Biologia de la reproducció
Vol. 16, p. 9-14 (2019)

DISTRIBUCIÓ DELS CROMOSOMES EN L'EIX CENTRE-PERIFÈRIA DEL NUCLI DE LES CÈL·LULES ESPERMATOGÈNIQUES DE *MUS MUSCULUS*

[1]Mireia Solé, [1]Joan Blanco, [2]Debora Gil, [3]Oliver Valero, [1]Ester Anton, [4]Gothami Fonseka, [4]Richard Frodsham, [1]Francesca Vidal, [1]Zaida Sarrate

[1]Genetics of Male Fertility Group (http://gmfgroup.wixsite.com/gmfgroup). Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona. zaida.sarrate@uab.cat [2]Centre de visió per computació. Departament de ciències de la computació. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona. [3]Universitat Autònoma de Barcelona, Servei d'Estadística Aplicada, Bellaterra, Barcelona. [4]Cytocell Ltd, Technopark, Newmarket Road, Cambridge.

Resum

En cèl·lules somàtiques, el posicionament radial dels cromosomes no és aleatori i està condicionat pel número de gens, l'activitat transcripcional i el contingut de guanina-citosina. Aquestes associacions evidencien l'existència d'una relació funcional entre la territorialitat cromosòmica i l'expressió gènica. Disposem de poques dades sobre el posicionament cromosòmic durant l'espermatogènesi, no obstant, alguns autors suggereixen que aquest podria condicionar el correcte desenvolupament del procés espermatogènic i tenir implicacions en l'expressió gènica de l'embrió. L'objectiu d'aquest estudi va ser descriure el posicionament radial cromosòmic en cèl·lules germinals i espermatozoides i identificar els factors que el condicionen. Es va utilitzar teixit testicular procedent d'individus de la soca C57BL/6J de Mus musculus. La metodologia aplicada va consistir en: i) fixació cel·lular preservant la tridimensionalitat nuclear, ii) hibridació in situ fluorescent de tots els cromosomes de ratolí, iii) captura d'imatges amb microscòpia confocal, iv) identificació cel·lular mitjançant immunofluorescència, v) anàlisi d'imatges i vi) anàlisi estadística. Aquesta metodologia va permetre analitzar el posicionament radial cromosòmic en cinc estadis cel·lulars: espermatogoni-espermatòcit I a l'estadi de preleptotè inicial, espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè, espermatòcits I a l'estadi de paquitè, espermàtides rodones i espermatozoides. Els resultats van posar de manifest que el posicionament radial no és aleatori i que es veu condicionat per l'activitat gènica dels cromosomes. Concretament, la part interna del nucli va mostrar una concentració de cromatina superior al valor esperat i més volum cromosòmic d'aquells cromosomes amb més quantitat de gens implicats en el procés de l'espermatogènesi o espermiogènesi (en el cas de les espermàtides rodones). Finalment, també es va observar que els cromosomes sexuals presentaven un posicionament radial dinàmic, directament relacionat amb els processos d'inactivació transcripcional que experimenten aquests cromosomes durant l'espermatogènesi.

Paraules clau: Territoris cromosòmics, FISH, espermatogènesi, anàlisi tridimensional.

Abstract

In somatic cells, the radial positioning of the chromosomes is not random and is conditioned by the quantity of genes, the transcriptional activity and the content of guanine-cytosine. These associations demonstrate the existence of a functional relationship between chromosomal territoriality and gene expression. We have little data on chromosomal positioning during spermatogenesis, however, some authors suggest that this could condition the correct development of spermatogenesis and have implications for the gene expression of the embryo. The objective of this study was to describe chromosomal radial positioning in germ cells and sperm cells and to identify the factors that condition it. Testicular tissue from individuals of the C57BL/6J strain of *Mus musculus* was used. The methodology used consisted of: i) cell fixation preserving nuclear tridimensionality, ii) fluorescence in situ hybridization of all mouse chromosomes, iii) capturing images with confocal microscopy, iv) cellular identification through immunofluorescence, v) image analysis and vi) statistical analysis. This methodology allowed to analyze the chromosomal radial positioning in five stages: spermatogonia-early preleptotene spermatocytes I, spermatocytes I at mid preleptotene-zygotene stages, spermatocytes I at pachytene stage, round spermatids and spermatozoa. The results showed that the radial positioning is not random and it is conditioned by chromosome gene activity. Specifically, the inner part of the nucleus showed a higher concentration of chromatin than the expected value and the most chromosome volume of those chromosomes with the highest number of genes involved in the process of spermatogenesis or spermiogenesis (in the case of round spermatids). Finally, we have observed that sex chromosomes present a dynamic radial positioning during spermatogenesis, directly related to the processes of transcriptional inactivation they undergo throughout the spermatogenetic process.

Key words: Chromosome territories, FISH, spermatogenesis, three-dimensional analysis.

INTRODUCCIÓ

En les últimes dècades, nombrosos estudis han demostrat que els cromosomes ocupen regions no aleatòries del nucli anomenades territoris cromosòmics.

En les cèl·lules somàtiques s'ha observat una distribució radial específica i evolutivament conservada dels cromosomes, que està directament relacionada amb algunes característiques intrínseques dels cromosomes (revisat per Sarrate *et al.*, 2018). Concretament, els cromosomes amb un alt contingut gènic es localitzen preferentment a la part interna del nucli, mentre que els que tenen una baixa densitat gènica es localitzen a la perifèria nuclear (Bridger *et al.*, 2000; Boyle *et al.*, 2001; Tanabe *et al.*, 2002; Cremer *et al.*, 2003). Així mateix, s'ha observat una localització preferent dels cromosomes amb una alta activitat gènica a la zona interna del nucli (Goetze *et al.*, 2007; Cremer i Cremer 2010) i, de manera similar, una correlació de la disposició radial dels cromosomes amb el contingut de guanina-citosina (GC) i l'activitat transcripcional (Federico *et al.*, 2008; Cremer i Cremer 2010).

Tenint en compte aquestes evidències i veient l'estreta relació funcional que tenen els paràmetres cromosòmics que defineixen el posicionament radial dels cromosomes amb l'activitat gènica, diversos autors han suggerit que la distribució radial específica dels cromosomes podria veure's implicada en la regulació de l'expressió gènica. En aquest sentit, el fet de concentrar la cromatina amb més dominis potencialment actius a la zona interna del nucli afavoriria l'accessibilitat dels elements reguladors de la transcripció (Iborra *et al.,* 1996; Ioannou i Griffin 2011; Meaburn i Misteli 2007).

D'altra banda, s'han observat alteracions en el patró del posicionament cromosòmic en diverses patologies. Per exemple, Cremer *et al.,* (2003) descriuen diferents patrons de posicionament dels cromosomes 18 i 19 entre línies cel·lulars normals i tumorals. També, s'ha observat una alteració del posicionament cromosòmic en cèl·lules amb una trisomia del cromosoma 21 (Kemeny *et al.,* 2018).

En conjunt, aquestes dades indiquen l'existència d'una relació funcional entre el posicionament radial dels cromosomes i l'expressió gènica. Tan és així que diversos autors han proposat que la distribució radial dels cromosomes en les cèl·lules espermatogèniques podria condicionar el correcte desenvolupament de l'espermatogènesi (Garagna *et al.,* 2001; Ioannou i Griffin 2011; Marshall 2003) i, en el cas de la organització dels territoris cromosòmics en els espermatozoides, tenir implicacions epigenètiques en l'expressió gènica de l'embrió (Greaves *et al.*, 2003; Zalensky i Zalenskaya 2007; Mudrak *et al.*, 2012).

No obstant, hi ha poques dades sobre la posició radial dels cromosomes al llarg de l'espermatogènesi. Garagna i col·laboradors (2001) descriuen un posicionament dels cromosomes 5, 11, 15 i 17 més perifèric que els cromosomes 13 i 16 i un posicionament perifèric dels cromosomes X i Y en el nucli dels espermatogonis de ratolí. Pel que fa el nucli dels espermatozoides, diversos autors han observat una distribució radial no aleatòria de certs cromosomes en diferents espècies de mamífers (revisat per Sarrate *et al* 2018). Tot i això, la majoria d'estudis es focalitzen en cromosomes concrets i en certs estadis del procés de l'espermatogènesi. A més, la variabilitat existent entre les metodologies aplicades en els diferents estudis no permet posar en comú els resultats obtinguts ni establir relacions entre ells.

Tot i les poques dades que es tenen de la distribució radial dels cromosomes en les cèl·lules germinals masculines i els espermatozoides, alguns autors han observat alteracions de la distribució radial dels cromosomes en individus que presenten un procés d'espermatogènesi alterat o problemes de fertilitat. Concretament, Finch i col·laboradors (2008) han evidenciat que els centròmers dels cromosomes X, Y i 18 es localitzen a la part central del nucli dels espermatozoides humans de donants control i, en canvi, els cromosomes sexuals es distribueixen aleatòriament en el nucli dels espermatozoides d'homes infèrtils. També, s'ha observat una variació en el posicionament radial del centròmer del cromosoma 17 i en la formació del cromocentre en espermatozoides immòbils, respecte dels mòbils (Alladin *et al.,* 2013).

Així doncs, tenint en compte les diverses evidències que indiquen l'existència d'una relació entre la territorialitat cromosòmica al llarg de l'eix centre-perifèria del nucli i la fertilitat masculina, l'objectiu d'aquest estudi va ser descriure el posicionament radial dels cromosomes en les cèl·lules germinals i els espermatozoides de ratolí i identificar els factors que el condicionen.

MATERIALS I MÈTODES

Es van utilitzar mostres biològiques de teixit testicular procedents de quatre individus de l'espècie *Mus musculus*. La soca utilitzada va ser C57BL/6J, la qual mostra un cariotip normal i una taxa de fertilitat dins dels paràmetres de normalitat.

Disgregació i fixació cel·lular

El teixit testicular es va disgregar enzimàticament i les cèl·lules obtingudes es van adherir en portaobjectes polilisinitzats. Posteriorment, es va realitzar un procés de fixació amb 4 % de paraformaldehid i un tractament de permeabilització amb àcid clorhídric 0,1 N i nitrogen líquid tot preservant la tridimensionalitat de les cèl·lules.

Identificació cromosòmica

Després de tractar les preparacions amb 0,005 % pepsina, es va seguir el protocol d'hibridació in situ fluorescent (FISH) detallat en el kit personalitzat Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome Murine System™ (Cytocell Ltd, Cambridge, UK). Aquest kit utilitza, en un mateix portaobjectes, set combinacions diferents de tres sondes de pintat cromosòmic marcades amb un fluorocrom diferent cadascuna (Aqua DEAC, FITC, Texas Red) delimitades en set regions independents. D'aquesta manera es poden identificar tots els cromosomes del cariotip de ratolí simultàniament en el mateix portaobjectes.

Identificació del tipus cel·lular

Amb la finalitat de distingir els diferents tipus cel·lulars presents en el procés de l'espermatogènesi, es va identificar la proteïna SYCP3 (synaptonemal complex protein 3), la histona H1T (testis-specific histone) i la proteïna específica de cèl·lules germinals TRA98 mitjançant la realització de dues rondes de tinció per immunofluorescència. La identificació es va realitzar mitjançant els anticossos primaris *rabbit anti-SCP3*, *guinea pig anti-H1T* i *rat anti-TRA98*, i els anticossos secundaris *anti-rabbit FITC*, *anti-guinea pig Cy3* i *anti-rat FITC*. La presència, l'absència i/o el diferent patró de marcatge d'aquestes proteïnes i els diferents patrons de tinció amb DAPI, van permetre classificar els nuclis en cinc estadis cel·lulars: espermatogoni-preleptotè inicial, espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè, espermatòcits I a l'estadi de paquitè, espermàtides rodones i espermatozoides.

Captura i anàlisi d'imatges

Després de cada ronda d'hibridació, es van capturar seccions òptiques seriades de tots els tipus cel·lulars amb la utilització del microscopi confocal TCS-SP5 acoblat a un sistema d'anàlisi d'imatges (LAS AF-1.8.1). Les imatges seriades de cadascun dels nuclis es van processar mitjançant scripts dissenyats dins l'entorn dels programaris Fiji (Schindelin *et al.*, 2013)i Matlab R2013b per tal d'obtenir la seva reconstrucció tridimensional i extreure'n dades numèriques que permetessin descriure el posicionament radial dels cromosomes. Concretament, es va dividir el volum nuclear en tres zones concèntriques de mateix gruix (zona externa, zona mitja i zona interna) i, tot seguit, es va calcular el percentatge de volum cromosòmic present a cada zona (**Figura 1**).

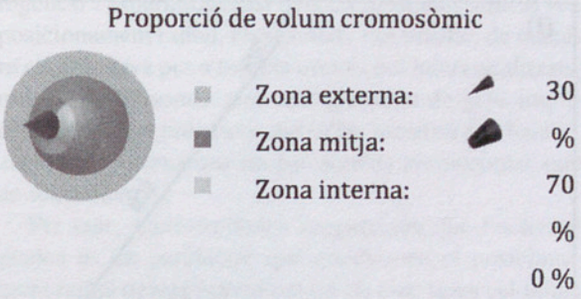


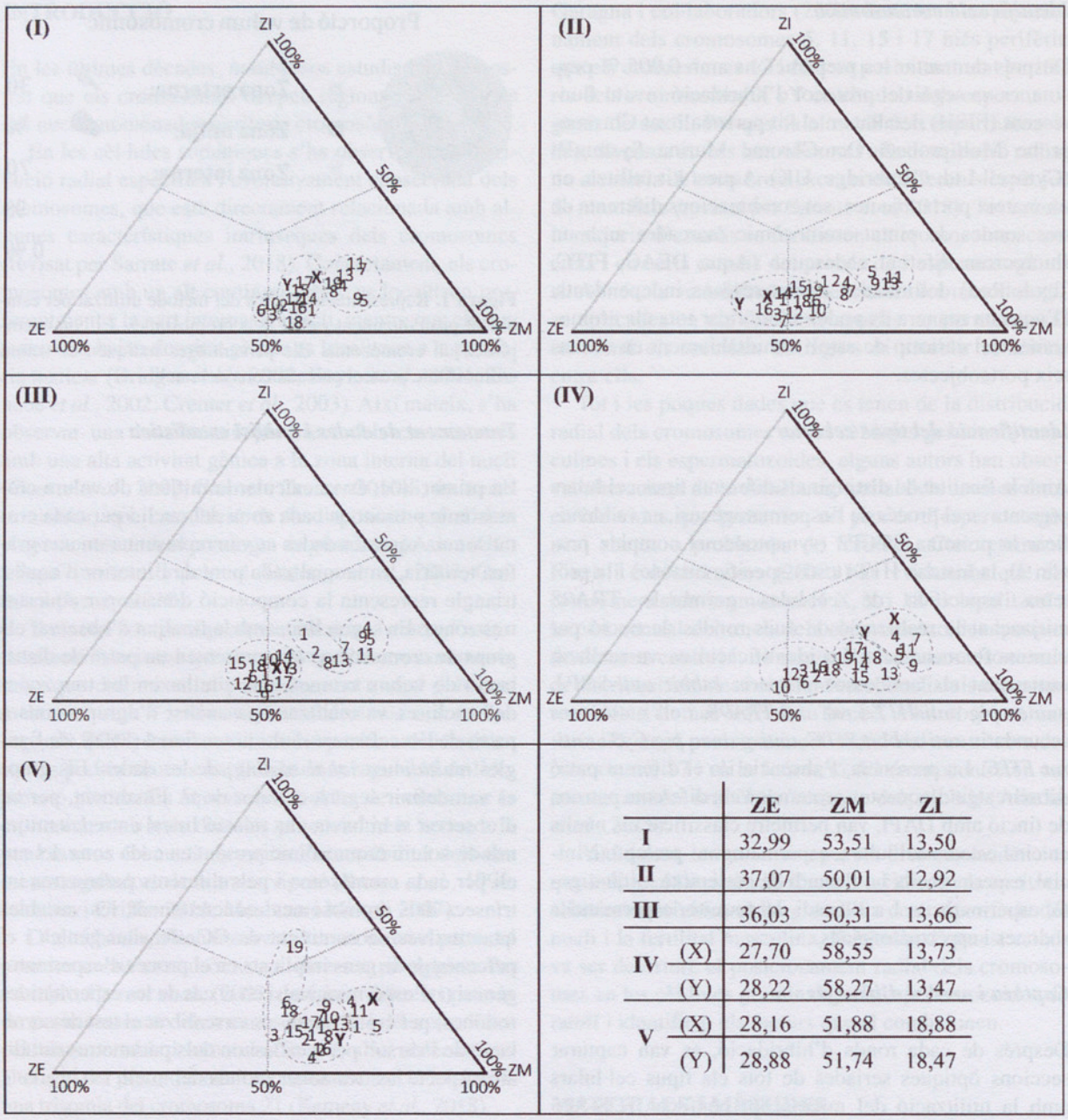
Figura 1. Representació gràfica del mètode utilitzat per establir el posicionament radial dels cromosomes. El con exemplifica un cromosoma. Els percentatges indiquen el volum cromosòmic present en cada zona del nucli.

Tractament de dades i anàlisi estadística

En primer lloc, es va calcular la mitjana de volum cromosòmic present en cada zona del nucli i per cada cromosoma. Aquestes dades es van representar en una gràfica ternària, en la qual cada punt de l'interior d'aquest triangle representa la composició donada per aquestes tres zones. En segon lloc, amb la finalitat d'observar els grups de cromosomes que presenten un patró de distribució de volum cromosòmic similar en les tres zones del nucli, es va realitzar una anàlisi d'agrupaments a partir de l'escalament multidimensional (MDS, de l'anglès *multidimensional scaling*) de les dades. Els grups es van definir segons el valor de r^2. Finalment, per tal d'observar si hi havia una relació lineal entre les mitjanes de volum cromosòmic present en cada zona del nucli per cada cromosoma i pels diferents paràmetres intrínsecs dels cromosomes -concretament, les variables quantitatives de contingut de GC, densitat gènica i el percentatge de gens implicats en el procés d'espermatogènesi (i d'espermiogènesi en el cas de les espermàtides rodones) per cromosoma- es va realitzar el test de correlació de Pearson per a cadascun dels paràmetres estudiats respecte les tres zones radials del nucli.

RESULTATS

La metodologia desenvolupada va permetre determinar el posicionament radial de tots els cromosomes del genoma de ratolí en cinc estadis cel·lulars que cobreixen la totalitat del procés espermatogènic: I) espermatogoni-espermatòcit I a l'estadi de preleptotè inicial, II) espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè, III) espermatòcits I a l'estadi de paquitè, IV) espermàtides rodones i V) espermatozoides. Es van analitzar una mitjana de 1200±600,66 territoris cromosòmics i 178,8±80,06 nuclis per cada tipus cel·lular. Els resultats de la distribució radial de cadascun dels cromosomes en



		ZE	ZM	ZI
I		32,99	53,51	13,50
II		37,07	50,01	12,92
III		36,03	50,31	13,66
IV	(X)	27,70	58,55	13,73
	(Y)	28,22	58,27	13,47
V	(X)	28,16	51,88	18,88
	(Y)	28,88	51,74	18,47

Figura 2: Representació gràfica de la distribució radial de cadascun dels cromosomes als diferents estadis cel·lulars estudiats: **I)** espermatogoni-espermatòcit I a l'estadi de preleptotè inicial, **II)** espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè, **III)** espermatòcits I a l'estadi de paquitè, **IV)** espermàtides rodones i **V)** espermatozoides. Amb línies discontínues es representen els resultats de l'anàlisi d'agrupaments dels cromosomes en funció de la similitud dels percentatges de volum cromosòmic present en les zones externa (ZE), mitja (ZM) i interna (ZI) del nucli per a cada cromosoma. Al requadre inferior dret es descriu la mitjana de la distribució radial del volum cromosòmic total al nucli dels diferents estadis cel·lulars.

funció del volum cromosòmic en les tres zones del nucli es representen gràficament a la **Figura 2.**

Es va observar una correlació positiva i estadísticament significativa entre el contingut de GC dels cromosomes i el seu posicionament intern en el cas dels espermatogoni-espermatòcit I a l'estadi de preleptotè inicial (p=0,014), els espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè (p<0,001), els espermatòcits I a l'estadi de paquitè (p=0,029) i els espermatozoides (p=0,009). De manera similar, es va observar una correlació positiva i estadísticament significativa entre la densitat gènica dels cromosomes i el seu posicionament intern en el cas

dels espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè (p<0,001) i els espermatòcits I a l'estadi de paquitè (p=0,002). Finalment, es va observar una correlació positiva i estadísticament significativa entre la quantitat de gens implicats en els processos d'espermatogènesi i d'espermiogènesi de cada cromosoma i el seu posicionament intern en tots els casos estudiats: espermatogoni-espermatòcit I a l'estadi de preleptotè inicial (p=0,001), espermatòcits I a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè (p<0,001), espermatòcits I a l'estadi de paquitè (p=0,002), espermàtides rodones (p<0,001, en ambdós casos) i espermatozoides (p<0,001).

DISCUSSIÓ

La mitjana de percentatge de volum cromosòmic present en cada zona del nucli –externa, mitja i interna– va permetre conèixer el posicionament radial dels diferents cromosomes a cada tipus cel·lular estudiat. Els resultats van revelar una clara tendència de posicionament no aleatori dels cromosomes respecte l'eix centre-perifèria del nucli en els cinc intervals cel·lulars estudiats.

El mètode de partició del nucli dividint el seu radi en tres segments iguals resulta en la formació de tres zones nuclears concèntriques de diferent volum: la zona externa, la qual ocupa un 70,37% del volum nuclear total; la zona mitja, la qual ocupa un 25,93% del volum nuclear total i la zona interna, la qual ocupa un 3,70% del volum nuclear total. En l'hipotètic cas de que el volum cromosòmic estigués repartit equitativament dins el volum nuclear, s'esperarien uns percentatges de volum cromosòmic total a cada zona del nucli similars a aquests valors. No obstant, en els cinc intervals cel·lulars analitzats es va observar la presència de més volum cromosòmic a la zona mitja i interna del nucli respecte el volum esperat. De fet, la part interna del nucli és una zona considerada de caire transcripcionalment activa (Ioannou i Griffin 2011; Meaburn i Misteli 2007). Possiblement, l'expressió gènica necessària per dur a terme el correcte desenvolupament del procés de l'espermatogènesi requereix aquesta elevada concentració de la cromatina a la part interna del nucli per tal d'afavorir l'accessibilitat dels elements reguladors de la transcripció talment com s'ha suggerit en cèl·lules somàtiques en interfase (Ioannou i Griffin 2011; Meaburn i Misteli 2007).

Donant suport a aquesta interpretació, en general, els nostres resultats van evidenciar un posicionament intern preferent d'aquells cromosomes amb un alt contingut de GC i també d'aquells cromosomes amb una elevada densitat gènica, ambdós paràmetres indirectament vinculats amb l'expressió gènica. A més, quan de manera més específica, es va analitzar la correlació entre la quantitat de gens implicats en els processos d'espermatogènesi i espermiogènesi dels cromosomes amb el seu posicionament radial, els resultats van revelar, de manera significativa per a tots els estadis cel·lulars analitzats, que els cromosomes amb més quantitat de gens implicats en aquests processos destacats mostren una localització més interna que no pas aquells cromosomes que en tenen menys.

Per tant, aquestes dades suggereixen que l'activitat gènica és un paràmetre que condiciona el posicionament radial dels cromosomes en els cinc tipus cel·lulars estudiats. Aquesta interpretació coincideix amb les dades descrites en el nucli de les cèl·lules somàtiques (Bridger *et al.*, 2000, Boyle *et al.*, 2001; Tanabe *et al.*, 2002, Cremer *et al.*, 2003, Goetze *et al.*, 2007; Cremer i Cremer 2010).

A més, un altre indici de que l'activitat gènica és un paràmetre que condiciona el posicionament radial dels cromosomes rau en el comportament dels cromosomes sexuals. Els resultats de la distribució radial del volum cromosòmic obtinguts en aquest treball evidencien que aquests cromosomes experimenten una dinàmica de posicionament específica directament relacionada amb el seu estat d'activació; la migració que experimenten els cromosomes sexuals cap a la zona externa a l'estadi de preleptotè mitjà-zigotè i que es manté durant l'estadi de paquitè coincideix amb el seu estat d'inactivació. En canvi, en el cas de les espermàtides rodones, els cromosomes sexuals ara es localitzen a la part interna del nucli coincidint amb la reactivació de diversos gens continguts en aquests cromosomes (revisat a Turner 2010).

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat finançat pels projectes CF-180034 de la Universitat Autònoma de Barcelona i SAF2016-77165-P del *Ministerio de Economía y Competitividad,* Espanya.

BIBLIOGRAFIA

Boyle, S. [*et al.*] (2001). «The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells». *Hum. mol. gen,* vol. 10, núm. 3, p. 211-9.

Bridger, J.M. [*et al.*] (2000). «Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts». *Current Biology*, vol. 10, núm. 3, p. 149-152.

Cremer, T., Cremer, M. (2010). «Chromosome territories». *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2: a003889.

Cremer, M. [*et al.*]. (2003). «Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in

normal and tumor cell nuclei». *The Journal of cell biology*, vol. 162, núm 5 p. 809-820.

Croft, J.A. [*et al.*]. (1999). «Differences in the Localization and Morphology of Chromosomes in the Human Nucleus». *The Journal of Cell Biology*, vol. 145, núm 6, p. 1119-1131.

Federico, C. [*et al.*]. (2008). «The radial arrangement of the human chromosome 7 in the lymphocyte cell nucleus is associated with chromosomal band gene density». *Chromosoma*, vol. 117, núm 4, p. 399-410.

Finch, K.A. [*et al.*]. (2008). «Nuclear organization in human sperm: preliminary evidence for altered sex chromosome centromere position in infertile males». *Human Reproduction*, vol. 23, núm 6, p. 1263-1270.

Foster, H.A., Bridger, J.M. (2005). «The genome and the nucleus: a marriage made by evolution». *Chromosoma*, vol. 114, núm 4, p. 212-229.

Garagna, S. [*et al.*]. (2001). «Alteration of nuclear architecture in male germ cells of chromosomally derived subfertile mice». *Journal of Cell Science*, vol. 14, núm 1, p. 4429-4434.

Goetze, S. [*et al.*]. (2007). «The Three-Dimensional Structure of Human Interphase Chromosomes Is Related to the Transcriptome Map». *Molecular and Cellular Biology*, vol. 27, núm 12, p. 4475-4487.

Greaves, I.K. [*et al.*]. (2003). «Conservation of chromosome arrangement and position of the X in mammalian sperm suggests functional significance». *Chromosome research*, vol. 11, núm 5, p. 503-512.

Iborra, F.J. [*et al.*]. (1996). «Active RNA polymerases are localized within discrete transcription factories' in human nuclei». *Journal of cell science*, vol. 109, p.1427–36.

Ioannou, D., Griffin, D.K. (2011). «Male fertility, chromosome abnormalities, and nuclear organization». *Cytogenetic and Genome Research*, vol. 133, núm 2-4, p. 269–279.

Kemeny, S. [*et al.*]. (2018). «Spatial organization of chromosome territories in the interphase nucleus of trisomy 21 cells». *Chromosoma*, vol. 127, núm 2, p. 247–259.

Marshall, W.F. (2003). «Gene expression and nuclear architecture during development and differentiation». *Mechanisms of Development*, vol. 120, núm 11, p. 1217–1230.

Meaburn, K.J., Misteli, T. (2007). Cell biology: «Chromosome territories». *Nature*, vol. 445, núm 7126, p. 379–781.

Mudrak, O.S. [*et al.*]. (2012). «Positioning of Chromosomes in Human Spermatozoa Is Determined by Ordered Centromere Arrangement». *PLoS ONE*, vol. 7, núm 12

Sarrate, Z. [*et al.*]. (2018). «Chromosome positioning and male infertility : it comes with the territory». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 35, núm 11, p. 1929-1938

Schindelin, J. [*et al.*]. (2013). «Fiji - an Open Source platform for biological image analysis». *Nat. Methods* 9: 676–682.

Tanabe, H. [*et al.*] (2002). «Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications». *Mutation research*, vol. 504, núm 1-2, p. 37–45.

Turner, J.M.A. (2010). «Meiotic sex chromosome inactivation». *Current Biology*, vol. 20, núm 22, p.962–963.

Zalensky, A., Zalenskaya, I. (2007). «Organization of chromosomes in spermatozoa: an additional layer of epigenetic information?» *Biochemical Society transactions*, vol. 35, núm 3, p. 609–11.