR loci. *Int. J. Legal Med.* **123**, 137–141 (2009).
370. López-Escribano, H. *et al.* Balearic archipelago: Three islands, three beta-thalassemia population patterns. *Clin. Genet.* **83**, 175–180 (2013).
371. Egozcue, S. *et al.* Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum. Reprod. Update* **6**, 93–105 (2000).
372. Manhart, C. M. & Alani, E. Roles for mismatch repair family proteins in promoting meiotic crossing over. *DNA Repair (Amst)*. **38**, 84–93 (2016).
373. Cobb, J., Miyaike, M., Kikuchi, A. & Handel, M. A. Meiotic events at the centromeric heterochromatin: Histone H3 phosphorylation, topoisomerase II?? localization and chromosome condensation. *Chromosoma* **108**, 412–425 (1999).

374. Xu, K., Lu, T., Zhou, H., Bai, L. & Xiang, Y. The role of MSH5 C85T and MLH3 C2531T polymorphisms in the risk of male infertility with azoospermia or severe oligozoospermia. *Clin. Chim. Acta* **411**, 49–52 (2010).
375. Terribas, E. *et al.* Changes in the expression profile of the meiosis-involved mismatch repair genes in impaired human spermatogenesis. *J. Androl.* **31**, 346–357 (2010).
376. Ji, G. *et al.* Common variants in mismatch repair genes associated with increased risk of sperm DNA damage and male infertility. *BMC Med.* **10**, 49 (2012).
377. Mandon-Pépin, B. *et al.* Genetic investigation of four meiotic genes in women with premature ovarian failure. *Eur. J. Endocrinol.* **158**, 107–115 (2008).
378. Carney, J. P. *et al.* The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: Linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* **93**, 477–486 (1998).
379. Petrini, J. H. & Stracker, T. H. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol* **13**, 458–462 (2003).
380. Desjardins, S., Beauparlant, J. C., Labrie, Y., Ouellette, G. & Durocher, F. Variations in the NBN/NBS1 gene and the risk of breast cancer in non-BRCA1/2 French Canadian families with high risk of breast cancer. *BMC Cancer* **9**, 181 (2009).
381. Berardinelli, F., di Masi, A. & Antoccia, A. NBN Gene Polymorphisms and Cancer Susceptibility: A Systemic Review. *Curr. Genomics* **14**, 425–40 (2013).
382. Varon, R. *et al.* Mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res.* **61**, 3570–3572 (2001).
383. Steffen, J. *et al.* Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland. *Int. J. Cancer* **111**, 67–71 (2004).
384. di Masi, A. *et al.* The R215W mutation in NBS1 impairs gamma-H2AX binding and affects DNA repair: molecular bases for the severe phenotype of 657del5/R215W Nijmegen breakage syndrome patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 835–40 (2008).
385. Yang, Y. *et al.* Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1502–11 (2013).