

Tesi Doctoral

Anàlisi del contingut cromosòmic
en espermatozoides d'individus
portadors de translocacions:
relació entre efecte
intercromosòmic i segregació

Anna Godo Pla

2015

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Facultat de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona

**Anàlisi del contingut cromosòmic en espermatozoides
d'individus portadors de translocacions:
relació entre efecte intercromosòmic i segregació**

Anna Godo Pla

Memòria presentada per optar al Grau de Doctor

per la Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, 2015

Directors:

Dra. Ester Anton Martorell, Dr. Joan Blanco Rodríguez

i Dra. Francesca Vidal Domínguez

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

CERTIFIQUEN:

Que Anna Godo Pla ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació que s'exposa en la memòria titulada "Anàlisi del contingut cromosòmic en espermatozoides d'individus portadors de translocacions: relació entre efecte intercromosòmic i segregació" per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

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

I perquè així consti, signen el present certificat.

Bellaterra, 30 de juliol de 2015

Dra. Ester Anton Martorell Dr. Joan Blanco Rodríguez Dra. Francesca Vidal Domínguez

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

- Projecte UAB CF-180034, Universitat Autònoma de Barcelona
- SGR2009-0282, Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya.
- SAF2010-22241, Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España.
- SGR2014-524, Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya.

Anna Godo Pla ha estat beneficiària d'una beca predoctoral per a la formació de personal investigador novell (FI-DGR) concedida per l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya.

Als meus pares Lluís i Mercè,
per sempre donar-me suport en les meves decisions.

A l'Arnau,
per compartir tots els moments amb mi
i aconseguir que tot sigui possible.

"Quan crèiem que teníem totes les respostes, de sobte, van canviar totes les preguntes" Mario Benedetti (1920-2009).

ÍNDEX

1. Introducció	1
1.1. Espermatogènesi	3
1.1.1. Proliferació mitòtica	3
1.1.2. Meiosi	3
1.1.3. Espermiogènesi	7
1.2. Punts de control de l'espermatogènesi	8
1.2.1. Punts de control de l'etapa de proliferació mitòtica	8
1.2.2. Punts de control meiòtics	11
1.2.3. Punt de control post-meiòtic	13
1.2.4. Factors que alteren l'efectivitat dels punts de control	13
1.3. Anomalies genètiques com a causa d'infertilitat masculina	14
1.4. Translocacions cromosòmiques equilibrades	16
1.4.1. Translocacions recíproques	16
1.4.2. Translocacions Robertsonianes	17
1.4.3. Translocacions complexes	18
1.5. Risc reproductiu en portadors de translocacions cromosòmiques equilibrades	18
1.5.1. Segregació meiòtica dels cromosomes reorganitzats	19
1.5.2. Efecte Intercromosòmic	28
1.5.3. Relació entre segregació dels cromosomes reorganitzats i ICE	30
1.6. Arquitectura nuclear en espermatozoides	31
2. Objectius	35
3. Material i mètodes	39
3.1. Anàlisi del contingut cromosòmic	41
3.1.1. Mostres biològiques	41
3.1.2. Processament i emmagatzematge de les mostres	42
3.1.3. FISH seqüencial en espermatozoides	43

3.1.4.	Anàlisi estadística.....	57
3.2.	Anàlisi dels territoris cromosòmics.....	58
3.2.1.	Sistema de captura de les imatges.....	58
3.2.2.	Mètode d'anàlisi de les imatges	61
3.2.3.	Anàlisi estadística.....	63
4.	Resultats.....	65
4.1.	Individus portadors de translocacions recíproques	67
4.1.1.	Resultats de segregació en les poblacions d'espermatozoides analitzades	67
4.1.2.	Article I: <i>Accumulation of numerical and structural imbalances in spermatozoa from reciprocal translocation carriers.....</i>	72
4.2.	Individus portadors de translocacions Robertsonianes	83
4.2.1.	Resultats de segregació en les poblacions d'espermatozoides analitzades	83
4.2.2.	Article II: <i>Altered segregation pattern and numerical chromosome abnormalities interrelate in sperm from Robertsonian translocation carriers</i>	87
4.3.	Individu portador d'una triple translocació.....	98
4.3.1.	Resultats de segregació en les poblacions d'espermatozoides analitzades	98
4.3.2.	Article III: <i>Sequential FISH allows the determination of the segregation outcome and the presence of numerical anomalies in spermatozoa from a $t(1;8;2)(q42;p21;p15)$ carrier.....</i>	102
4.4.	Posicionament cromosòmic en nuclis d'espermatozoides.....	112
5.	Discussió	115
5.1.	Consideracions metodològiques.....	117
5.1.1.	Anàlisi del contingut cromosòmic en espermatozoides.....	117
5.1.2.	Anàlisi de territoris cromosòmics.....	118
5.2.	Segregació alterada en espermatozoides amb anomalies cromosòmiques numèriques.....	120
5.3.	Progressió meiótica alterada.....	124
5.3.1.	Punt de control de paquitè: heterosinapsi.....	124
5.3.2.	Punt de control SAC: posicionament dels cromosomes a la placa metafàsica	125
5.3.3.	Punt de control post-meiótic	128

5.3.4. Estudis en oòcits i embrions.....	128
6. Conclusions.....	131
7. Bibliografia	135
8. Annex.....	149
8.1. Patró de segregació en espermatozoides aneuploides segons el cromosoma afectat.....	151
8.1.1. Resultats en individus portadors de translocacions recíproques.....	151
8.1.2. Resultats en individus portadors de translocacions Robertsonianes.....	153
8.1.3. Resultats en l'individu portador d'una triple translocació	155
8.2. Dades de posicionament cromosòmic en nuclis amb diferents genotips	157
8.2.1. Valors de posicionament de cada cromosoma	157
8.2.2. Representacions gràfiques del posicionament de cada cromosoma en els diferents genotips.....	160
Agraïments	167

1. Introducció



1.1. Espermatogènesi

El procés biològic mitjançant el qual les cèl·lules germinals diploides esdevenen espermatozoides s'anomena espermatogènesi. La primera etapa d'aquest procés consisteix en la proliferació mitòtica dels espermatogonis. La segona etapa és la divisió meiòtica, durant la qual té lloc la recombinació entre els cromosomes homòlegs i la reducció a un contingut cromosòmic haploide. La tercera etapa implica una sèrie de canvis morfològics en les espermàtides, que es diferenciaran en espermatozoides.

1.1.1. Proliferació mitòtica

L'etapa de proliferació mitòtica fa referència a les divisions de les cèl·lules mare d'espermatogonis o espermatogonis A_{foscos} que es localitzen al compartiment basal dels túbuls seminífers. Aquestes cèl·lules s'autorenoven mitjançant divisions mitòtiques amb la finalitat de mantenir una reserva de cèl·lules mare germinals. Sota determinats estímuls hormonals, algunes divisions dels espermatogonis A_{foscos} originaran els espermatogonis $A_{\text{pàl·lids}}$.

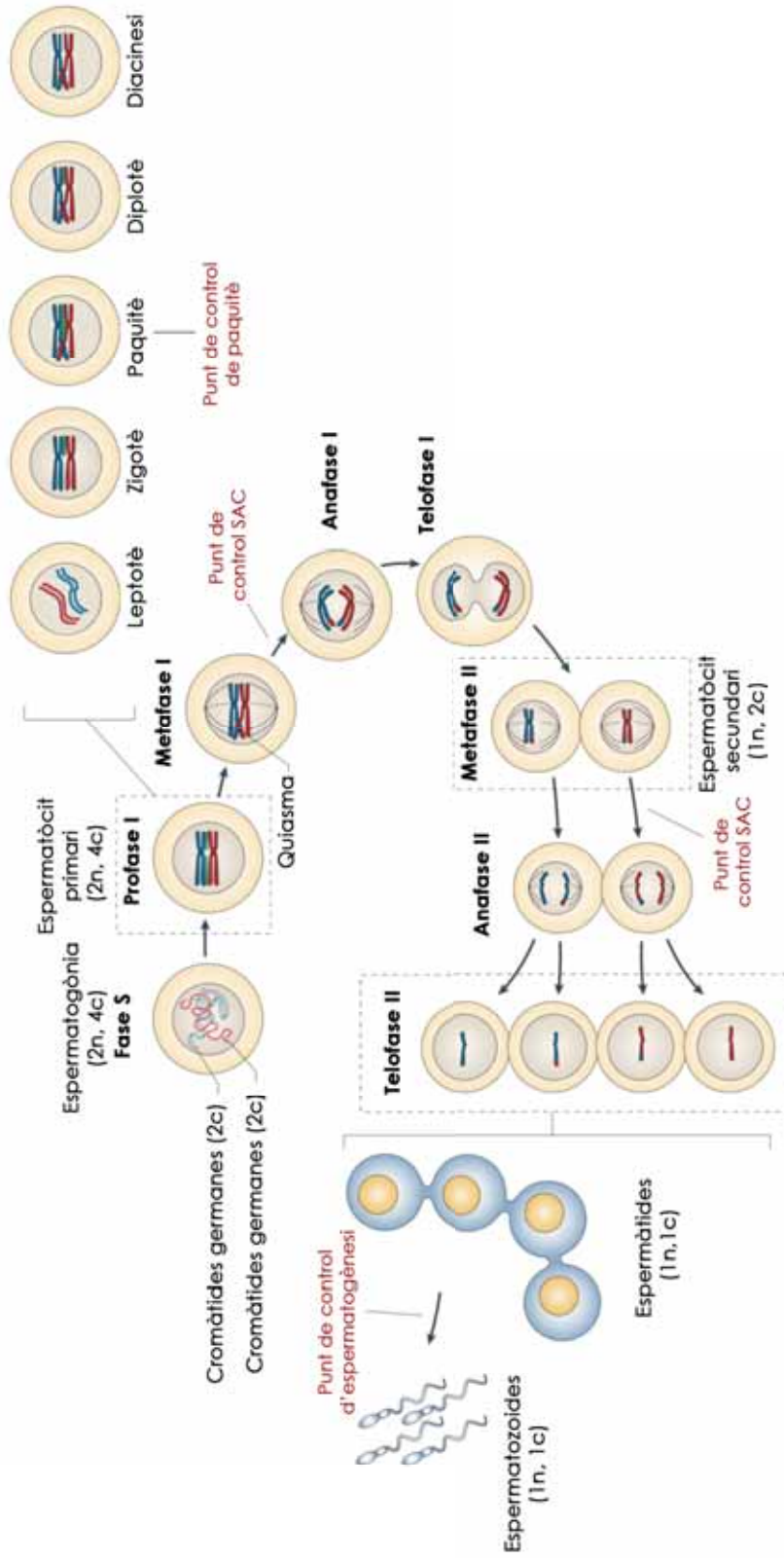
La majoria dels espermatogonis $A_{\text{pàl·lids}}$ també s'autorenoven per mantenir una reserva constant en els túbuls seminífers. No obstant, alguns d'ells són activats per donar lloc als espermatogonis B (un espermatogoni $A_{\text{pàl·lid}}$ origina dos espermatogonis B). La divisió mitòtica d'un espermatogoni B dona lloc a la formació de dos espermatòcits primaris meiòticament competents. És important remarcar que tots els tipus cel·lulars diferenciats a partir d'un espermatogoni $A_{\text{pàl·lid}}$ es mantenen connectats per canals citoplasmàtics (revisat per Amann 2008).

1.1.2. Meiosi

La meiosi consisteix en dues divisions cel·lulars consecutives precedides d'una fase de replicació del DNA, la qual permet passar d'un espermatòcit primari diploide ($2n$, 4 cromàtides) a quatre espermàtides haploides ($1n$, 1 cromàtide).

Durant la primera divisió meiòtica (reduccional) el contingut cromosòmic es redueix a la meitat. La profase I és la primera etapa de la meiosi, i és també la més llarga de tot el procés. Es divideix en cinc estadis anomenats leptotè, zigotè, paquitè, diplotè i diacinesi (Figura 1.1):

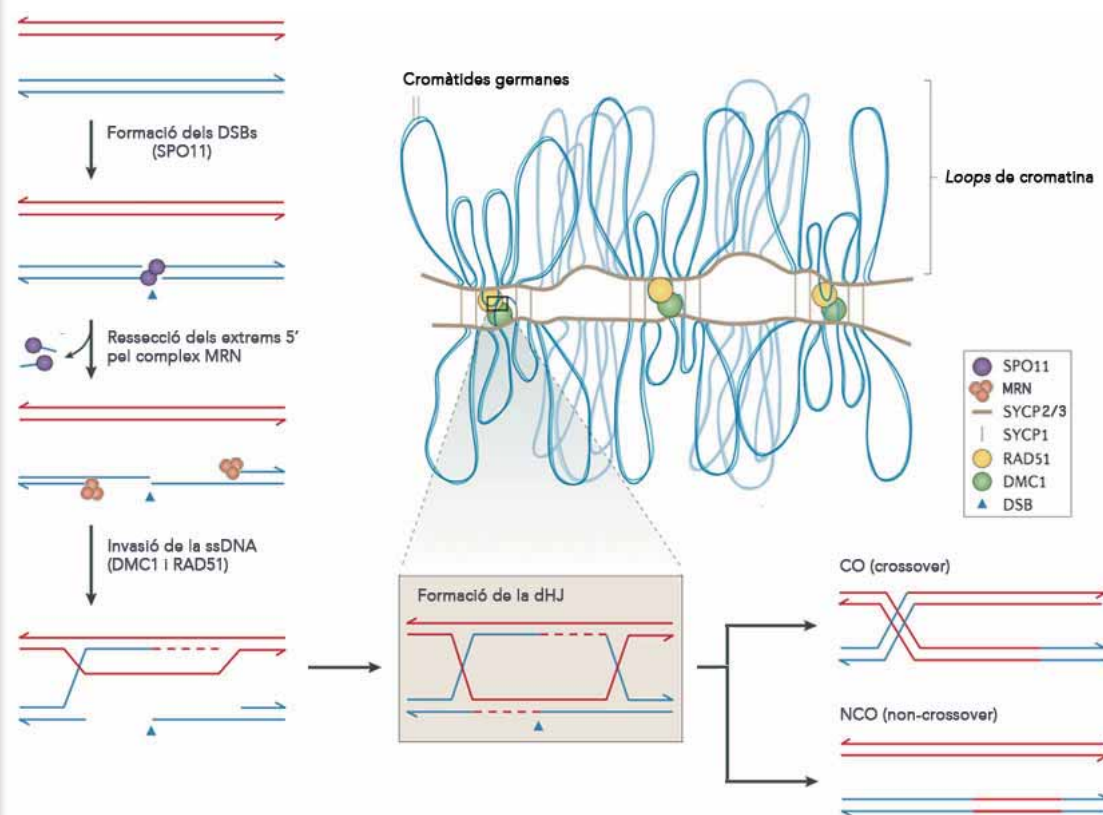
Figura 1.1. Principals etapes del procés de gametogènesi masculina.



(Figura adaptada de Handel i Schimenti , 2010).

En l'estadi de leptotè, l'embolcall nuclear es comença a desorganitzar, s'inicia la condensació de la cromatina i l'aparellament dels cromosomes homòlegs. Per a la cerca d'homologia és imprescindible la formació dels complexos sinaptonemals (*Synaptonemal Complex*, SC), a partir de l'assemblatge de les proteïnes SYCP2 i SYCP3 (*Synaptonemal Complex Protein 2 i 3*) que actuaran com elements laterals (Handel i Schimenti, 2010). A més, també s'inicia el procés de recombinació mitjançant trencaments de doble cadena del DNA (*Double Strand Breaks*, DSBs) efectuats per la proteïna SPO11 (*Meiotic recombination protein SPO11*), que desencadenen l'activació de la maquinària de resposta al dany del DNA (Morelli i Cohen, 2005). El complex MRN (format per les proteïnes MRE11 [*Meiotic recombination 11*], RAD50 [*DNA repair protein 50*] i NBS1 [*Nijmegen breakage syndrome protein 1*]) fa una resecció dels extrems 5' i deixa exposats els extrems 3' de les cadenes simples de DNA (*single strand DNA*, ssDNA); seguidament, les proteïnes RAD51 (*DNA repair protein 51*) i DMC1 (*Disrupted meiotic cDNA protein 1*) s'uneixen als extrems 3' i promouen la recerca de seqüències homòlogues de DNA (Morelli i Cohen, 2005; San Filippo et al. 2008) (Figura 1.2).

Figura 1.2. Procés de reparació dels trencaments de doble cadena per recombinació homòloga



(Figura adaptada de Baudat et al. 2013)

Introducció

- En l'estadi de zigotè, l'aparellament dels cromosomes homòlegs es va consolidant a mesura que els SC completen la seva estructuració (l'element central constituït per la proteïna SYCP1 (*Synaptonemal Complex Protein 1*) s'uneix als dos elements laterals (revisat per Handel i Schimenti, 2010). La reparació dels DSBs comença amb la cerca de seqüències homòlogues dels extrems 3' de ssDNA (recoberts de Rad51 i Dmc1). Amb aquesta finalitat, la ssDNA envaeix la doble hèlix del cromosoma homòleg, i s'elonga en l'extrem 3' utilitzant com a motlle de síntesi una de les cadenes intactes a mesura que desplaça l'altre cadena simple del cromosoma homòleg. Aquesta cadena desplaçada és la que servirà de motlle de síntesi per la cadena de ssDNA que no ha produït la invasió. La unió dels extrems 3' amb els extrems 5' de les ssDNA produeix la formació d'una estructura coneguda com a doble unió de Holliday (*double Holliday Junction, dHJ*) (Lodish et al. 2007) (Figura 1.2).

Al final de l'etapa de zigotè s'inicia un fenomen generalitzat d'inactivació de les regions asinàptiques mitjançant heterocromatinització, conegut com MSUC (*Meiotic Silencing of Unsynapsed Chromatin*). En el cas específic dels cromosomes sexuals s'anomena MSCI (*Meiotic Sex Chromosomes Inactivation*) i és necessari per la formació de la vesícula sexual (*Sex Vesicle, SV*) (Burgoyne et al. 2009).

- En l'estadi de paquitè, els SC es constitueixen definitivament i determinen la sinapsi completa dels cromosomes homòlegs, que passen a formar bivalents. Durant aquest estadi finalitza el procés de reparació dels DSBs. La majoria dels DSBs es reparen sense intercanvi de material entre les cromàtides homòlogues per la via NCO (*Non-Crossover*) (fenomen també conegut com a conversió gènica). En canvi, una petita part dels DSBs (<10%) es reparen per la via CO (*Crossover*), que implica l'intercanvi recíproc de material entre dues cromàtides homòlogues (Figura 1.2).
- En l'estadi de diplotè, els SC es desestructuren progressivament i els cromosomes homòlegs queden units mitjançant molècules de cohesines situades a la part distal de les regions on s'ha produït la recombinació. Aquestes regions són la manifestació citològica del fenomen de la recombinació i s'anomenen quiasmes. De mitjana, es forma com a mínim un quiasma per cada bivalent, però s'ha observat la formació de fins a sis quiasmes en els cromosomes més grans (p. ex. cromosoma 1) (Sun et al. 2004; Codina-Pascual et al. 2006a). La correcta formació i distribució dels quiasmes és un

element fonamental per a la posterior segregació dels cromosomes (Codina-Pascual et al. 2006a; Sarrate et al. 2014).

- Finalment, en la diacinesi, la majoria de les estructures dels SC han desaparegut, es desorganitza totalment l'embolcall nuclear i la condensació dels cromosomes continua progressant (Pawlowski i Cande, 2005).

Un cop finalitzada la profase I s'inicia la metafase I, una etapa que comporta l'assoliment del grau màxim de condensació cromosòmica i la formació del fus meiótic. La presència dels quiasmes i la unió dels microtúbuls als cinetocors manté la tensió entre els cromosomes homòlegs i possibilita la correcta orientació dels bivalents a la placa metafàsica (Page i Hawley, 2003). Durant l'anafase I té lloc la segregació sintètica dels cromosomes homòlegs mitjançant la degradació de les cohesines periquiasmàtiques. Per contra, les cohesines centromèriques es mantenen i així les cromàtides germanes queden unides (Page i Hawley, 2003). A la telofase I, els cromosomes s'agrupen a cadascun dels pols cel·lulars i té lloc la citocinesi. Finalment es formen dos espermatòcits secundaris de contingut haploide on cada cromosoma presenta dues cromàtides ($1n$, 2 cromàtides) (Figura 1.1).

La segona divisió meiótica és una divisió equacional que té com a finalitat la generació de cèl·lules haploides constituïdes per cromosomes amb una sola cromàtide. Durant la profase II s'iniciarà un segon cicle de condensació de la cromatina. La unió dels microtúbuls als cinetocors germans possibilitarà la formació de la placa metafàsica. La degradació de les cohesines centromèriques permet la segregació amfitèlica de cromàtides germanes durant l'anafase II (Vogt et al. 2008). Després de la telofase II, es formaran dues espermatòcits ($1n$, 1 cromàtide) a partir de cada espermatòcit secundari (Figura 1.1).

1.1.3. Espermiogènesi

L'espermiogènesi és un complex procés de morfogènesi que finalitzarà amb la diferenciació de les espermatòcits en espermatozoides. Aquest procés està regulat per l'expressió de gens específics que comporten els següents canvis: reposicionament de receptors i canals iònics de membrana, elongació del nucli, eliminació de citoplasma, formació del flagel, formació de l'acrosoma i transformació de la cromatina nucleohistònica a cromatina preferentment nucleoprotamínica (revisat per Amann 2008). Un cop finalitzada l'espermiogènesi, els

espermatozoides són alliberats al lumen dels túbuls seminífers mitjançant un procés anomenat espermiació.

1.2. Punts de control de l'espermatogènesi

L'espermatogènesi és un procés complex on cada etapa requereix un control específic. Per tal d'assegurar la progressió de les cèl·lules al llarg d'aquest procés existeixen punts de control que verifiquen la seva correcció. Aquests sistemes de control depenen de l'activació de complexos ciclina/CDK (cinases dependents de ciclina).

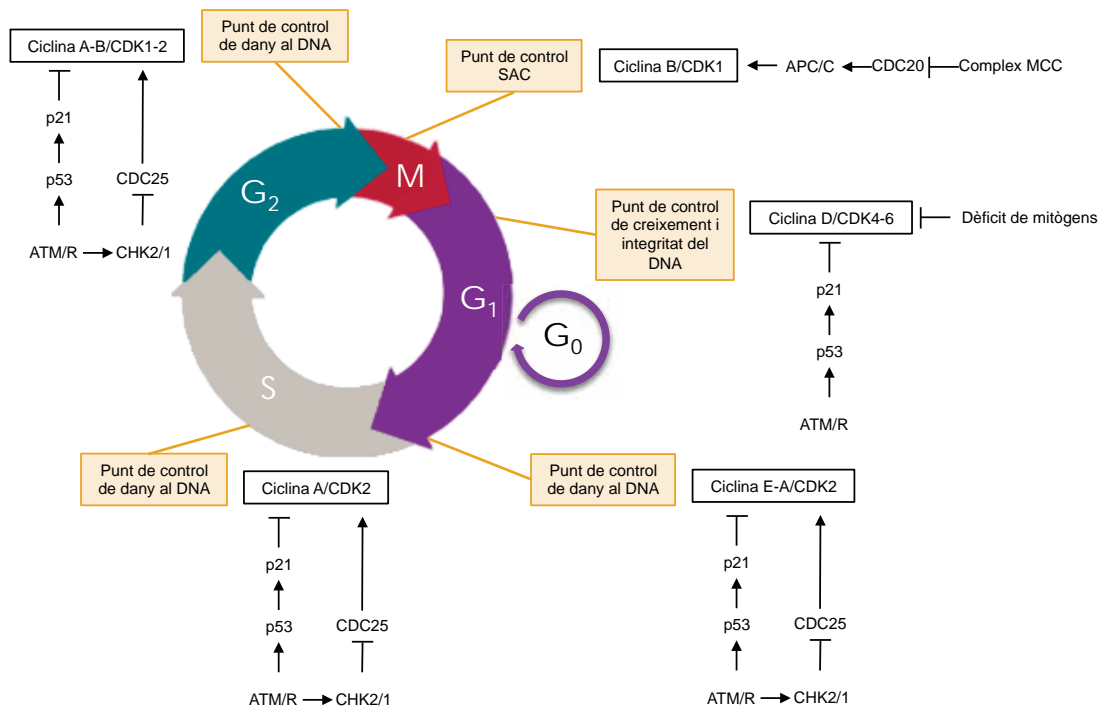
1.2.1. Punts de control de l'etapa de proliferació mitòtica

La proliferació mitòtica està regulada per tres tipus de punts de control que poden aturar la progressió del cicle cel·lular en cas de detectar anomalies: el punt de control de creixement de G_1 , el punt de control del dany al DNA que actua en les fases G_1 , G_1/S , S i G_2/M ; i el punt de control d'assemblatge del fus (*Spindle Assembly Checkpoint*, SAC) que és operatiu durant la fase M (Figura 1.3).

El punt de control de creixement és actiu a l'etapa de G_1 i és el responsable de detectar el correcte creixement i mida cel·lular. En el cas que es donin les condicions externes adequades, els factors de creixement extracel·lulars (mitògens) estimulen la síntesi de ciclina D a través de la via de les MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), que podrà activar el complex ciclina D/CDK4-6 i permetre el pas a la fase S (Foster et al. 2010). En absència de mitògens, la cèl·lula adopta un estat quiescent reversible (fase G_0) (Lodish et al. 2007) (Figura 1.3).

Els punts de control de dany al DNA aturen el cicle cel·lular quan es produeixen trencaments en aquesta molècula. En el punt de control de la fase G_1 l'aturada del cicle és dependent de p53, mentre que en G_1/S , S i G_2/M el cicle es pot aturar en presència o absència de p53 (revisat per Kastan i Bartek, 2004; Shaltiel et al. 2015) (Figura 1.3).

Figura 1.3. Elements principals dels punts de control del cicle cel·lular.



MCC, *Mitotic Checkpoint Complex*

(Figura adaptada de Lodish et al. 2007)

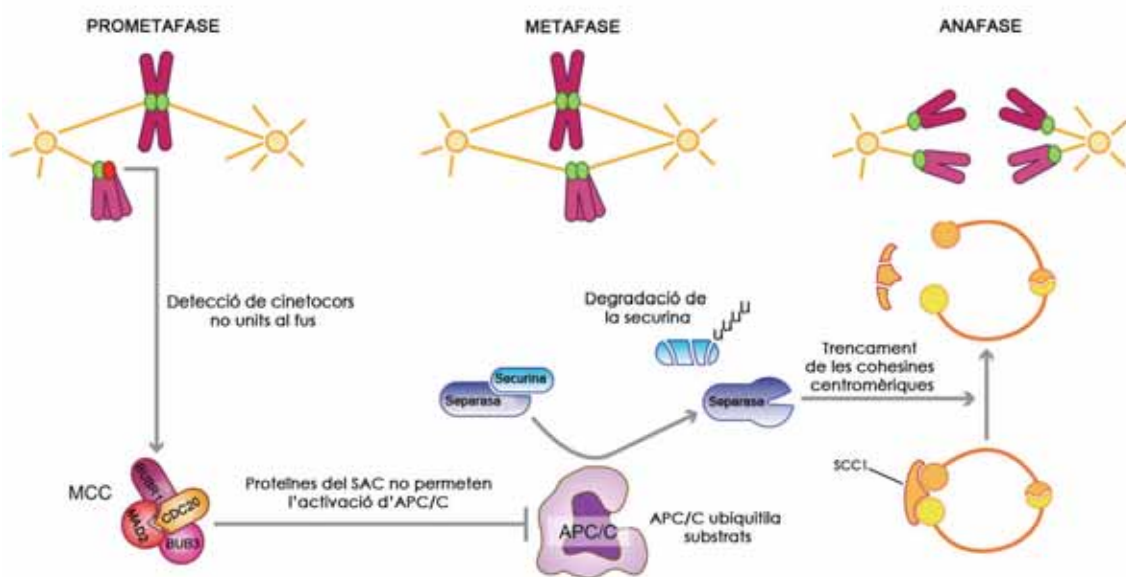
En termes generals, quan es produeix un trencament de DNA, el complex MRN s'acumula als punts de trencament i activa una cascada de senyalització a través de les proteïnes cinases ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) o ATR (*Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related*). En el cas de la via dependent de p53, les proteïnes efectores ATM/R provoquen un augment de p53, que activa la transcripció de factors de reparació i de p21, el qual és un inhibidor dels complexos ciclina/CDK específics de cada etapa (Figura 1.3). En la via independent de p53, la transducció de senyals a través d'ATM/R activa les proteïnes CHK1/2 (*Checkpoint kinases 1/2*) que fosforilen CDC25 (*Cell division cycle 25 homolog A*). D'aquesta manera, CDC25 patirà una proteòlisi dependent d'ubiquïtina i per tant, no podrà realitzar la seva funció activadora dels complexos ciclina/CDK. En tots els casos, el resultat serà una aturada en el cicle cel·lular durant la qual es poden reparar els trencaments del DNA. Tot i així, en cas que finalment les anomalies no puguin ser reparades, l'acumulació de nivells elevats de p53 provoca l'activació de gens que indueixen la mort cel·lular per apoptosi (Lodish et al. 2007). El punt de control del SAC actua en la transició metafase-anafase, i controla tant la correcta unió dels microtúbuls als cinetocors com la correcta posició dels cromosomes a la placa metafàsica (Figura 1.3). Aquest punt de control impedeix la sortida de metafase fins que tots

Introducció

els cromosomes estiguin orientats correctament i per tant, evita la segregació precoç de cromàtides germanes (Lara-González et al. 2012).

En el cas d'una manca d'unió amfitèlica amb l'equilibri de forces corresponent, es forma el complex MCC (*Mitotic Checkpoint Complex*). Les principals proteïnes del MCC són la MAD2 (*Mitotic-arrest deficient 2*) i les BUB R1 i 3 (*Budding uninhibited by benzimidazoles*) (Lara-González et al. 2012) que actuen inhibint CDC20, una subunitat necessària per activar el complex promotor de l'anafase (*Anaphase Promoting Complex, APC/C*) (Figura 1.4). Quan la unió dels cinetocors al microtúbuls del fus és amfitèlica amb equilibri de forces, el SAC queda silenciàt (inactiu) i per tant, no es forma el complex MCC i CDC20 queda lliure. Com a conseqüència, aquest pot activar APC/C, que provocarà l'ubiquïtinització de la securina (proteïna que per defecte es troba inhibint l'acció de la separasa¹) i per tant la separasa quedarà alliberada. A més, PLK1 (*Polo-like kinase 1*) fosforila la subunitat de kleisina SCC1 (*Sister chromatid cohesion 1*), que tanca l'anell de cohesines fent-la susceptible a l'acció de la separasa, que al estar lliure, la podrà degradar (Figura 1.4).

Figura 1.4. Funcionament general del punt de control SAC mitòtic.



(Figura adaptada de Lara-González et al. 2012)

¹ La separasa té mecanismes addicionals de regulació a banda de la unió de la securina al seu centre actiu. Un segon mecanisme d'inhibició és la fosforilació dels residus de serina 1126 i 1139, que permet la unió de la ciclina B. El tercer element regulador és la unió de PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) a la subunitat reguladora (Holland et al. 2007).

Aquesta acció possibilita la segregació de les cromàtides a través de la força exercida pels microtúbuls. Quan els cromosomes arriben als pols al final de l'anafase, s'activa CDH1 (*APC/C activator protein*), una altre subunitat reguladora de APC/C que promourà la degradació de la ciclina B i per tant la reversió de tots els seus efectes (sortida de la mitosi).

1.2.2. Punts de control meiòtics

A la fase meiòtica de l'espermatogènesi s'han descrit dos punts de control. El primer s'anomena punt de control de paquitè (*pachytene checkpoint*) i detecta anomalies de sinapsi i recombinació. El segon actua durant la transició metafase - anafase de les dues divisions meiòtiques, amb la finalitat d'assegurar la correcta segregació dels cromosomes, i es coneix com a punt de control d'assemblatge del fus (SAC meiòtic).

Punt de control de paquitè

Quan l'enzim SPO11 origina els DSBs, s'activa la via de transducció de senyals a partir d'ATM i el mecanisme de resposta al dany del DNA: la fosforilació de la histona H2AX promou l'acumulació de BRCA1 (*Breast Cancer type 1 susceptibility protein*) i ATR en els DSBs. En les regions aparellades, aquestes proteïnes s'alliberen dels elements axials dels SC i els trencaments es reparen per la via de reparació homòloga a través del model de la dHJ (Figura 1.2, veure apartat 1.1.2). En regions no aparellades, la persistència d'aquests *foci* produeix l'adquisició de modificacions repressives de la cromatina, que fan que aquestes regions asinàptiques adoptin una estructura en forma d'heterocromatina. Com a conseqüència, es produeix el silenciament gènic de les regions afectades (MSUC) (Burgoyne et al. 2009). Si les regions silenciades durant aquest procés contenen gens essencials per a la meiosi, es desencadenarà un bloqueig meiòtic (Burgoyne et al. 2009).

En el cas específic dels cromosomes sexuals, al ser heteromòrfics i presentar una homologia limitada a les regions PAR (*Pseudoautosomal Region*), es produeix un fenomen similar que es coneix específicament com MSCI i que condueix a la formació de la SV. La inactivació dels cromosomes sexuals també comporta el silenciament dels gens ubicats en aquests cromosomes, acció indispensable per a que les cèl·lules superin aquesta etapa del procés (Burgoyne et al. 2009).

En cas que les anomalies sinàptiques persisteixin i no es reparin, s'induiran processos de mort cel·lular programada. Aquesta eliminació cel·lular es produeix mitjançant l'activació de

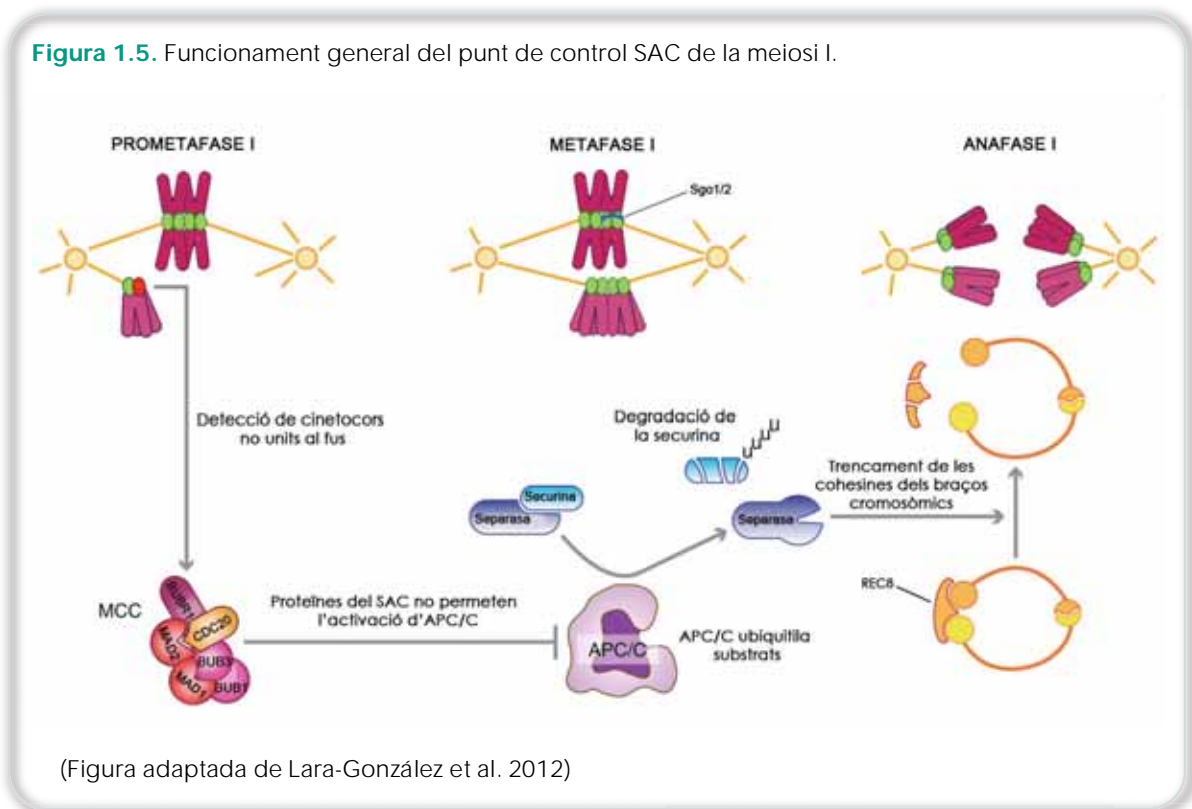
caspsasses per vies independents a p53 (Hamer et al. 2008).

Punt de control d'assemblatge del fus (SAC)

El punt de control SAC es troba actiu de forma constitutiva, bloquejant la transició de metafase I a anafase I fins que tots els cromosomes estan correctament alineats a la placa metafàsica (Vogt et al. 2008; Lara-González et al. 2012).

La majoria dels elements que participen en el SAC mitòtic també ho fan en el meiótic (Figura 1.4). El complex MCC està format per les proteïnes MAD (MAD1, MAD2), les BUB (BUB1, BUB3 i BUBR1) i la MPS1 (*Monopolar Spindle 1*) (Sun i Kim, 2012). A diferència de la mitosi, en la primera divisió meiótica aquestes proteïnes són reclutades a la part externa del cinetocor per un procés regulat, entre d'altres, per les cinases Aurora B i Aurora C (Vogt et al. 2008; Lara-González et al. 2012; Sun i Kim, 2012). El complex MCC impedeix l'activació d'APC/C a través de la inhibició de CDC20 fins que s'assoleix l'orientació sintètica dels cromosomes. Els mecanismes de silenciament del SAC meiótic actuen de la mateixa forma que a la mitosi: l'alliberament de CDC20 permet l'activació d'APC/C, el qual promou l'eliminació de la securina i com a conseqüència, l'activació de la separasa. En el cas concret de la primera divisió meiótica, PLK1 fosforila la kleisina REC8 (*Meiotic recombination protein*), una subunitat especialitzada del complex de cohesines meiótiques (equivalent a SCC1 de la divisió mitòtica) i la fa susceptible a l'acció de la separasa (Figura 1.5).

Figura 1.5. Funcionament general del punt de control SAC de la meiosi I.



(Figura adaptada de Lara-González et al. 2012)

Amb la finalitat d'evitar la separació precoç de les cromàtides germanes, les kleisines REC8 de les regions centromèriques estan protegides per les proteïnes SGO1 i SGO2 (*Shugoshin* 1 i 2). Aquestes proteïnes recluten a la fosfatasa PP2A, que manté defosforilada Rec8 per tal d'evitar el seu reconeixement per part de la separasa i poder preservar la unió de les cromàtides germanes (Vogt et al. 2008).

Durant la transició metafase-anafase de la segona divisió meiòtica, també actua el punt de control SAC. En aquest cas, és molt similar al SAC mitòtic, ja que la segregació dels cromosomes és amfitèlica. La kleisina REC8 de les regions centromèriques no és defosforilada per PP2A, i per tant la separasa pot actuar degradant REC8 i alliberant la unió entre cromàtides germanes que podran segregat de forma oposada (Vogt et al. 2008).

1.2.3. Punt de control post-meiotic

S'ha suggerit l'existència d'un punt de control adicional que actuaria en una fase primerenca de l'espermioogènesi i que s'activaria en resposta a dèficits d'expressió gènica. De fet, dels aproximadament 600 gens que codifiquen per a proteïnes específiques de l'espermatogènesi, 350 s'expressen exclusivament durant l'espermioogènesi (revisat per Yan 2009), la qual cosa posa de manifest la forta dependència de l'expressió de productes específics que presenta aquesta etapa. En aquest sentit, s'ha descrit que les cèl·lules afectades per alteracions en l'expressió de factors de transcripció necessaris per aquestes etapes s'eliminarien per apoptosi i això donaria lloc a una reducció del número d'espermatozoides (revisat per Yan 2009). D'altra banda, hi ha estudis que han evidenciat que el silenciament gènica de les regions asinàptiques a l'etapa de paquitè té un efecte repressiu que es manté post-meioticament (revisat per Heard i Turner, 2011). Per tant, alteracions sinàptiques en estadis inicials de la meiosi poden tenir conseqüències en l'expressió gènica de l'etapa post-meiotica i per tant ser responsables de l'activació d'aquest punt de control.

1.2.4. Factors que alteren l'efectivitat dels punts de control

Tal i com s'ha vist, l'espermatogènesi està regulada de forma específica per diferents punts de control, que detecten la presència d'anomalies i activen la maquinària de reparació. En

determinades situacions, tot i l'eficàcia dels mecanismes de reparació, les anomalies detectades no es poden resoldre i s'indueixen els processos d'eliminació cel·lular mitjançant apoptosi (Hamer et al. 2008).

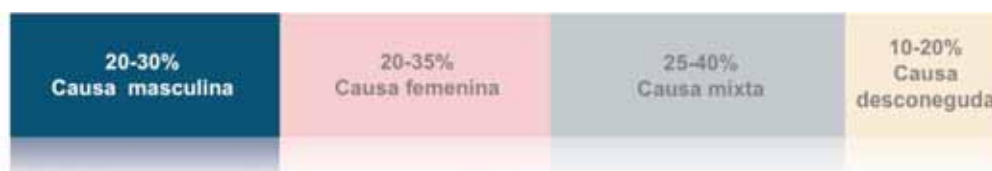
D'altra banda, hi ha situacions en les quals es produeix una desregulació dels punts de control, que comporten una disminució de la seva funcionalitat. Entre les causes associades, destaquen la presència de mutacions gèniques que afecten proteïnes implicades en els mecanismes de control (Morelli i Cohen, 2005; Yan 2009; Roig et al. 2010; Li et al. 2011; Sun i Kim; 2012), i la presència d'anomalies cromosòmiques en les cèl·lules germinals. En aquest últim cas, la presència d'univalents o multivalents comporta anomalies de sinapsi i recombinació en l'etapa de paquitè. Estudis realitzats en models murins en portadors de reorganitzacions cromosòmiques han observat que hi ha cèl·lules que tot i presentar alteracions, poden superar el punt de control de paquitè (Eaker et al. 2001; Manterola et al. 2009) o el punt de control SAC (Eaker et al. 2001), i generar espermatozoides portadors d'anomalies cromosòmiques.

Així doncs, la manca d'activació dels processos d'eliminació cel·lular degut a mutacions gèniques o una eliminació deficient de les cèl·lules amb anomalies meiòtiques afavoreix la producció de gàmetes amb anomalies.

1.3. Anomalies genètiques com a causa d'infertilitat masculina

La infertilitat consisteix en la incapacitat d'aconseguir un embaràs clínic després d'un any de relacions sexuals no protegides (Organització Mundial de la Salut, OMS). Afecta al 15% de les parelles en edat fèrtil, i entre el 20-30% dels casos és exclusivament d'origen masculí (Figura 1.6) (*European Society of Human Reproduction and Embriology, ESHRE*²).

Figura 1.6. Distribució de les causes d'infertilitat entre parelles en edat fèrtil.



² ART Fact Sheet (June 2014) URL: <http://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/ART-fact-sheet.aspx>.

L'etiologia de la infertilitat masculina inclou factors molt heterogenis, essent el component genètic un dels més significatius. Dins d'aquest grup, les alteracions cromosòmiques són presents en aproximadament un 5% dels individus que consulten per infertilitat (Taula 1.1).

Taula 1.1. Principals causes genètiques de la infertilitat masculina.

Anomalia genètica	Prevalença associada a fenotip	Publicació
Alteracions cromosòmiques	5% (pobl. infèrtil); 15% (A)	O'Flynn O'Brien et al. 2010
Síndrome de Klinefelter	5% (O severa); 10% (A)	O'Flynn O'Brien et al. 2010
Translocacion Robertsonianes	0,9% (pobl. infèrtil); 1,5% (O); 0,2% (A)	Mau-Holzmann 2005
Translocacions recíproques	0,7% (pobl. infèrtil); 0,7% (O); 0,5% (A)	Mau-Holzmann 2005
Delecions cromosoma Y	10-15% (A); 5-10 % (O)	O'Flynn O'Brien et al. 2010
AZFa	0,5-1% (A); 0,5-1% (SCOS)	Ferlin et al. 2007
AZFb	0,5-1% (A)	Ferlin et al. 2007
AZFc	6 % (A); 12% (O severa)	O'Flynn O'Brien et al. 2010
Mutacions gèniques		
CFTR	60-70% (CBAVD); 1,2% (O severa)	Ferlin et al. 2007
AR	2% (pobl. infèrtil); 2-3% (A); 2-3% (O)	Ferlin et al. 2007
INSL3-LGR8	4-5% (Criptorquídia)	Ferlin et al. 2007

CFTR, *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*; AR, *Androgen receptor*; INSL3, *Insulin-like 3*; LGR8, *Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 8*; A, azoospermia; O, oligozoospermia; SCOS, *Sertoli cell-only syndrome*; CBAVD, *Congenital bilateral absence of the vas deferens*

Les anomalies cromosòmiques poden ser numèriques (quan impliquen pèrdua o guany de cromosomes sencers) o estructurals (quan impliquen reorganitzacions de fragments cromosòmics). Les anomalies cromosòmiques estructurals poden ser equilibrades, quan no hi ha ni pèrdua ni guany de material genètic, i per tant no solen implicar alteracions fenotípiques en l'individu (ex. translocacions, inversions o insercions); o desequilibrades quan hi ha una alteració en la quantitat de DNA i solen tenir efectes sobre el fenotip dels individus (ex. delecions, duplicacions, translocacions desequilibrades).

Dins la població d'individus infèrtils, la incidència d'anomalies cromosòmiques estructurals equilibrades és aproximadament del 2,2%, i la majoria d'aquests individus són portadors de translocacions (1,6%) (Mau-Holzmann 2005). Per tant, una gran part d'individus amb anomalies cromosòmiques estructurals que consulten per problemes de fertilitat són portadors d'aquest tipus de reorganització.

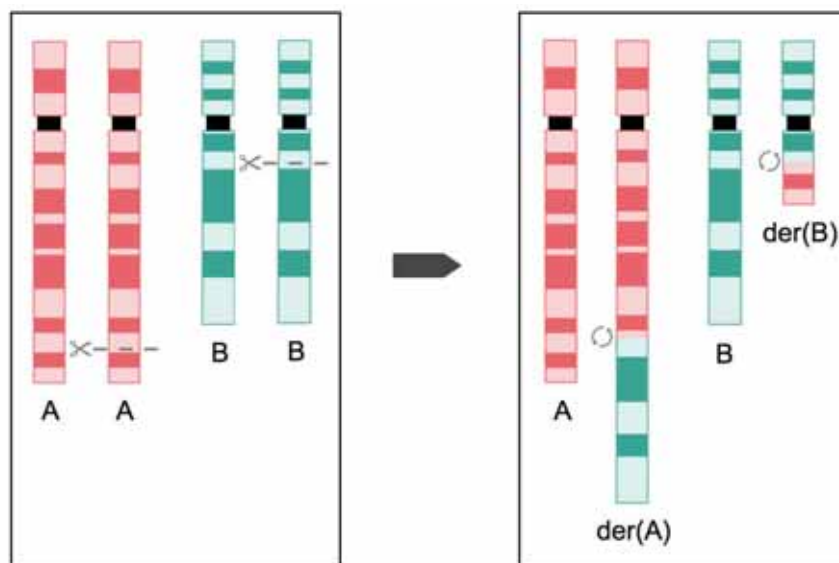
1.4. Translocacions cromosòmiques equilibrades

Les translocacions equilibrades inclouen tant reorganitzacions simples (deriven de dos trencaments en dos cromosomes diferents, p. ex. translocacions recíproques o translocacions Robertsonianes) com reorganitzacions cromosòmiques complexes (tres o més trencaments en dos o més cromosomes, p. ex. dobles translocacions o triples translocacions).

1.4.1. Translocacions recíproques

Les translocacions recíproques consisteixen en un intercanvi de material genètic entre els fragments distals de dos cromosomes no homòlegs. Els cromosomes amb els fragments translocats s'anomenen derivatius, i s'identifiquen amb el cromosoma del qual presenten el centròmer (Figura 1.7).

Figura 1.7. Formació d'una translocació recíproca. A i B representen els cromosomes normals, der(A) i der(B) representen els cromosomes derivatius resultants de la translocació.



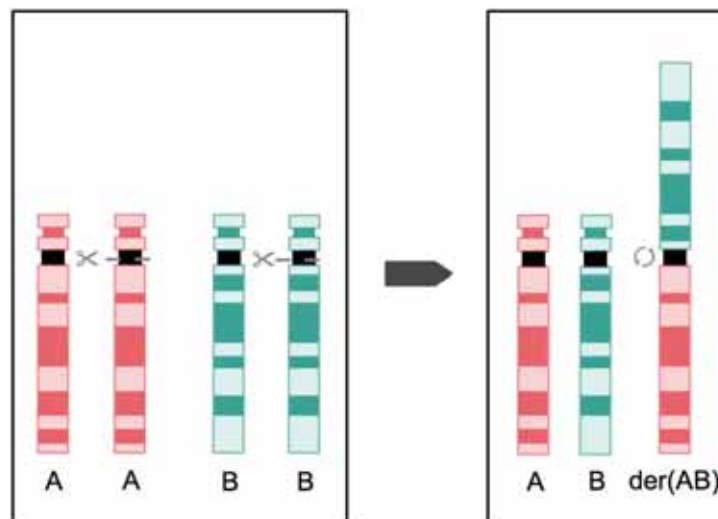
La majoria de les translocacions recíproques s'originen *de novo* i poden implicar a qualsevol dels cromosomes del cariotip. Tot i així, hi ha regions del genoma especialment susceptibles a aquest tipus de reorganitzacions entre les quals destaca la banda 22q11 (Kato et al. 2012). En particular, la reorganització t(11;22)(q23;q11.2) és la translocació recíproca més freqüent en humans (Hill et al. 2000). S'ha suggerit que la causa de la inestabilitat genòmica que

comporta la formació d'aquesta translocació és la presència de seqüències palindròmiques riques en AT en els punts de trencament (Kato et al. 2012).

1.4.2. Translocacions Robertsonianes

Les translocacions Robertsonianes són un tipus de translocació que es dona específicament entre dos cromosomes acrocèntrics (cromosomes 13, 14, 15, 21 i 22 en humans). Normalment es produeix una fusió a nivell de centròmers que implica la pèrdua dels braços p . El cromosoma derivatiu resultant està format pels dos braços llargs dels cromosomes que participen en la reorganització (Figura 1.8).

Figura 1.8. Formació d'una translocació Robertsoniana. A i B representen els cromosomes normals, der(AB) representa el cromosoma derivatiu resultant de la translocació.

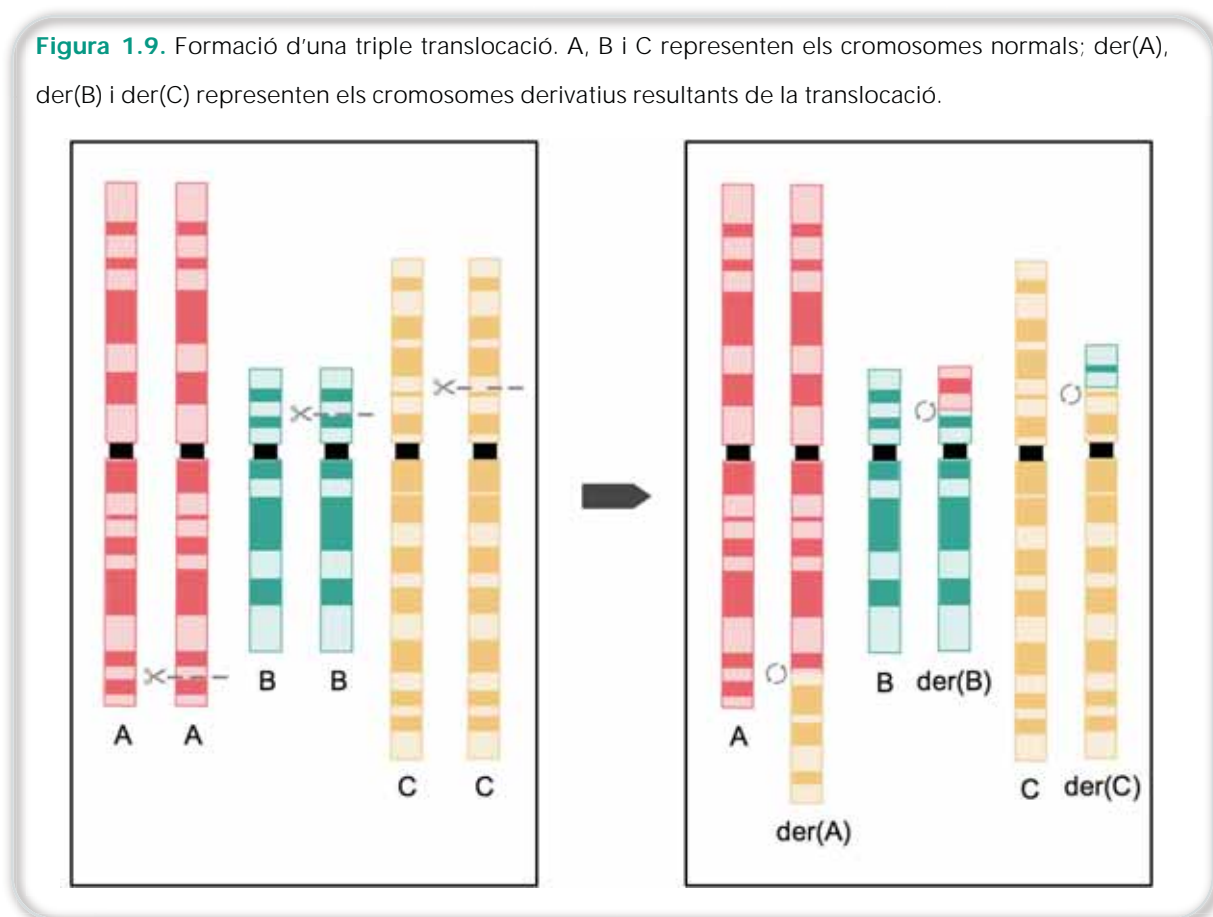


Dels diferents tipus de translocacions Robertsonianes que es poden formar, la $t(13;14)$ és la més freqüent (74%) seguida de la $t(14;21)$ (8%) (Gardner et al. 2011). La resta de combinacions entre cromosomes acrocèntrics es troben en freqüències inferiors i per això són considerades rares (Gardner et al. 2011). El predomini de les reorganitzacions $t(13;14)$ i $t(14;21)$ es considera que és degut al fet que els cromosomes reorganitzats comparteixen segments homòlegs invertits al voltant dels punts de trencament (Gardner et al. 2011).

1.4.3. Translocacions complexes

Les translocacions complexes inclouen diferents tipus de reorganitzacions segons la distribució dels punts de trencament (revisat per Pellestor et al. 2011a). Les dobles translocacions fan referència a la coexistència de dues translocacions recíproques independents. Tot i així, les més comunes són les triples translocacions, que tenen lloc quan s'intercanvien segments distals de tres cromosomes diferents (Figura 1.9).

Figura 1.9. Formació d'una triple translocació. A, B i C representen els cromosomes normals; der(A), der(B) i der(C) representen els cromosomes derivatius resultants de la translocació.



1.5. Risc reproductiu en portadors de translocacions cromosòmiques equilibrades

En poblacions d'homes infèrtils la incidència de portadors de translocacions recíproques triplica la incidència descrita en la població general (Mau-Holzmann 2005). En el cas de portadors de translocacions Robertsonianes la incidència és nou vegades superior (Mau-Holzmann 2005). No hi ha dades referents a la incidència de portadors de reorganitzacions complexes en la població general, tot i així la seva incidència s'estima al voltant del 0,1% en

poblacions d'homes infèrtils. Tot i que els portadors heterozigots de translocacions cromosòmiques equilibrades no solen mostrar manifestacions fenotípiques aparents, sí que poden presentar anomalies al llarg de la gametogènesi que poden influir en la seva fertilitat. La presència dels cromosomes reorganitzats en les cèl·lules germinals pot dificultar la superació dels diferents punts de control de l'espermatogènesi, degut a anomalies d'aparellament i recombinació, o de posicionament dels cromosomes a la placa metafàsica (veure apartat 1.2.4). Així doncs, la competència reproductiva d'aquests individus pot estar disminuïda degut a una reducció en el número d'espermatozoides com a conseqüència de l'eliminació de cèl·lules germinals a través de l'actuació dels punts de control.

Per altra banda, la presència d'un cariotip alterat incrementa el risc de producció de gàmetes amb anomalies cromosòmiques degut a dos factors principals. En primer lloc, la segregació meiótica dels cromosomes reorganitzats pot donar lloc a gàmetes portadors de delecions, duplicacions o aneuploïdies. En segon lloc, les geometries d'aparellament complexes a profase I incrementen el risc de que es formin regions asinàptiques que es poden relacionar mitjançant heterosinapsi amb altres regions no aparellades del genoma. Aquesta situació pot afectar la segregació dels cromosomes implicats i incrementar el risc de formació de gàmetes portadors d'anomalies numèriques, fenomen que s'anomena efecte intercromosòmic (*Interchromosomal Effect, ICE*).

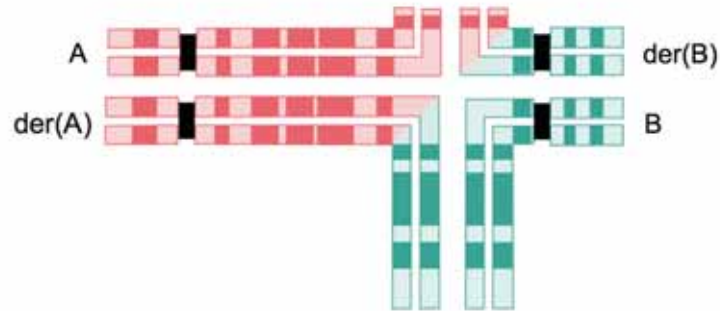
1.5.1. Segregació meiótica dels cromosomes reorganitzats

Per tal que els cromosomes reorganitzats aparellin correctament i assoleixin homosinapsi, han d'adoptar conformacions complexes en forma de multivalents. La formació dels multivalents implica diverses possibilitats de segregació dels cromosomes que hi participen. En tots els casos, només existirà una forma de segregació en què els cromosomes normals i els derivatius segregaran a pols cel·lulars oposats i els espermatozoides rebran un contingut cromosòmic normal o equilibrat. La resta de modes de segregació comportaran la formació d'espermatozoides amb guanys o pèrdues cromosòmiques: des de duplicacions i delecions fins a aneuploïdies.

Translocacions recíproques

L'aparellament dels cromosomes que formen part d'una translocació recíproca i els seus cromosomes homòlegs implica la formació d'un tetravalent durant la profase I (Figura 1.10).

Figura 1.10. Aparellament en forma de tetravalent dels cromosomes implicats en una translocació recíproca.



Aquesta estructura pot segregat a través de cinc modes teòrics durant l'anafase I que originaran fins a 16 productes diferents (Figura 1.11).

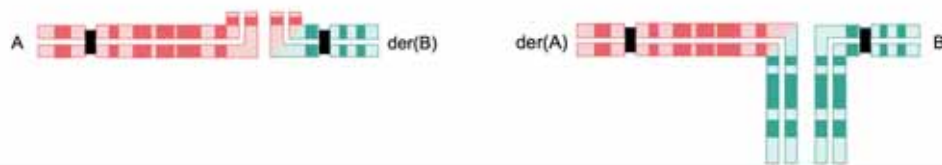
Figura 1.11. Modes de segregació dels cromosomes implicats en una translocació recíproca.

Segregació 2:2

ALTERNANT



ADJACENT I

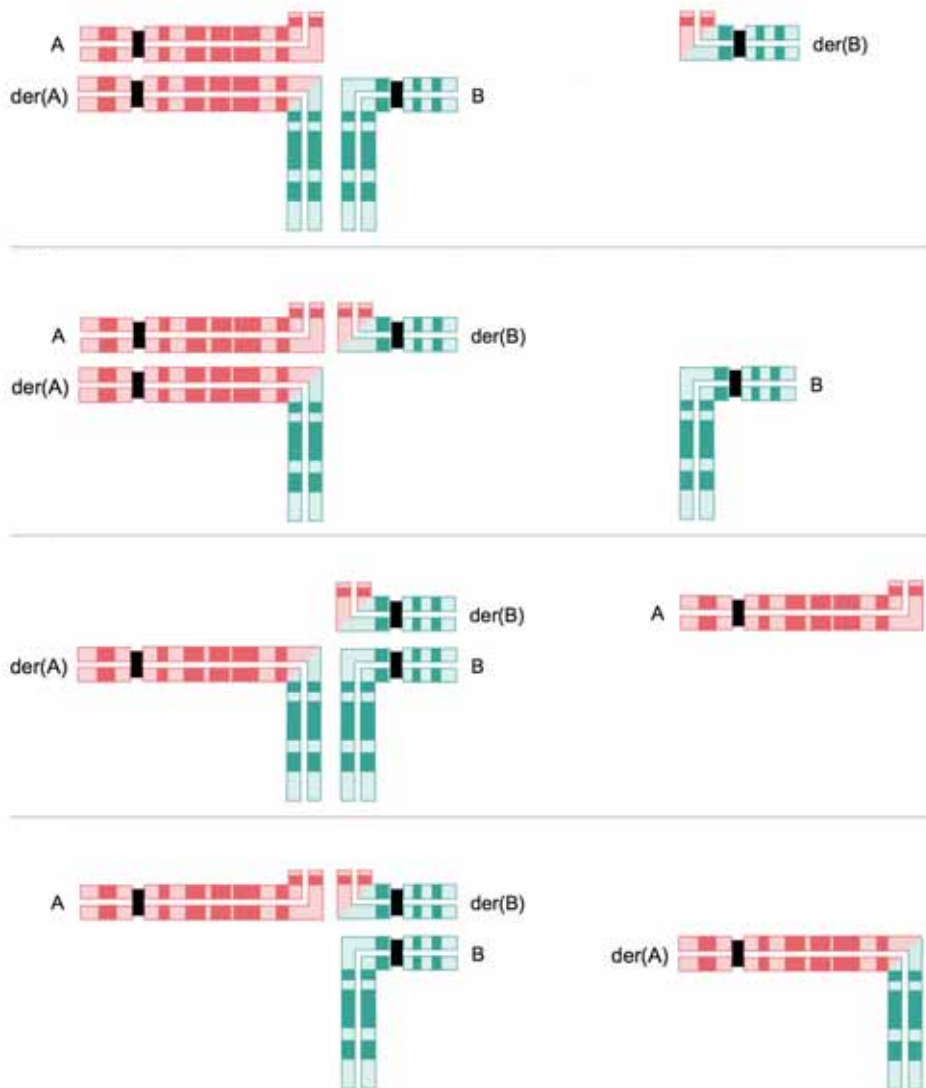


ADJACENT II

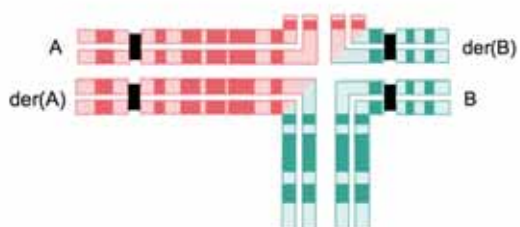


Figura 1.11. (Cont.)

Segregació 3:1



Segregació 4:0



La segregació 2:2, que es produeix quan dos cromosomes segreguen a un pol i dos cromosomes a l'altre, inclou la segregació alternant (els cromosomes amb centròmers homòlegs segreguen a pols oposats i originen un producte normal i un equilibrat), l'adjacent

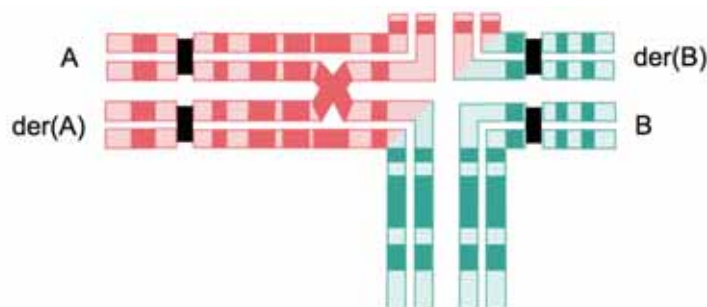
Introducció

I (els cromosomes amb centròmers homòlegs segreguen a pols oposats i formen dos productes de segregació desequilibrats) i l'adjacent II (els cromosomes amb centròmers homòlegs segreguen al mateix pol i generen dos productes de segregació desequilibrats). El mode de segregació 3:1 té lloc quan tres cromosomes segreguen a un pol i un cromosoma a l'altre, i es pot donar a través de quatre combinacions diferents que originen vuit productes de segregació desequilibrats. Finalment, l'absència de segregació dels cromosomes que conformen el tetravalent s'anomena segregació 4:0 i forma dos productes de segregació desequilibrats. Els productes desequilibrats resultants de les segregacions 2:2 comporten la presència de duplicacions o delecions, la segregació 3:1 origina gàmetes portadors de delecions, duplicacions o aneuploidies; mentre que la 4:0 dona lloc a gàmetes amb aneuploidies.

Els estudis de segregació realitzats en espermatozoides de portadors de translocacions recíproques han permès establir la freqüència de cada mode de segregació. Els resultats han posat de manifest que, independentment dels cromosomes implicats o de les característiques citogenètiques dels segments translocats, la segregació alternant (equilibrada) és majoritària i representa el 46,4% dels gàmetes. A continuació destaca la segregació adjacent I amb un 33,6%, seguida de les segregacions adjacent II i 3:1 amb percentatges del 11,7% i 6,8%, respectivament. En tots els casos analitzats la segregació 4:0 és escassa (0,6%) (revisat per Anton et al. 2008).

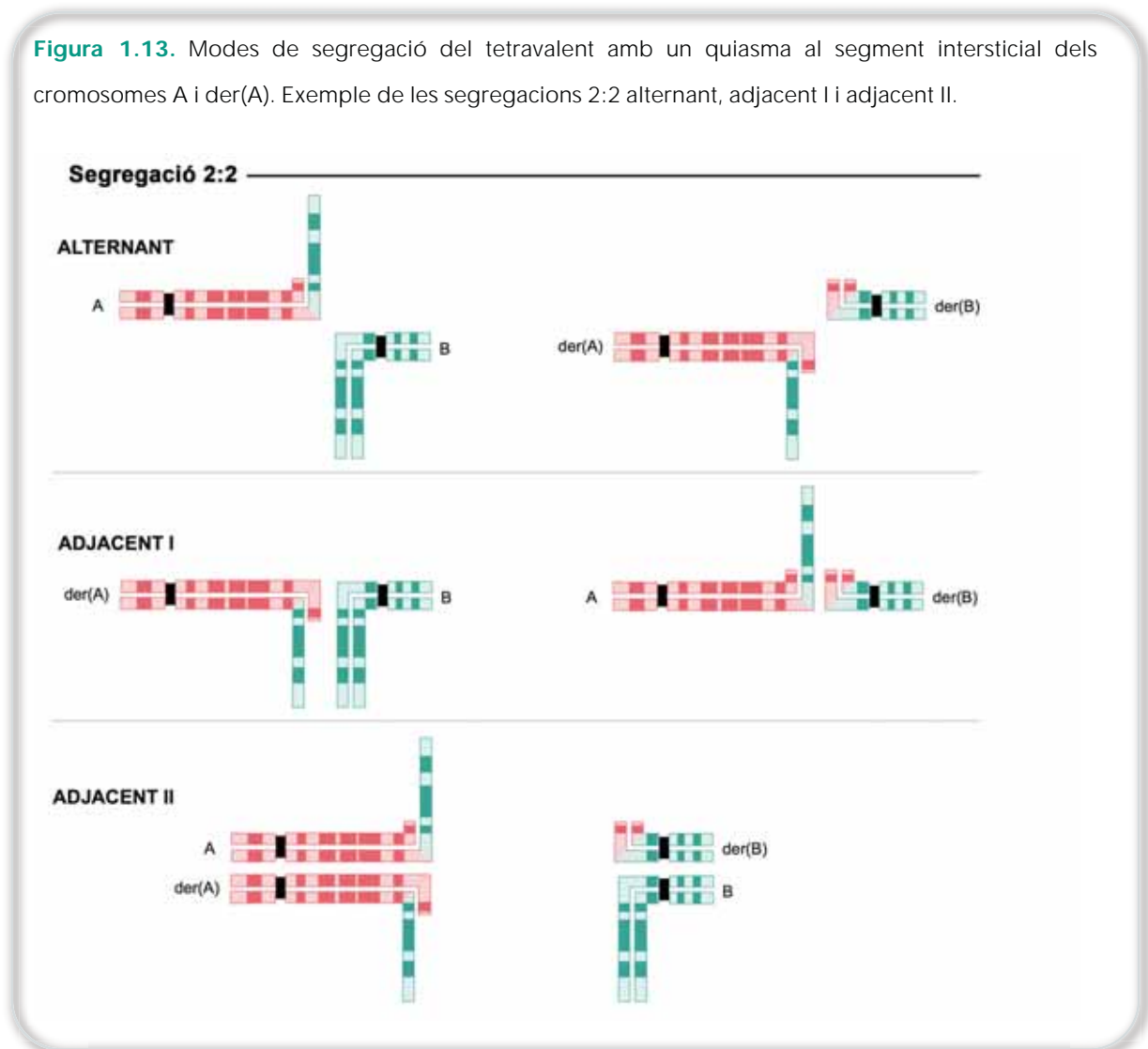
Un aspecte a tenir en compte en l'anàlisi del comportament meiòtic de les translocacions recíproques és la formació de quiasmes als segments intersticials del tetravalent (regió compresa entre el centròmer i el punt de trencament) (Armstrong i Hultén, 1998). Quan es forma un quiasma en una de les regions intersticials, l'intercanvi de segments entre les cromàtides homòlogues implica la formació de cromosomes amb cromàtides asimètriques (Figura 1.12).

Figura 1.12. Formació d'un quiasma en la regió intersticial dels cromosomes A i der(A) implicats en una translocació recíproca.



Com a conseqüència, els productes resultants de les segregacions alternant i adjacent I presenten el mateix contingut cromosòmic al final del procés meiòtic, i per tant no es poden distingir entre ells (Figura 1.13). En canvi, la formació de quiasmes intersticials sí que modifica de forma diferencial el contingut cromosòmic final dels productes de segregació dels altres modes de segregació (adjacent II, 3:1 i 4:0), que per tant poden ser distingits.

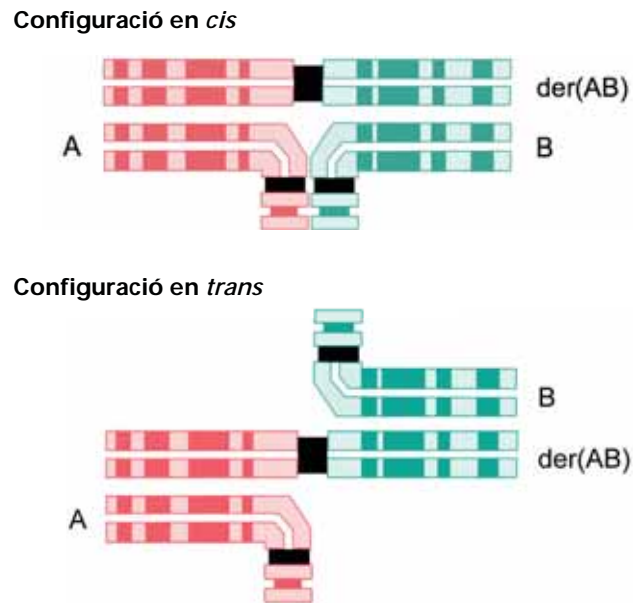
Figura 1.13. Modes de segregació del tetravalent amb un quiasma al segment intersticial dels cromosomes A i der(A). Exemple de les segregacions 2:2 alternant, adjacent I i adjacent II.



Translocacions Robertsonianes

En el cas de les translocacions Robertsonianes, l'aparellament de tots els segments reorganitzats a paquet s'assoleix mitjançant la formació d'un trivalent (Figura 1.14). Els cromosomes que conformen el trivalent es poden orientar en geometria *cis* (quan els cromosomes normals aparellen al mateix costat del derivatiu) o en *trans* (quan els cromosomes normals aparellen a costats oposats del derivatiu).

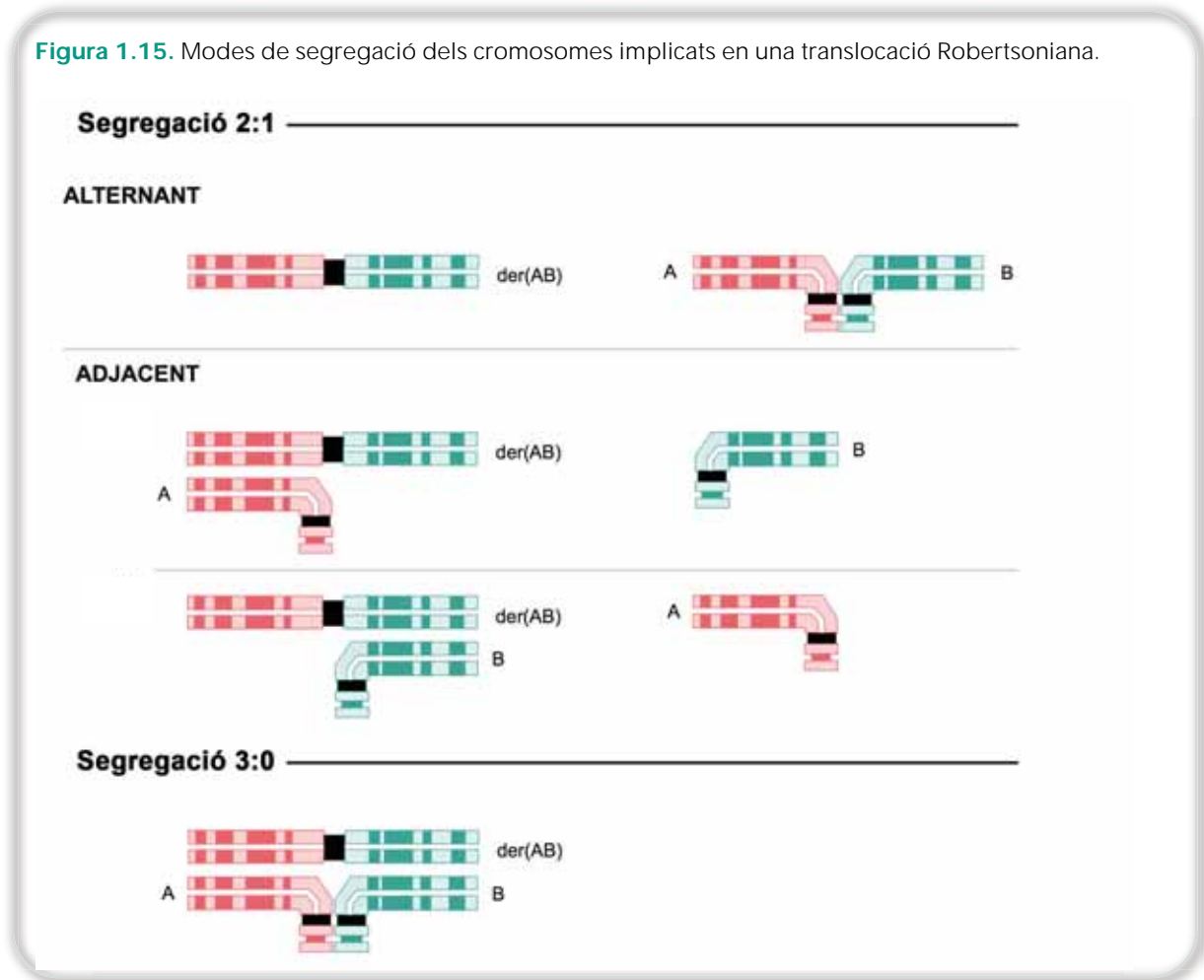
Figura 1.14. Aparellament dels cromosomes implicats en una translocació Robertsoniana formant un trivalent.



El trivalent origina tres modes de segregació durant l'anafase I que poden resultar en vuit productes de segregació diferents (Figura 1.15). Les segregacions 2:1 inclouen la segregació alternant (els cromosomes normals i el derivatiu segreguen a pols oposats i originen un producte normal i un equilibrat) i la segregació adjacent (dos cromosomes segreguen a un pol i un cromosoma a l'altre, es poden donar dues combinacions diferents que originen quatre productes de segregació desequilibrats). Si no es produeix la segregació dels cromosomes que conformen el trivalent, el mode de segregació s'anomena 3:0 i es generen dos productes de segregació desequilibrats. En el cas de les translocacions Robertsonianes, els productes de segregació desequilibrats sempre comporten la formació de gàmetes amb disomies i nul·lisomies³.

³ Encara que ens referim a disomies i nul·lisomies, en un sentit estricte serien duplicacions i delecions parcials, ja que la formació d'una translocació Robertsoniana implica la pèrdua dels braços p del cromosomes reorganitzats.

Figura 1.15. Modes de segregació dels cromosomes implicats en una translocació Robertsoniana.

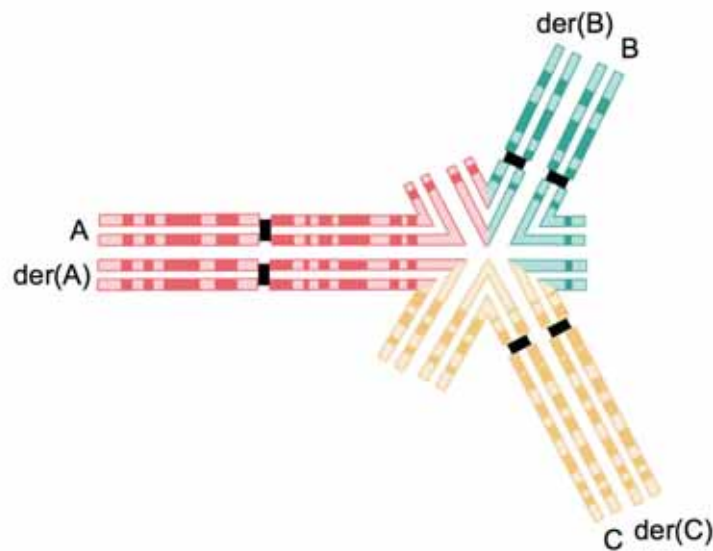


Els estudis realitzats en espermatozoides de portadors d'aquests tipus de reorganitzacions han posat de manifest un patró de segregació similar en tots els individus, independent dels cromosomes implicats. La segregació majoritària és l'alternant i origina un 84,5% de gàmetes normals o equilibrats. La segregació desequilibrada adjacent està representada per un 14,6% dels gàmetes i la 3:0 per una freqüència molt baixa (0,6%) (revisat per Anton et al. 2010).

Triples translocacions

En aquests tipus de reorganitzacions cromosòmiques, l'homosinapsi durant la profase I implica l'ordenació espacial dels cromosomes normals i reorganitzats en forma d'hexavalent (Figura 1.16).

Figura 1.16. Aparellament dels cromosomes implicats en una triple translocació formant un hexavalent.

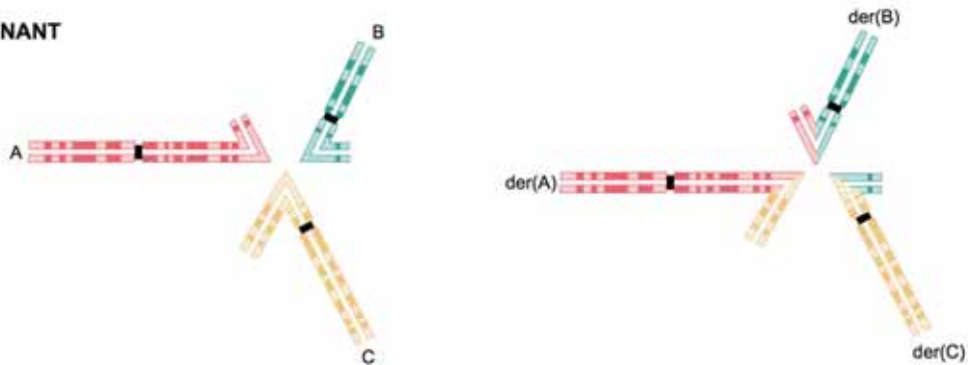


Aquesta estructura pot segregar de cinc formes diferents que poden originar fins a 64 productes de segregació (Figura 1.17). La segregació 3:3 es dona quan tres cromosomes segreguen a un pol i tres cromosomes a l'altre, inclou la segregació alternant (els cromosomes amb centròmers homòlegs segreguen a pols oposats i originen un producte normal i un equilibrat) i la no alternant (es poden donar nou combinacions diferents que originen 18 productes de segregació desequilibrats). La resta de segregacions inclouen la 4:2 (quatre cromosomes segreguen a un pol i dos cromosomes a l'altre, es poden donar 15 combinacions diferents que originen 30 productes de segregació desequilibrats), la 5:1 (cinc cromosomes segreguen a un pol i un cromosoma a l'altre, es poden donar sis combinacions diferents que originen 12 productes de segregació desequilibrats) i finalment la 6:0 (absència de segregació dels cromosomes que conformen l'hexavalent i formen dos productes de segregació desequilibrats). Les segregacions 3:3 no alternant, 4:2 o 5:1 originen gàmetes portadors de delecions, duplicacions o aneuploidies, mentre que la 6:0 dona lloc a gàmetes amb aneuploidies.

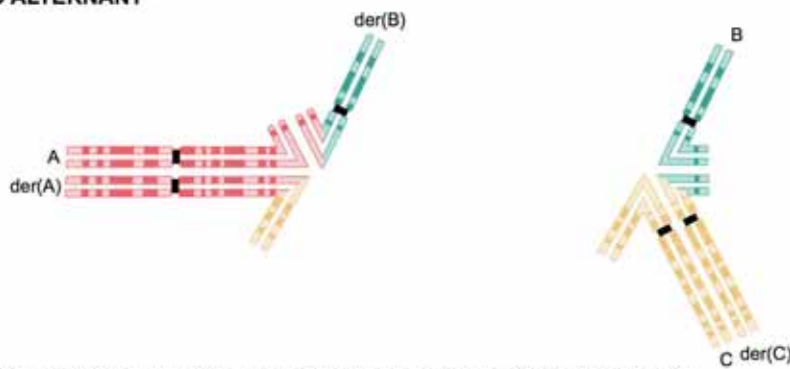
Figura 1.17. Exemples dels modes de segregació dels cromosomes implicats en una triple translocació.

Segregació 3:3

ALTERNANT

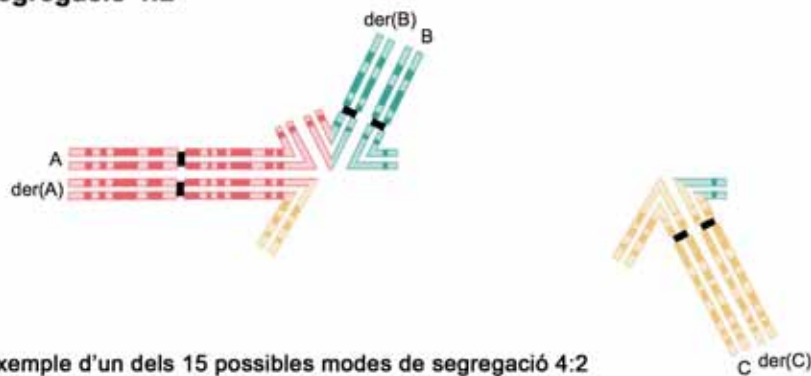


NO ALTERNANT



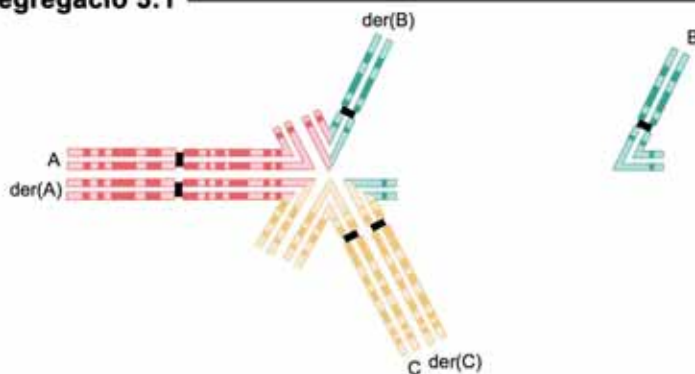
Exemple d'un dels 9 possibles modes de segregació 3:3 no alternant

Segregació 4:2



Exemple d'un dels 15 possibles modes de segregació 4:2

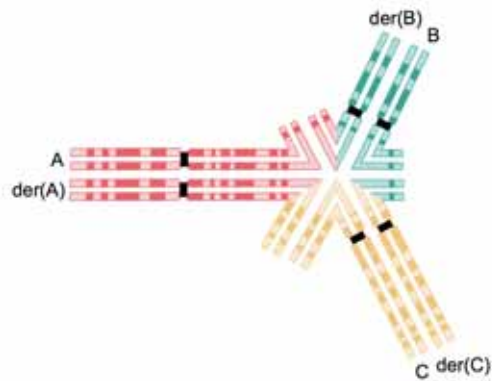
Segregació 5:1



Exemple d'un dels 6 possibles modes de segregació 5:1

Figura 1.17. (Cont.)

Segregació 6:0



Les dades publicades referents a la segregació en espermatozoides de portadors d'aquest tipus de reorganitzacions evidencien una distribució similar del patró dels diferents modes de segregació. En general s'observa una escassa producció de gàmetes normals o equilibrats resultants de la segregació 3:3 alternant (17,9%). En canvi, les segregacions que predominen són les desequilibrades 3:3 no alternant (43,5%), 4:2 (28,9%) i 5:1 (1,9%); mentre que la disjunció 6:0 és molt escassa (0,3%) (Cifuentes et al. 1998; Loup et al. 2010; Pellestor et al. 2011b; Hornak et al. 2014). En aquest tipus de reorganitzacions és usual observar productes de segregació que no es corresponen a cap dels modes teòrics de segregació i que es relacionen amb la formació de quiasmes als segments intersticials de l'hexavalent o a esdeveniments de no disjunció a la segona divisió meiótica.

1.5.2. Efecte Intercromosòmic

Un segon aspecte relacionat amb la producció d'espermatozoides amb anomalies cromosòmiques en portadors de reorganitzacions estructurals és l'aparició del fenomen d'ICE. Va ser descrit en humans per primera vegada per Lejeune (1963) al suggerir que la presència d'una reorganització cromosòmica estructural podria tenir un efecte en la segregació d'altres cromosomes del cariotip. Es va basar en la detecció d'un increment de portadors de translocacions recíproques entre els pares amb descendència afectada per la síndrome de Down. D'ençà de la descripció del fenomen, altres estudis epidemiològics han realitzat observacions similars, tant en progenitors portadors de translocacions recíproques (Aurias et al. 1978; Lindenbaum et al. 1985; Couzin et al. 1987), com de translocacions Robertsonianes (Lindenbaum et al. 1985).

Pel que fa al seu mecanisme d'actuació, l'ICE es relaciona amb la presència d'aparellaments heteròlegs entre els cromosomes reorganitzats i altres bivalents durant la profase I. Tal i com s'ha descrit a l'apartat 1.5.1, els cromosomes reorganitzats i els seus homòlegs han d'adoptar configuracions complexes per assolir l'homosinapsi, ja sigui en forma de tetravalent (translocacions recíproques), trivalent (translocacions Robertsonianes) o hexavalent (triples translocacions). Tot i així, la complexitat de la disposició espacial que han d'adoptar els cromosomes és un factor que ho pot dificultar. En aquest sentit, hi ha un número significatiu d'estudis en cèl·lules germinals procedents d'individus portadors de reorganitzacions estructurals que evidencien la presència de regions asinàptiques a paquitè, ja sigui al voltant dels punts de trencament o a les regions distals. Pel que fa a portadors de translocacions recíproques, la majoria d'estudis han observat un alt grau d'asinapsi entre els cromosomes reorganitzats, amb percentatges que oscil·len entre el 30% i el 100% (Chandley et al. 1986; Gabriel-Robez et al. 1986; Johanisson et al. 1987; Yu et al. 1995; Oliver-Bonet et al. 2005; Pigozzi et al. 2005; Sciarano et al. 2007, 2011; Ferguson et al. 2008; Leng et al. 2009). En portadors de translocacions Robertsonianes, també s'ha observat asinapsi entre el 25% i el 100% dels trivalents (Luciani et al. 1984; Johanisson et al. 1987; Guichaoua et al. 1990; Navarro et al. 1991; Sciarano et al. 2007, 2011; Kirkpatrick et al. 2015). Una conseqüència de la presència de regions asinàptiques és la formació d'aparellaments sinàptics heteròlegs amb altres regions asinàptiques del genoma. Així, la majoria d'aquests estudis també evidencien l'existència d'heterosinapsi dels cromosomes reorganitzats tant amb la SV (Luciani et al. 1984; Chandley et al. 1986; Gabriel-Robez et al. 1986; Johanisson et al. 1987; Guichaoua et al. 1990; Navarro et al. 1991; Yu et al. 1995; Oliver-Bonet et al. 2005; Pigozzi et al. 2005; Sciarano et al. 2007, 2011; Ferguson et al. 2008; Leng et al. 2009; Kirkpatrick et al. 2015), com amb altres bivalents (Luciani et al. 1984; Oliver-Bonet et al. 2005; Sciarano et al. 2011). De fet, hi ha bivalents més susceptibles que d'altres a presentar regions asinàptiques al llarg de la profase I, com per exemple els cromosomes sexuals que només comparteixen les regions d'homologia PAR (Tres 2005), els satèl·lits del cromosomes acrocèntrics que presenten heterocromatina polimòrfica, o els cromosomes amb un alt contingut d'heterocromatina pericentromèrica (ex. cromosomes 1 i 9) (Codina-Pascual et al. 2006b).

Tot i que l'heterosinapsi és un mecanisme d'ajustament sinàptic que permet evitar l'exposició de regions asinàptiques i superar el punt de control de paquitè, també pot alterar la formació i distribució dels quiasmes (Pigozzi et al. 2005; Ferguson et al. 2008; Leng et al. 2009). Aquest fet pot tenir una influència en la segregació d'aquests cromosomes, i provocar l'aparició d'aneuploidies en els gàmetes. En aquest sentit, hi ha estudis que relacionen

alteracions en el número i localització dels quiasmes amb la producció de gàmetes aneuploides (Shi et al. 2001; Ma et al. 2006; Lu et al. 2012).

Així doncs, el fenomen d'ICE en portadors de translocacions comporta un increment de la freqüència d'espermatozoides amb anomalies numèriques de cromosomes no implicats en la reorganització. De forma general s'ha observat que un 43,9% dels portadors de translocacions recíproques i un 54,5% del conjunt de portadors de translocacions Robertsonianes mostren un ICE positiu (entès com un increment en la freqüència d'espermatozoides amb anomalies numèriques de cromosomes no implicats en la reorganització) (revisat per Anton et al. 2011). Hi ha poques dades per estimar la freqüència d'ICE en portadors de triples translocacions, però tots els estudis publicats han descrit increments significatius d'anomalies numèriques tant pels cromosomes sexuals (Pellestor et al. 2011b; Hornak et al. 2014), com pels cromosomes acrocèntrics 13 i 21 (Kirkpatrick i Ma, 2012). Alguns estudis en espermatozoides han intentat relacionar la presència/absència d'ICE amb les característiques citogenètiques dels cromosomes translocats o amb característiques de l'individu com l'edat o el seminograma, però no s'ha establert cap lligam evident (Anton et al. 2008).

1.5.3. Relació entre segregació dels cromosomes reorganitzats i ICE

És habitual que els portadors de reorganitzacions cromosòmiques sol·licitin assessorament genètic reproductiu degut als problemes de fertilitat relacionats amb l'alta susceptibilitat de producció de gàmetes amb anomalies cromosòmiques que presenten. El plantejament d'un estudi per avaluar el risc genètic d'aquests individus pot incloure l'anàlisi dels dos principals factors de risc: d'una banda, el comportament meiòtic de la reorganització a través de l'estudi dels productes de segregació dels cromosomes implicats en la reorganització; i de l'altra, el fenomen d'ICE a través de l'anàlisi de la freqüència d'anomalies numèriques de cromosomes no relacionats amb la reorganització (Anton et al. 2007). Aquests estudis es realitzen mitjançant la tècnica de FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*) en espermatozoides, i la valoració d'ambdós factors es duu a terme en preparacions diferents i per tant, en nuclis d'espermatozoides diferents. Així doncs, els estudis publicats han permès determinar la influència de cada factor per separat, però no establir si existeix una relació entre les anomalies cromosòmiques derivades d'ambdós factors.

La relació entre la presència d'anomalies numèriques derivades de l'ICE i anomalies de segregació de forma combinada podria residir en l'aparició de fenòmens d'heterosinapsi. Seria interessant determinar si l'heterosinapsi pot tenir un efecte bidireccional, és a dir, si afecta tant a la disjunció dels cromosomes reorganitzats com a la dels altres bivalents implicats, amb la conseqüent producció d'espermatozoides amb desequilibris de segregació a més d'altres anomalies numèriques. La realització d'estudis citogenètics adreçats a establir si existeix algun factor que permeti relacionar els dos fenòmens ajudaria a comprendre millor el comportament meiótic de les diferents reorganitzacions, així com establir quines característiques citogenètiques o factors de risc poden influenciar la producció d'espermatozoides portadors d'anomalies cromosòmiques.

1.6. Arquitectura nuclear en espermatozoides

La idea de l'existència d'una organització cromosòmica no aleatòria en nuclis interfàsics va ser introduïda per Boveri a principis del segle XX, qui va proposar el nom de Territoris Cromosòmics (*Chromosome Territories*, CT) a les regions discretes del nucli ocupades per cromosomes individuals. Els estudis experimentals publicats al llarg dels anys evidencien aquest tipus d'organització no aleatòria dins del nucli (revisat per Cremer i Cremer, 2010). S'han descrit dos models de posicionament dels CT en nuclis de cèl·lules somàtiques humanes: un es basa en la descripció de la disposició radial de cada CT dins el nucli, i l'altre en el patró de proximitat de cada CT en relació als cromosomes propers.

- Els estudis d'organització radial prenen com a referència el volum nuclear, el qual es divideix en àrees concèntriques que permeten establir posicions en relació a l'eix radial (interior-perifèria). El posicionament preferent dels cromosomes en determinades regions nuclears s'ha relacionat amb diferents característiques citogenètiques com la mida dels cromosomes o la seva densitat gènica (revisat per Cremer i Cremer, 2010). En aquest sentit, s'ha establert que els cromosomes amb una alta densitat gènica es localitzen preferentment a l'interior del nucli, mentre que els que tenen una baixa densitat gènica es localitzen a la perifèria. Pel que fa a la mida dels cromosomes, s'ha determinat que els cromosomes grans se situen preferentment a la perifèria del nucli, mentre que els petits ho fan preferentment a l'interior (Croft et al. 1999; Sun et al. 2000; Bolzer et al. 2005). D'altra banda, també s'han descrit relacions del posicionament radial de determinats segments cromosòmics amb factors com l'activitat transcripcional (Goetze et al. 2007) o el temps d'inici de replicació

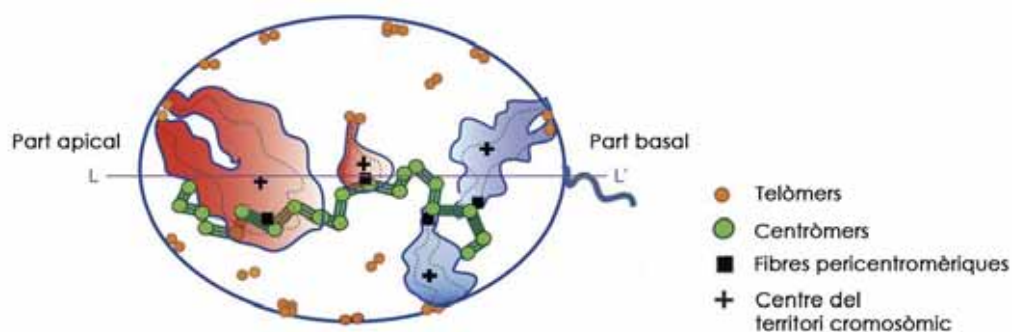
Introducció

(Grasser et al. 2008), de forma que els dominis amb una alta activitat transcripcional i els loci de replicació primerenca es troben de forma preferent cap a l'interior del nucli; mentre que els dominis de baixa activitat transcripcional i els loci de replicació tardana es troben més cap a la perifèria del nucli.

- Els estudis d'organització en relació als CT veïns, també anomenats estudis de patró de proximitat, fan referència a la posició d'un determinat CT en relació als que l'envolten. En aquest cas, s'han realitzat observacions que indiquen certes preferències en les relacions de proximitat entre CT, tot i que les associacions semblen ser específiques dels diferents tipus cel·lulars estudiats (Parada et al. 2004; Zeitz et al. 2009). De totes maneres, no s'han trobat implicacions funcionals en les relacions de proximitat dels CT. Contràriament, altres estudis han observat variabilitat entre els patrons de proximitat dels CT dins el mateix tipus cel·lular (Bolzer et al. 2005).

Pel que fa al posicionament cromosòmic en el nucli de l'espermatozoide humà, s'ha proposat que l'organització dels CT tampoc és aleatòria (Hazzouri et al. 2000; Millan et al. 2012). L'organització radial també estaria influenciada per la mida i la densitat gènica dels cromosomes (Manvelyan et al. 2008). La morfologia característica dels espermatozoides també ha permès establir el posicionament dels CT en un eix longitudinal, agafant com a referència l'acrosoma (part apical) i el punt d'inserció de la cua (part basal). Referent a l'estructura interna dels CT, s'ha establert que la cromatina adopta una forma de U dins del nucli de l'espermatozoide, amb el centròmer situat en una posició més interna, i els telòmers orientats cap a la perifèria (Mudrak et al. 2005, 2012) (Figura 1.18). A més, s'ha evidenciat que els centròmers segueixen una distribució lineal al centre del nucli, i estan connectats entre ells formant una estructura contínua anomenada cromocentre (Ioannou et al. 2011; Mudrak et al. 2012)

Figura 1.18. Model d'estructura dels territoris cromosòmics dins el nucli d'espermatozoide.



(Figura adaptada de Mudrak et al. 2012)

Diversos estudis han suggerit que la presència d'alteracions en la territorialitat nuclear dels cromosomes podria comportar una disminució del potencial fèrtil dels individus. En aquest sentit, Zalensky i Zalenskaya (2007) van observar alteracions dels CT en pacients amb infertilitat idiopàtica. Altres autors com Finch et al. (2008) van observar alteracions de la posició dels centròmers en espermatozoides d'individus amb paràmetres seminals alterats. A més, Alladin et al. (2013) van descriure diferències en l'organització del cromocentre en espermatozoides immòbils respecte espermatozoides mòbils dels mateixos individus.

Hi ha poques dades que facin referència específica a estudis de CT en espermatozoides de portadors de reorganitzacions cromosòmiques. Wiland et al. (2008) van analitzar el posicionament de centròmers tant de cromosomes implicats en translocacions recíproques com de cromosomes no involucrats en les reorganitzacions. Van demostrar canvis no aleatoris en la localització dels centròmers de cromosomes translocats respecte els valors en individus control, tant en l'eix longitudinal (apical-basal) com en el radial (interior-perifèria). També van observar alteracions en el posicionament nuclear de cromosomes no implicats en les reorganitzacions, de forma que els resultats apunten a una possible influència de la posició dels cromosomes reorganitzats sobre la posició d'altres cromosomes. En aquest context, Karamysheva et al. (2014) van estudiar la posició de sis cromosomes en espermatozoides de dos germans portadors d'un cromosoma marcador i van observar alteracions en l'arquitectura nuclear de diversos cromosomes respecte les posicions d'un individu control, que es van relacionar amb la presència del cromosoma addicional. Tanmateix, hi ha estudis que relacionen la presència d'aneuploidies amb alteracions en la topologia nuclear. Per exemple, Olszewska et al. (2008) van suggerir que la presència d'aneuploidies en cèl·lules precursors de l'espermatogènesi d'individus infèrtils pot alterar l'organització dels cromosomes en CT durant la meiosi, i en conseqüència, provocar canvis en la topologia nuclear dels espermatozoides.

Les conseqüències d'una territorialitat alterada en espermatozoides s'han relacionat amb els mecanismes de control epigenètic de l'embrió. De forma més concreta, l'alteració dels CT pot influir en la descondensació i remodelació de la cromatina després de la fecundació (activació del genoma patern) i condicionar la disposició dels cromosomes durant la primera divisió mitòtica del zigot, que provocaria anomalies en l'establiment de la impressió genètica (Hazzouri et al. 2000; Cremer et al. 2004; Foster et al. 2005; Zalensky i Zalenskaya, 2007; Miller et al. 2010). En aquest sentit, l'arquitectura nuclear de l'espermatozoide podria ser un factor important per un correcte desenvolupament embrionari primerenc (Mudrak et al. 2005).

2. Objectius



Hipòtesi inicial

En individus portadors de translocacions cromosòmiques, la segregació desequilibrada dels cromosomes reorganitzats està relacionada amb la no disjunció de cromosomes no implicats en la reorganització. Aquesta relació és atribuïble a un efecte bidireccional del fenomen d'heterosinapsi entre els cromosomes implicats, que dóna lloc a anomalies cromosòmiques i pot alterar la territorialitat dels cromosomes.

Objectius

Primer

Desenvolupar un mètode d'anàlisi seqüencial basat en tècniques d'hibridació *in situ* fluorescent que permeti identificar la presència d'anomalies cromosòmiques numèriques i determinar el mode de segregació dels cromosomes reorganitzats sobre els mateixos espermatozoides.

Segon

Caracteritzar els patrons de segregació que mostren diferents reorganitzacions cromosòmiques (translocacions recíproques, translocacions Robertsonianes i triples translocacions) en espermatozoides recomptats aleatòriament i en espermatozoides portadors d'anomalies numèriques.

Tercer

Determinar si existeix una relació entre els diferents modes de segregació dels cromosomes reorganitzats i la producció d'espermatozoides amb anomalies numèriques.

Quart

Desenvolupar una tècnica d'anàlisi que permeti valorar la disposició tridimensional dels territoris cromosòmics en nuclis d'espermatozoides.

3. Material i mètodes



3.1. Anàlisi del contingut cromosòmic

3.1.1. Mostres biològiques

S’han analitzat mostres de semen procedents de vuit individus portadors de translocacions recíproques, onze portadors de translocacions Robertsonianes i un individu portador d’una triple translocació. La informació relativa als pacients analitzats, que inclou el cariotip, el seminograma (analitzat segons els criteris de la OMS [Cooper et al. 2010]), l’edat i el centre de procedència, està especificada a la Taula 3.1.

Un criteri d’inclusió dels individus va ser que presentessin un resultat d’efecte intercromosòmic positiu, és a dir, increments significatius en la freqüència d’espermatozoides diploides o aneuploides de com a mínim un cromosoma no implicat en la reorganització. Aquesta informació es va recollir a partir d’estudis publicats prèviament, o de dades internes del nostre grup (Taula 3.1).

Taula 3.1. Característiques dels individus analitzats.

Reorganització	Cariotip	Cas	Edat	Sem.	Centre	ICE	Publicació
Translocacions recíproques	46,XY,t(5;8)(q33;q13)	Rcp1	42	N	IBQ	Aneupl. X/Y; Dipl.	Anton et al. 2008
	46,XY,t(8;14)(q22;q32)	Rcp2	39	-	CPC	Aneupl. 18, X/Y; Dipl.	Anton et al. 2008
	46,XY,t(9;19)(q10;p10)	Rcp3	34	-	PG	Dipl.	Anton et al. 2008
	46,XY,t(5;8)(p14;q22)	Rcp4	32	A	HUQD	Aneupl.13, 21, X/Y; Dipl.	NP
	46,XY,t(10;14)(q24.2;p11.2)	Rcp5	40	OA	HC	Aneupl. X/Y; Dipl.	Anton et al. 2008
	46,XY,t(3;14)(q25;q32)	Rcp6	-	-	PG	Aneupl. 13, 18, 21, X/Y; Dipl.	NP
	46,XY,t(6;8)(q26;p12)	Rcp7	-	N	IVI	Aneupl. 18, X/Y; Dipl.	NP
	46,XY,t(8;11)(q24.1;q13.1)	Rcp8	31	OAT	F	Aneupl. 13, 18, 21, X/Y; Dipl.	NP
Translocacions Robertsonianes	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	Rob1	38	N	CIM	Aneupl. 18; Dipl.	NP
	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	Rob2	-	O	HUQD	Aneupl. X/Y	NP
	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	Rob3	-	OA	HC	Aneupl. 18, 22, X/Y	NP
Translocacions	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	Rob4	30	OAT	UAB	Aneupl. 18, 21, 22, Dipl.	NP

Reorganització	Cariotip	Cas	Edat	Sem.	Centre	ICE	Publicació
Robertsonianes	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	Rob5	32	OAT	IVI	Aneupl. X/Y	Anton et al. 2004
	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	Rob6	34	T	RS	Aneupl.18, X/Y	NP
	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	Rob7	35	T	RS	Aneupl.18, 21, 22, X/Y; Dipl.	NP
	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	Rob8	34	N	RS	Aneupl.18, 22, X/Y; Dipl.	NP
	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	Rob9	38	OA	RS	Aneupl.18, X/Y; Dipl.	NP
	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	Rob10	31	OT	RS	Aneupl.18, 22, X/Y; Dipl.	NP
	45,XY, der(13;22)(q10;q10)	Rob11	28	OA	IVI	Aneupl. X/Y; Dipl.	Anton et al. 2010
Triple translocació	46,XY,t(1;8;2)(q42;p21;p15)	Tt 1	35	A	HUQD	Aneupl.18, X/Y; Dipl.	NP

Sem., Seminograma; N, Normozoospermia; A, Astenozoospermia; O, Oligozoospermia; T, Teratozoospermia; OA, Oligoastenozoospermia; OT, Oligoteratozoospermia; OAT, Oligoastenoteratozoospermia
 IBQ, Institut Bioquímico Flor de Maig; CPC, Centro de Patología Celular; PG, Prenatal Genetics; HUQD, Hospital Universitari Quirón-Dexeus; HC, Hospital Clínic; IVI, Instituto Valenciano de Infertilidad; F, Fecumed; CIM, Centre d'Infertilitat de Mataró; UAB, Universitat Autònoma de Barcelona; RS, Reprogenetics Spain
 Aneupl., Aneuploidia; Dipl., Diploidia
 NP, dades no publicades prèviament

3.1.2. Processament i emmagatzematge de les mostres

El processament de les mostres, la fixació dels espermatozoides i la seva extensió en portaobjectes es resumeix en el protocol que es descriu a continuació (Sarrate i Anton, 2009):

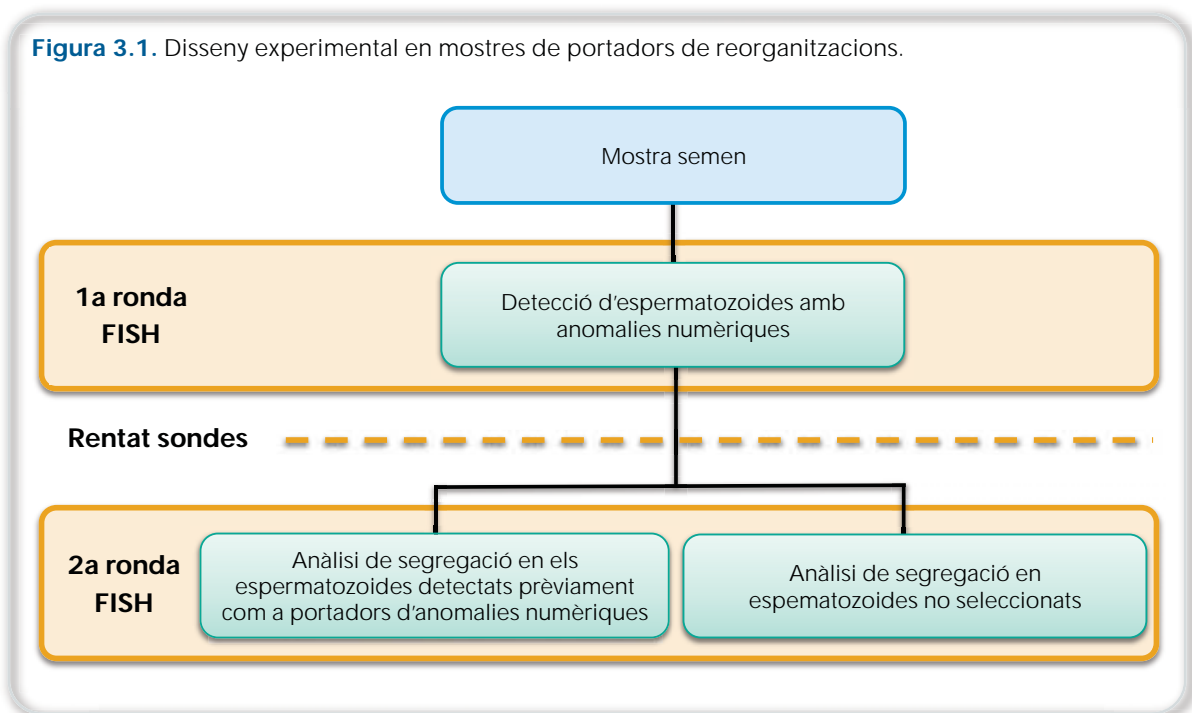
- Centrifugar la mostra a 1.000 g durant 5 minuts per tal de concentrar els espermatozoides al fons del tub.
- Separar el plasma seminal de la fracció cel·lular (*pellet*) amb una pipeta pasteur.
- Ressupndre el *pellet* amb una solució hipotònica (KCl 0,075 M) a 37°C, gota a gota en agitació.
- Incubar la mostra amb la solució hipotònica durant 30 minuts a 37°C.
- Centrifugar a 1.000 g durant 5 minuts i eliminar el sobrenedant per decantació.
- Ressupndre el *pellet* amb solució de *Carnoy* (proporcions 3:1 de metanol:àcid acètic) a 4°C, deixant-lo caure gota a gota en agitació.

- Repetir el pas de centrifugació i resuspensió amb *Carnoy* entre 3 i 5 vegades, fins que el *pellet* queda suficientment net (color blanc).
- Realitzar les extensions cel·lulars deixant caure una gota de la mostra sobre portaobjectes prèviament desengreixats amb metanol.
- Emmagatzemar les extensions a -20°C fins a la seva utilització.

3.1.3. FISH seqüencial en espermatozoides

El procediment de FISH seqüencial optimitzat inclou tres etapes. En primer lloc s'ha realitzat una FISH en espermatozoides amb la finalitat de detectar nuclis amb anomalies numèriques de cromosomes no implicats en les reorganitzacions. A continuació, s'han eliminat els senyals d'hibridació per tal de poder aplicar una segona ronda de FISH sobre la mateixa mostra. En aquesta segona FISH, l'objectiu ha estat analitzar els productes de segregació dels cromosomes reorganitzats, tant en els espermatozoides detectats com aneuploides i diploides en la primera ronda de FISH, com en una població aleatòria d'espermatozoides (Figura 3.1).

Figura 3.1. Disseny experimental en mostres de portadors de reorganitzacions.



a) Primera ronda de FISH: detecció d'anomalies numèriques

L'objectiu de la primera ronda de FISH ha estat identificar espermatozoides portadors de dos tipus d'anomalies numèriques: aneuploidies i diploidies. El procediment es detalla en el següent protocol (adaptat de Sarrate i Anton [2009]):

I-a. Descondensació del nucli dels espermatozoides

El nucli de l'espermatozoide presenta una cromatina molt compactada degut a l'establiment d'enllaços disulfur entre els grups tiol de les protamines. Per permetre l'accés de les sondes de DNA a les seves seqüències complementàries, és necessari aplicar un pas previ de descondensació mitjançant una solució que conté 1,4-Ditiotreitòl (DTT) (Roche Diagnostics, Barcelona, Espanya). El DTT trenca els enllaços disulfur que estableixen les protamines i per tant redueix la compactació de la cromatina. Aquesta descondensació s'ha realitzat seguint el següent procediment:

- Submergir el portaobjectes dues vegades consecutives durant 3 minuts cada una en una solució salina de citrat de sodi (2xSSC) (Vysis, Abbott Molecular Inc., Illinois, Estats Units).
- Deshidratar la mostra amb la immersió del portaobjectes en un gradient d'etanol (70%-90%-100%) durant 2 minuts a cada solució.
- Submergir el portaobjectes en una solució de 5 mM DTT, 1% Tritó X-100 i 50 mM Tris (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol) a $\text{pH}=7,4\pm 0,2$. El temps d'incubació pot variar entre 4 i 12 minuts en funció de les característiques de la mostra i del tipus de sonda.
- Realitzar un rentat post-descondensació amb la immersió del portaobjectes en dues solucions de 2xSSC durant 3 minuts en cadascuna.
- Deshidratar la mostra amb la immersió del portaobjectes en un gradient d'etanol (70%-90%-100%) durant 2 minuts a cada solució.
- Deixar assecar el portaobjectes.

II-a. Desnaturalització de la mostra

Per tal de fer accessible el DNA de la mostra a les sondes, aquest s'ha de desnaturalitzar mitjançant una solució que contingui formamida (Roche Diagnostics). La seva funció és disminuir la temperatura de desnaturalització del DNA. Això permet preservar la morfologia i estructures cel·lulars per poder realitzar estudis *in situ*. Aquest procediment s'ha realitzat de la següent manera:

- Submergir el portaobjectes en una solució de desnaturalització (formamida al 70% diluïda en 2xSSC, pH=7,5 ±0,5) durant 5 minuts a 73°C.
- Deshidratar la mostra amb la immersió del portaobjectes en un gradient d'etanol (70%-85%-100%) durant 1 minut a cada solució.
- Deixar assecar el portaobjectes.

III-a. Disseny de sondes

En la primera ronda de FISH s'han utilitzat dues combinacions de sondes seleccionades específicament per analitzar anomalies numèriques de cinc cromosomes. En tots els casos s'ha analitzat una combinació formada pels cromosomes X/Y/18 (combinació A). La segona combinació de sondes (combinació B) ha estat condicionada per les característiques citogenètiques dels individus analitzats i ha inclòs els cromosomes 13/21, 21/22 o 15/21. Aquestes anàlisis s'han realitzat en portaobjectes diferents per a cadascuna de les combinacions. El recull de sondes utilitzades per a cada individu es detalla a la Taula 3.2.

Taula 3.2. Sondes utilitzades per la detecció d'anomalies cromosòmiques numèriques.

Tipus reorganització	Combinació A			Combinació B		
	<i>Spectrum Green</i>	<i>Spectrum Orange</i>	<i>Spectrum Aqua</i>	<i>Spectrum Green</i>	<i>Spectrum Orange</i>	<i>Platinum Bright415</i>
Rcp1-8	CEP X (Xp11.1- q11.1)	CEP Y (Yp11.1- q11.1)	CEP 18 (18p11.1- q11-1)	LSI 13 (13q14)	LSI 21 (21q22.13- q22.2)	-
Rob1-10	CEP X (Xp11.1- q11.1)	CEP Y (Yp11.1- q11.1)	CEP 18 (18p11.1- q11-1)	LSI 22 <i>BCR</i> ^a (22q11.2)	LSI 21 ^a (21q22.13- q22.2)	-
Rob11	CEP X (Xp11.1- q11.1)	CEP Y (Yp11.1- q11.1)	CEP 18 (18p11.1- q11-1)	-	LSI 21 ^a (21q22.13- q22.2)	ST 15qter ^b (15qter)
Tt1	CEP X (Xp11.1- q11.1)	CEP Y (Yp11.1- q11.1)	CEP 18 (18p11.1- q11-1)	LSI 13 (13q14)	LSI 21 (21q22.13- q22.2)	-

CEP (*Centromeric Enumeration Probe*), sonda centromèrica; LSI (*Locus Specific Identifier*), sonda locus-específica; ST, sonda sub-telomèrica

Totes les sondes pertanyen a AneuVysion Multicolor DNA Kit (Abbot Molecular Inc.), a excepció de:

^a (Abbot Molecular Inc.)

^b (Leica Biosystems, Nussloch, Alemanya)

IV-a. Desnaturalització de sondes i hibridació

Abans d'utilitzar les sondes cal desnaturalitzar-les per obtenir DNA de cadena simple que pugui hibridar amb les seqüències complementàries del DNA diana. Amb aquesta finalitat,

Material i Mètodes

es barreja una alíquota de cada sonda amb un *buffer* (Abbot Molecular Inc.) que conté formamida i que és específic pel tipus de sondes utilitzades (CEP o LSI/telomèriques). El procediment és el següent:

- Mesclar les sondes: les proporcions necessàries són un 10% de cada sonda (màxim tres sondes) i un 70% de *buffer* específic. En funció del número de sondes, s'afegeix entre un 0-20% d'aigua destil·lada.
- Desnaturalitzar la combinació de sondes durant 5 minuts a 73°C. Les sondes procedents de l'*Aneuvysion Multicolor DNA Kit* es comercialitzen mesclades i desnaturalitzades, i per tant no són necessàries aquestes dues etapes del procediment.
- Afegir les sondes sobre la mostra, col·locar un cobreobjectes a sobre i segellar la preparació amb cola d'enquadernar.
- Deixar incubar les preparacions durant 12-16 hores a 37°C en un sistema d'hibridació amb temperatura controlable (HYBrite, Vysis, Abbott Molecular Inc.).

V-a. Rentats post-hibridació i contratinició dels nuclis

Per tal d'eliminar les sondes no hibridades o les que hagin hibridat de forma inespecífica, és necessari realitzar rentats amb solucions salines que continguin detergents com l'NP40 (nonil fenoxipolietoxiletanol 40) (Abbott Molecular Inc.). Els rentats post-hibridació s'han realitzat seguint els següents passos:

- Retirar la cola i el cobreobjectes utilitzat durant el procés d'hibridació desplaçant-lo amb molt de compte per no malmetre la mostra.
- Submergir el portaobjectes en una solució de rentat 0,04xSSC/0,3% NP-40 durant 2 minuts a 73° C.
- Submergir el portaobjectes en una solució de rentat 2xSSC/0,1% NP-40 durant 1 minut a temperatura ambient.
- Deixar assecar el portaobjectes.
- Contratenyir la mostra amb DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) i segellar el cobreobjectes amb esmalt d'ungles.

VI-a. Anàlisi microscòpica

Les mostres s'han analitzat amb un microscopi d'epifluorescència Olympus BX60 (Olympus, Espanya) que disposa de filtres específics per als fluorocroms DAPI, *Spectrum Green*, *Spectrum Orange* i *Spectrum Aqua*.


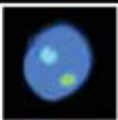

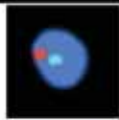





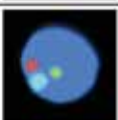

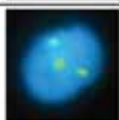





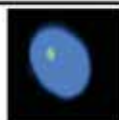

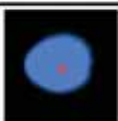

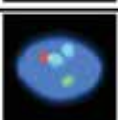

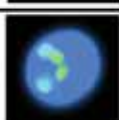

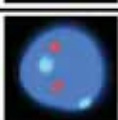
El microscopi disposa d'una platina motoritzada connectada a un sistema automatitzat de recompte de senyals d'hibridació (Spot Counting AX Software; Applied Imaging, Newcastle, Regne Unit). Aquest sistema consta de tres funcions principals:

- Funció assaig: permet definir els paràmetres de captura dels nuclis i dels senyals d'hibridació (temps d'exposició, intensitat, mida i distància entre senyals). També permet definir els paràmetres per la classificació dels genotips esperats i l'àrea de captura.

Els paràmetres de captura i de classificació de cada genotip (especificats a Molina et al. 2009) s'han basat en els criteris de valoració descrits prèviament pel nostre grup (Blanco et al. 1996). Segons aquests criteris, només es valoren els nuclis amb el contorn ben definit, no sobreposats i que presentin com a mínim un senyal d'hibridació. Així mateix, només es considera que hi ha dos senyals diferents del mateix fluorocrom quan aquests són de la mateixa mida, presenten la mateixa intensitat i la distància que els separa és igual o superior al seu diàmetre. Els criteris de classificació dels espermatozoides permeten diferenciar els següents genotips (Figura com 3.2):

- i) Espermatozoides haploides: presenten un senyal per cada fluorocrom analitzat. En el cas d'avaluar els cromosomes sexuals, els espermatozoides haploides presenten un senyal d'un gonosoma i un senyal per la resta de cromosomes analitzats.
- ii) Espermatozoides disòmics: presenten dos senyals del mateix cromosoma i un senyal per la resta de cromosomes analitzats. En el cas d'espermatozoides disòmics pels cromosomes sexuals, presenten dos senyals del mateix gonosoma o un senyal de cada gonosoma, i un senyal per la resta de cromosomes analitzats.
- iii) Espermatozoides nul·lisòmics: s'identifiquen per l'absència de senyal per un fluorocrom concret i un senyal per la resta de cromosomes. En el cas d'espermatozoides nul·lisòmics pels cromosomes sexuals, s'identifiquen per l'absència dels dos gonosomes i un senyal per la resta de cromosomes.
- iv) Diploides/múltiples disòmics (diploides/md): situació en què un nucli presenta dos senyals per tots els fluorocroms analitzats. En el cas d'avaluar els cromosomes sexuals, els espermatozoides diploides/md presenten dos senyals del mateix gonosoma o un senyal de cada gonosoma, i dos senyals per la resta de cromosomes.

Figura 3.2. Classificació dels diferents tipus d'anomalies numèriques pels cromosomes X/Y/18 detectats en la primera ronda de FISH.

Classificació	Combinació de senyals			
Haplòides	a) 		b) 	
Disòmic	c) 		d) 	
	e) 		f) 	
	g) 			
Nul·lisòmic	h) 		i) 	
	j) 			
Diploides/md	k) 		l) 	
	m) 			

Exemple d'un cas de translocació recíproca on s'han analitzat els cromosomes X (senyal verd), Y (senyal vermell) i 18 (senyal blau). a) espermatozoide haploide (X,18). b) espermatozoide haploide (Y,18). c) espermatozoide disòmic pel cromosoma 18 (X,18,18). d) espermatozoide disòmic pel cromosoma 18 (Y,18,18). e) espermatozoide disòmic pels cromosomes sexuals (X,Y,18). f) espermatozoide disòmic pel cromosoma X (X,X,18). g) espermatozoide disòmic pel cromosoma Y (Y,Y,18). h) espermatozoide nul·lisòmic pels cromosomes sexuals. i) espermatozoide nul·lisòmic pel cromosoma 18. j) espermatozoide nul·lisòmic pel cromosoma 18. k) espermatozoide diploide/md (X,Y,18,18). l) espermatozoide diploide/md (X,X,18,18). m) espermatozoide diploide/md (Y,Y,18,18).

- Funció captura: permet realitzar la captura dels espermatozoides continguts dins de l'àrea predefinida a través de l'adquisició d'imatges de cada nucli i de cada fluorocrom utilitzat. A partir dels paràmetres introduïts, el sistema fa una selecció dels nuclis capturats i els classifica segons la combinació de senyals de fluorescència que presenten.
- Funció revisió: permet visualitzar les imatges individualitzades de cada nucli i el genotip en què han estat classificats. El sistema permet eliminar de l'anàlisi els nuclis que no compleixen els requisits d'inclusió. A més, es poden reclassificar manualment els nuclis que han estat inclosos en categories errònies. La funció de revisió també inclou l'opció de relocalització i comprovació visual al microscopi. Aquesta especificitat tècnica és la que, a banda de permetre una comprovació addicional dels nuclis, permet realitzar estudis seqüencials sobre els mateixos nuclis.

Donat que la incidència d'aneuploidies i diploidies en espermatozoides és molt baixa (malgrat que els pacients presentin un ICE positiu, el rang de freqüència d'anomalies se situa entre 1-4%), s'han realitzat recomptes de 10.000 espermatozoides per a cada combinació de sondes (sempre que les característiques seminals dels individus ho hagin permès). Aquest valor es va estimar per permetre obtenir una població de com a mínim 100 espermatozoides amb anomalies numèriques per a cada individu analitzat.

b) Segona ronda de FISH: anàlisi de segregació

L'anàlisi de segregació dels cromosomes reorganitzats en cadascun dels portadors de les reorganitzacions estructurals s'ha realitzat utilitzant una combinació de sondes adequada per a diferenciar inequívocament els diferents modes de segregació en cada cas. Aquesta anàlisi s'ha realitzat sobre un conjunt aleatori d'espermatozoides (espermatozoides no seleccionats) i sobre els espermatozoides portadors d'anomalies numèriques identificats en la primera ronda d'hibridació (espermatozoides aneuploides i diploides/md). El protocol detallat per aquest procediment ha estat adaptat a partir de Sarrate i Anton (2009):

I-b. Esborrament dels senyals d'hibridació

L'esborrament dels senyals d'hibridació de la primera ronda és un pas imprescindible per evitar interferències en la valoració de senyals a la segona ronda. Aquest procediment es duu a terme mitjançant la incubació dels portaobjectes utilitzats per la detecció d'anomalies numèriques en una solució de rentat altament astringent. Els passos seguits han estat:

- Eliminar l'esmalt d'ungles i retirar el cobreobjectes desplaçant-lo amb molt de compte per no malmetre la mostra fixada.
- Submergir el portaobjectes en una solució 2xSSC a temperatura ambient durant 5 minuts.
- Submergir el portaobjectes en la solució de rentat 0,0625xSSC a 73°C durant 5 minuts.
- Deshidratar la mostra amb la immersió del portaobjectes en un gradient d'etanol (70%-85%-100%) durant 1 minut a cada solució.
- Deixar assecar el portaobjectes.

II-b. Descondensació addicional dels nuclis d'espermatozoides

En cas que les sondes a hibridar en la segona ronda tinguin una mida en Kb inferior respecte a les utilitzades en la primera ronda (p. ex. les sondes LSI i telomèriques són més petites que

les CEP), és necessari realitzar una pas addicional de descondensació de la cromatina espermàtica. Per a la descondensació addicional, s'ha aplicat el protocol desenvolupat en el punt I-a. En aquest cas, les mostres s'han incubat entre 1 i 4 minuts depenent del grau de descondensació assolit a la primera etapa de descondensació.

III-b. Desnaturalització de la mostra

Per tal de realitzar una segona hibridació, és convenient tornar a desnaturalitzar el DNA dels nuclis dels espermatozoides. Amb aquesta finalitat, s'ha aplicat el mateix protocol que el descrit anteriorment al punt II-a.

IV-b. Disseny de sondes

En la segona ronda de FISH s'ha utilitzat una combinació de sondes específica per a cada reorganització. El requeriment principal de selecció de les sondes a l'hora d'establir el disseny a utilitzar és que cada cromosoma implicat en la reorganització presenti una combinació de senyals diferent. D'aquesta manera, és possible distingir els genotips resultants de cada mode de segregació a partir de la valoració del nombre i color dels senyals d'hibridació presents en cada nucli d'espermatozoide.

El recull i característiques de sondes utilitzades en els individus portadors de translocacions recíproques i Robertsonianes estan especificades a la Taula 3.3.

Taula 3.3. Sondes utilitzades per l'anàlisi segregació en translocacions recíproques i Robertsonianes.

Tipus reorganització	Cariotip	Spectrum Green	Spectrum Orange	Spectrum Aqua
Rcp1	46,XY,t(5:8)(q33;q13)	LSI D5S721, D5S23 (5p15.2)	LSI MYC (8q24.1)	CEP 8 (8p11.1-q11.1)
Rcp2	46,XY,t(8:14)(q22;q32)	ST 8qter ^a (8qter)	Tel 14q (D14S1420)	CEP 8 (8p11.1-q11.1)
Rcp3	46,XY,t(9:19)(q10;p10)	Tel 19p (129F16/SP6)	Tel 19q (D19S238E)	LSI 9q34 (9q34)
Rcp4	46,XY,t(5:8)(p14;q22)	LSI 5p15.2 (D5S721, D5S23)	LSI MYC (8q24.1)	CEP 8 (8p11.1-q11.1)
Rcp5	46,XY,t(10:14)(q24.2;p11.2)	ST 14qter ^a (14qter)	Tel 10q (D10S2290)	CEP 10 (10p11.1-q11.1)

Tipus reorganització	Cariotip	Spectrum Green	Spectrum Orange	Spectrum Aqua
Rcp6	46,XY,t(3;14)(q25;q32)	Tel 3p (D3S4559)	Tel 3q (D3S4560)	-
		ST 14qter ^a (14qter)	Tel 14q (D14S1420)	-
Rcp7	46,XY,t(6;8)(q26;p12)	Tel 6p (6PTEL48)	LSI <i>LPL</i> (8p22)	CEP 8 (8p11.1-q11.1)
Rcp7	46,XY,t(8;11)(q24.1;q13.1)	CEP 8 (8p11.1-q11.1)	Tel 11q (D11S1037)	CEP 11 (11p11.11-q11)
Rob1-10	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	LSI 13 (13q14)	Tel 14q (D14S1420)	-
Rob11	45,XY, der(13;22)(q10;q10)	LSI 22 <i>BCR</i> (22q11.2)	Tel 13q (D13S327)	-

CEP (*Centromeric Enumeration Probe*), sonda centromèrica; LSI (*Locus Specific Identifier*), sonda locus-específica; Tel/ST, sonda sub-telomèrica

Totes les sondes són d'Abbot Molecular Inc., a excepció de:

^a (Leica Biosystems (Nussloch, Alemanya). El fluorocrom d'aquesta sonda és PlatinumBright495.

L'anàlisi de segregació de la triple translocació requereix un mínim de cinc sondes que permetin marcar de forma diferent tots els cromosomes implicats. Donada la limitació de fluorocroms disponibles, s'han hagut de separar les cinc sondes en dues combinacions diferents (Taula 3.4) i per tant, s'ha afegit una tercera ronda d'hibridació al protocol per poder realitzar l'estudi de segregació complet d'aquesta reorganització (realització dels passos I-b a VII-b).

Taula 3.4. Sondes utilitzades per l'anàlisi segregació en la triple translocació en la segona i tercera ronda de FISH (combinacions A i B respectivament).

Cariotip	Combinació A			Combinació B	
	Spectrum Green	Spectrum Orange	Spectrum Aqua	Spectrum Green	Spectrum Orange
46,XY,t(1;8;2)(q42;p21;p15)	Tel 2p (VIJyRM2052)	Tel 1q (VIJyRM2123, 1QTEL10)	CEP 8 (8p11.1- q11.1)	Tel 8p (D8S504)	CEP 1 (1q12)

CEP (*Centromeric Enumeration Probe*), sonda centromèrica; Tel, sonda telomèrica

Totes les sondes són d'Abbot Molecular Inc.

V-b. Desnaturalització i hibridació de les sondes de la segona ronda

En el cas de les sondes de DNA utilitzades en els estudis de segregació, cal preparar la combinació les sondes i desnaturalitzar-les com a pas previ a la hibridació. S'ha utilitzat el procediment de desnaturalització i hibridació descrit al punt IV-a.

VI-b. Rentats post-hibridació i contratinció dels nuclis

Per a la realització dels rentats post-hibridació i contratinció dels nuclis, s'ha aplicat el mateix protocol especificat al punt V-a.

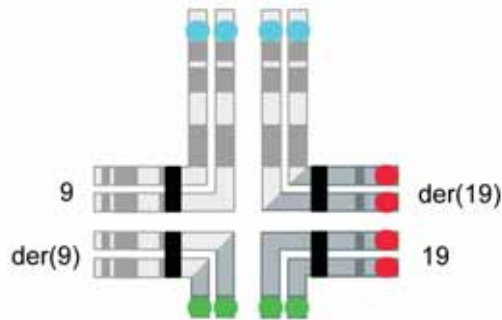
VII-b. Anàlisi microscòpica

La valoració microscòpica s'ha realitzat en el mateix microscopi utilitzat a la valoració de la primera ronda (Olympus BX60). S'ha realitzat l'anàlisi de segregació en una població aleatòria d'espermatozoides mitjançant un recompte manual. Concretament s'han analitzat entre 500 i 1.000 nuclis per individu. Per altra banda, i mitjançant l'opció de relocalització del sistema Spot Counting (descriu al punt VI-a), s'ha dut a terme l'anàlisi dels productes de segregació en els espermatozoides aneuploides i diploides/md detectats en la primera ronda. S'han analitzat un mínim de 100 espermatozoides aneuploides o diploides/md per individu.

La valoració dels senyals d'hibridació s'ha realitzat d'acord amb els criteris aplicats anteriorment en la primera ronda de FISH (punt VI-a) (Blanco et al. 1996). Cada nucli s'ha classificat en un mode de segregació determinat segons el nombre i color dels senyals d'hibridació que presentaven d'acord amb la combinació de les sondes utilitzades en cada cas concret (translocació recíproca, Figura 3.3; translocació Robertsoniana, Figura 3.4; triple translocació, Figura 3.5).

Figura 3.3. Estratègia de FISH per identificar els productes de segregació de les translocacions recíproques. A) Distribució de les sondes en el tetravalent d'un individu portador de t(9;19)(q10;p10). Tel 19p, *Spectrum Green* (senyal verd); Tel 19q, *Spectrum Orange* (senyal vermell); LSI 9q34, *Spectrum Aqua* (senyal blau). B) Combinacions de senyal esperades en cada mode de segregació i genotip dels nuclis corresponents

A)



B)

Segregacions	Combinació de senyals i genotip	
Alternant	a.i) 9,19 a.ii) der(9),der(19)	
Adjacent I	b) der(9),19	
	c) 9,der(19)	
Adjacent II	d) 9,der(9)	
	e) 19,der(19)	
3:1	f) der(9)	
	g) 9,19,der(19)	
	h) 9	
	i) der(9),19,der(19)	
4:0	j) 19	
	k) 9,der(9),der(19)	
4:0	l) der(19)	
	m) 9,der(9),19	
4:0	n) 9,der(9),19,der(19)	
		∅

Figura 3.4. Estratègia de FISH per identificar els productes de segregació de les translocacions Robertsonianes. A) Distribució de les sondes en el trivalent d'un individu portador de der(13;14)(q10;q10): LSI 13q14, *Spectrum Green* (senyal verd), Tel 14q, *Spectrum Orange* (senyal vermell). B) Combinacions de senyal esperades en cada mode de segregació i genotip dels nuclis corresponents.

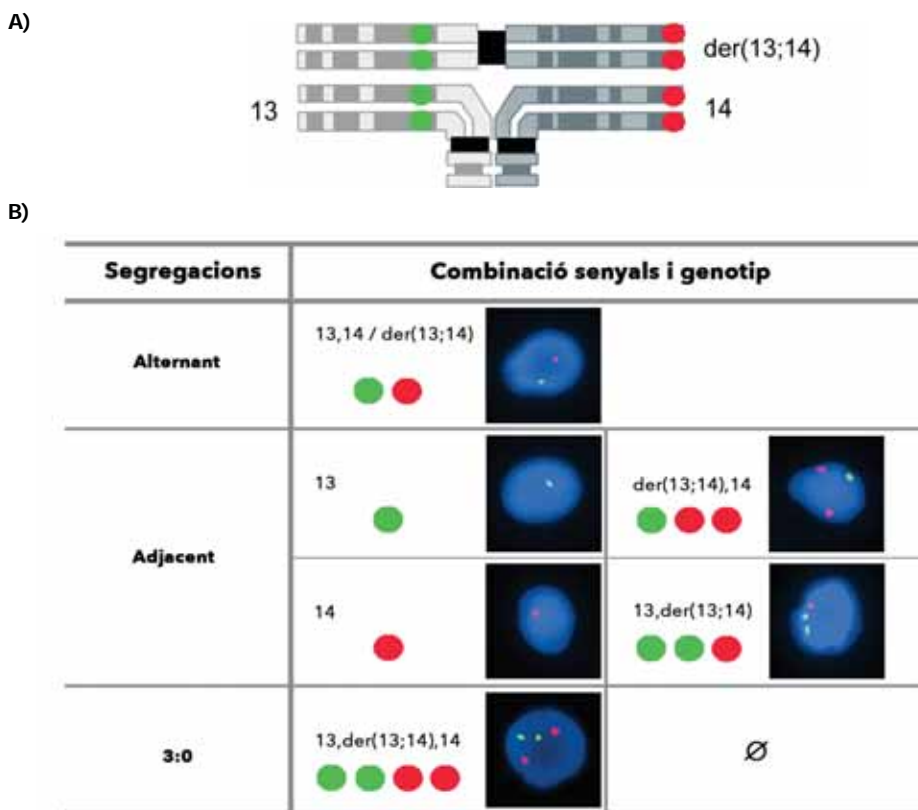


Figura 3.5. Estratègia de FISH per identificar els productes de segregació de l'individu portador de la triple translocació t(1;8;2)(q42;p21;p15). A) Distribució de les sondes en l'hexavalent. 2a ronda de FISH: Tel 8p, *Spectrum Green* (senyal verd); Tel 1q, *Spectrum Orange* (senyal vermell); CEP 8, *Spectrum Aqua* (senyal blau). 3a ronda de FISH: Tel 2p, *Spectrum Green* (senyal verd fosc); CEP 1, *Spectrum Orange* (senyal taronja). B) Combinacions de senyal esperades en cada mode de segregació i genotip dels nuclis corresponents

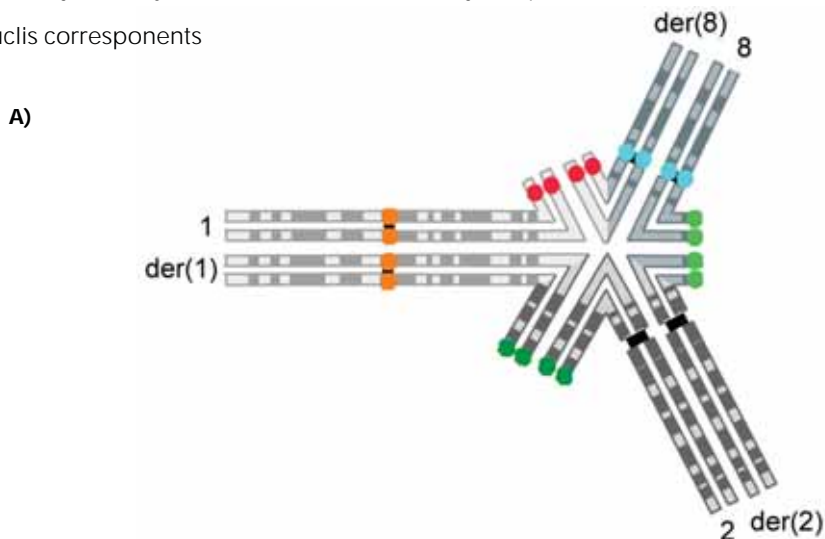












Figura 3.5. (Cont.)

B)

	Combinacions de senyals					Genotip
	2a ronda de FISH			3a ronda de FISH		
Segregacions						
3:3 alternant	1	1	1	1	1	1,2,8
	1	1	1	1	1	der(1),der(2),der(8)
3:3 no alternant (disjunció centròmers homòlegs)	2	1	1	0	1	der(1),2,der(8)
	0	1	1	2	1	1,der(2),8
	1	2	1	0	1	1,2,der(8)
	1	0	1	2	1	der(1),der(2),8
	2	0	1	1	1	der(1),2,8
	0	2	1	1	1	1,der(2),der(8)
3:3 no alternant (no disjunció centròmers homòlegs)	1	0	1	2	0	2,der(2),8
	1	2	1	0	2	1,der(1),der(8)
	1	2	1	0	1	1,2,der(8)
	1	0	1	2	1	der(1),der(2),8
	1	1	0	1	1	1,2,der(2)
	1	1	2	1	1	der(1),8,der(8)
	1	1	0	1	1	1,2,der(2)
	1	1	2	1	1	der(1),8,der(8)
	0	1	2	2	0	der(2),8,der(8)
	2	1	0	0	2	1,der(1),2
	1	1	1	1	0	2,der(2),der(8)
	1	1	1	1	2	1,der(1),8
4:2	2	1	0	1	2	1,der(1),2,der(2)
	0	1	2	1	0	8,der(8)
	1	1	1	2	1	1,2,der(2),8
	1	1	1	0	1	der(1),der(8)
	1	2	1	1	1	1,2,der(2),der(8)
	1	0	1	1	1	der(1),8
	1	2	2	1	1	1,2,8,der(8)
	1	0	0	1	1	der(1),der(2)
	0	2	2	2	1	1,der(2),8,der(8)
	2	0	0	0	1	der(1),2
	1	1	2	2	1	der(1),der(2),8,der(8)
	1	1	0	0	1	1,2
	2	1	2	1	1	der(1),2,8,der(8)
	0	1	0	1	1	1,der(2)
2	0	1	2	1	der(1),2,der(2),8	

	Combinacions de senyals					Genotip
	2a ronda de FISH			3a ronda de FISH		
Segregacions						
4:2	0	2	1	0	1	1,der(8)
	2	1	1	1	1	der(1),2,der(2),der(8)
	0	1	1	1	1	1,8
	1	2	2	1	2	1,der(1),8,der(8)
	1	0	0	1	0	2,der(2)
	1	1	2	2	0	2,der(2),8,der(8)
	1	1	0	0	2	1,der(1)
	1	2	1	1	2	1,der(1),der(2),der(8)
	1	0	1	1	0	2,8
	1	1	1	2	2	1,der(1),der(2),8
	1	1	1	0	0	2,der(8)
	2	2	1	0	2	1,der(1),2,der(8)
	0	0	1	2	0	der(2),8
	2	1	1	1	2	1,der(1),2,8
0	1	1	1	0	der(2),der(8)	
5:1	2	1	2	2	1	der(1),2,der(2),8,der(8)
	0	1	0	0	1	1
	1	2	2	2	1	1,2,der(2),8,der(8)
	1	0	0	0	1	der(1)
	1	2	2	2	2	1,der(1),der(2),8,der(8)
	1	0	0	0	0	2
	2	2	2	1	2	1,der(1),2,8,der(8)
	0	0	0	1	0	der(2)
	2	2	1	1	2	1,der(1),2,der(2),der(8)
	0	0	1	1	0	8
	2	1	1	2	2	1,der(1),2,der(2),8
0	1	1	0	0	der(8)	
6:0	2	2	2	2	2	1,der(1),2,der(2),8,der(8)

3.1.4. Anàlisi estadística

Per dur a terme les anàlisis estadístiques s'han utilitzat els programes Prism v5.0a (*GraphPad Software Inc.*) i JGR⁴ (*Java Gui for R*). En tots els casos s'han considerat significatius els p-valors < 0,05.

En primer lloc, s'ha determinat si existeixen diferències entre individus pel que fa a la distribució dels patrons de segregació observats en espermatozoides no seleccionats. S'ha dut a terme una anàlisi d'homogeneïtat entre els individus portadors del mateix tipus de reorganització (translocacions recíproques o Robertsonianes) mitjançant el test de distribució Kolmogorov-Smirnov.

En segon lloc, s'ha determinat si la distribució dels diferents modes de segregació és equivalent entre els diferents tipus d'aneuploidies. Aquesta anàlisi s'ha realitzat en cada conjunt d'individus mitjançant el test de distribució Kolmogorov-Smirnov, i a través de les següents comparacions:

- Comparacions del patró de segregació entre els gàmetes disòmics i gàmetes nul·lisòmics del mateix cromosoma.
- Comparacions del patró de segregació entre els gàmetes aneuploides per un cromosoma en particular i gàmetes aneuploides d'un cromosoma diferent.

Finalment, s'han comparat els resultats de segregació de la població d'espermatozoides no seleccionats amb les poblacions d'espermatozoides aneuploides i diploides. Aquestes anàlisis s'han fet de forma individual i poblacional per tal d'identificar:

- Variacions intraindividuals en la freqüència dels diferents modes de segregació entre els espermatozoides no seleccionats i els aneuploides, i entre els espermatozoides no seleccionats i els diploides/md. Per aquestes comparacions s'ha utilitzat el test *Khi*-quadrat (χ^2).
- Variacions poblacionals en la freqüència mitjana de cada mode de segregació dels espermatozoides no seleccionats i els aneuploides, i entre els espermatozoides no seleccionats i diploides/md. Aquestes comparacions s'han realitzat en el conjunt d'individus portadors del mateix tipus de translocació (translocacions recíproques o Robertsonianes) mitjançant el test no paramètric de Wilcoxon.

⁴ R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>

3.2. Anàlisi dels territoris cromosòmics

Per realitzar l'estudi dels territoris cromosòmics en nuclis d'espermatozoides, s'ha posat a punt una metodologia que permet la captura en 3D tant dels nuclis com dels senyals de FISH. Aquest sistema s'ha optimitzat en col·laboració amb la Unitat de Microscòpia Digital Avançada de l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRB). Paral·lelament, s'ha desenvolupat un mètode d'anàlisi d'imatges per tal d'extreure les dades de posicionament dels senyals dins els nuclis. Aquesta tasca s'ha realitzat en col·laboració amb el Centre de la Imatge i la Tecnologia Multimèdia de la Universitat Politècnica de Barcelona (UPC).

3.2.1. Sistema de captura de les imatges

Material utilitzat

S'han realitzat extensions d'espermatozoides (segons el protocol de l'apartat 3.1.2) a partir de la mostra de semen procedent d'un individu control, amb cariotip i seminograma normal.

Sistema de captura

S'ha desenvolupat un programa executable (script) pel software de control automatitzat de microscopis Micro-Manager⁵ i una automatització de processos (macro) per l'aplicació de processament d'imatges Fiji⁶, que operant conjuntament amb un microscopi de fluorescència automatitzat Leica AF7000 (Leica Microsistemas S.L.U., Espanya), permeten l'obtenció d'imatges en 3D de nuclis d'espermatozoides.

El sistema inclou la captura primària dels espermatozoides a baixa resolució, que té com a finalitat localitzar nuclis haploides i nuclis portadors d'anomalies numèriques. Seguidament, els espermatozoides seleccionats es capturen a alta resolució (captura secundària) originant imatges molt precises que permeten determinar la posició tridimensional dels cromosomes hibridats en el nucli espermatòic. El sistema permet captures secundàries addicionals en què es poden utilitzar sondes per altres cromosomes. De forma més detallada, el procediment d'anàlisi consta de les següents etapes:

⁵ Micro-Manager. URL: <http://www.micro-manager.org>

⁶ ImageJ. Version:2.0.0-rc-15/1.49i Open source image processing software. URL: <http://imagej.net>

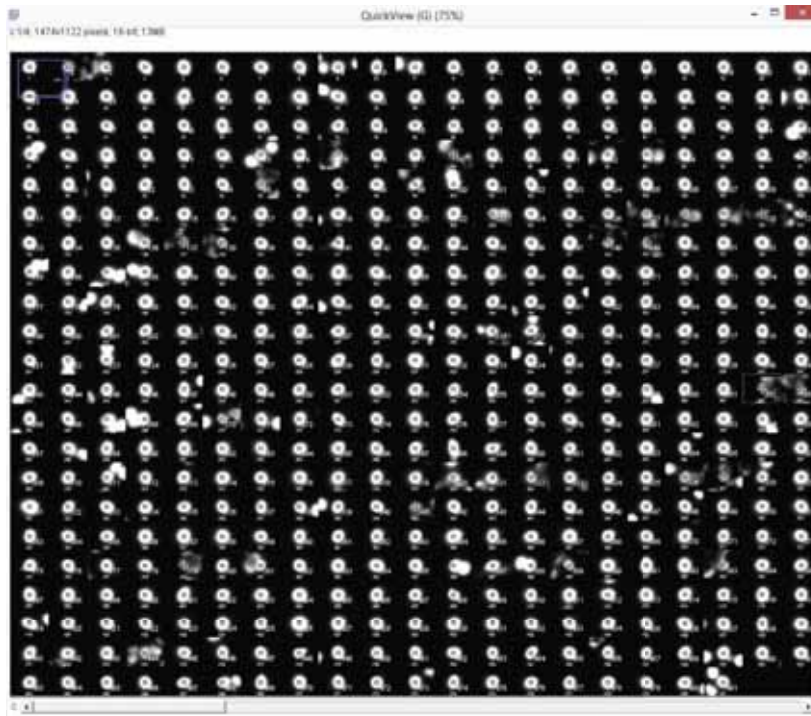
I. Captura primària: baixa resolució

La captura primària es realitza amb l'objectiu de 20x. La finalitat és obtenir imatges dels nuclis presents en una àrea determinada amb una resolució suficient per poder determinar la seva constitució cromosòmica. Per a l'optimització de la captura primària s'han hibridat les extensions d'espermatozoides amb sondes pels cromosomes X/Y/18 (CEP X, *Spectrum Green*; CEP Y *Spectrum Orange*; CEP 18, *Spectrum Aqua* [Abbott Molecular Inc.]) segons el protocol de la primera ronda de FISH (apartat 3.1.3). Els passos a seguir per configurar aquesta captura han estat:

- Definir els valors d'exposició de cada fluorocrom (DAPI, *Spectrum Green*, *Spectrum Orange*, *Spectrum Aqua*) amb l'objectiu de 20x.
- Definir l'àrea que es vol capturar.
- Definir el número de plans en l'eix z i la distància entre plans. Aquests valors s'han establert en 3 plans z, a una distància de 3 µm entre plans.

La identificació i classificació dels nuclis es realitza mitjançant les imatges capturades en la captura primària. Els paràmetres establerts, tant per identificar els nuclis i les combinacions de senyals, com per classificar els nuclis segons el seu genotip, s'han basat en els criteris mencionats en el punt VI-a de l'apartat 3.1.3 (Blanco et al. 1996). Les imatges de tots els nuclis capturats es processen d'acord amb aquests paràmetres, i els nuclis inclosos en les categories predefinides es visualitzen en imatges individuals ordenades en una quadrícula (Figura 3.6). A partir d'aquí, es poden seleccionar els nuclis d'interès per a captures secundàries (en el nostre estudi s'han seleccionat espermatozoides corresponents a les categories haploides, disòmics, nul·lisòmics i diploides/md).

Figura 3.6. Finestra amb tots els nuclis capturats i classificats segons les categories prèviament seleccionades.



II. Captures secundàries addicionals: alta resolució

La captura secundària es realitza amb l'objectiu de 63x. La finalitat és obtenir imatges d'alta resolució dels nuclis seleccionats en la captura primària. Els passos seguits han estat:

- Definir els valors d'exposició de cada fluorocrom (DAPI, *Spectrum Green*, *Spectrum Orange*, *Spectrum Aqua*) amb l'objectiu de 63x.
- Definir el número de plans en l'eix z i la distància entre plans. Aquests paràmetres s'han establert en 59 plans z, a una distància de 0,3 μm entre plans (aquesta és la distància mínima per obtenir una bona resolució amb l'objectiu utilitzat). Per tant, de cada nucli seleccionat s'obtenen 236 imatges (59 plans x 4 fluorocroms = 236 imatges).

Per a l'optimització del sistema, s'han capturat els nuclis hibridats amb sondes pels cromosomes X/Y/18 seleccionats a la captura primària per pertànyer a les categories haploides, disòmics, nul·lisòmics o diploides/md. És important remarcar que el sistema permet realitzar tantes captures secundàries addicionals com es vulgui (sempre que la qualitat de la mostra ho permeti) si s'introdueixen les coordenades d'inici. Per això només és necessari relocalitzar els nuclis cada vegada, els quals poden estar hibridats amb sondes

diferents. Aprofitant aquesta característica del sistema, s'ha realitzat una segona ronda de FISH sobre les mateixes mostres, però amb una combinació de sondes pels cromosomes 6/8/9 (CEP 6, *Spectrum Green*; CEP 8, *Spectrum Aqua*; CEP 9, *Spectrum Orange* [Abbott Molecular Inc.]), hibridades segons el protocol de la segona ronda de FISH (apartat 3.1.3). En aquesta segona ronda, s'han relocalitzat els nuclis capturats a la primera ronda i s'han tornat a adquirir imatges en 3D per poder obtenir informació de la posició d'aquests cromosomes.

3.2.2. Mètode d'anàlisi de les imatges

Anàlisi de les imatges

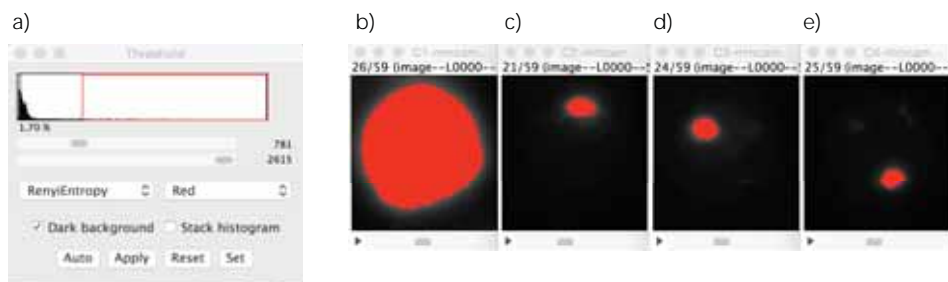
Per a l'anàlisi de les imatges s'ha desenvolupat un mètode que utilitza el programa Fiji per extreure informació de cada pla capturat per les cèl·lules seleccionades. A més, s'ha optimitzat un sistema de càlcul que transforma la informació de les imatges en un valor normalitzat de posicionament dels senyals dins el nucli, el qual ha permès establir un posicionament tridimensional relatiu i comparable entre nuclis.

I. Tractament de les imatges

El tractament de les imatges es realitza de forma independent per cada fluorocrom capturat, amb l'objectiu d'identificar i seleccionar les diferents estructures a tenir en compte per l'estudi (nucli i els diferents senyals d'hibridació que pugui presentar). El procediment consta dels següents passos:

- Transformar tots els píxels de la imatge (de cada fluorocrom) a format binari, ajustant un llindar d'intensitat que seleccioni específicament els píxels corresponents a l'estructura que es vol analitzar (nucli o senyals d'hibridació capturats a cada canal) (Figura 3.7). La transformació a format binari consisteix en transformar tots els píxels d'una imatge capturada amb escala de grisos a només dos valors de píxel: negre (valor 0) i blanc (valor 255).
- Tractar la imatge binària per tal que inclogui tots els píxels de l'estructura d'interès (en cas que alguns hagin quedat sense seleccionar).
- Extreure les dades de cada fluorocrom per cada pla capturat en l'eix z. Aquestes dades permetran establir la seva posició en l'eix radial (interior-perifèria) i fan referència a: l'àrea, el centre de masses, les dimensions en l'eix xy, el diàmetre màxim i el diàmetre mínim dels píxels seleccionats per cada fluorocrom

Figura 3.7. Procediment per ajustar el llindar de selecció de píxels en cada canal i en un exemple d'un nucli amb un senyal en cada canal.



a) Quadre de diàleg per ajustar el llindar, b) imatge del nucli, c) imatge del senyal vermell, d) imatge del senyal verd, e) imatge del senyal blau.

El tractament de les imatges desenvolupat també inclou l'opció de la localització del punt d'inserció de la cua per tal d'establir l'eix longitudinal (apical-basal) del nucli de l'espermatozoide. El procediment consisteix en localitzar manualment aquest punt en el pla on està correctament enfocat (part basal). La marca que es fa sobre la imatge rep el mateix tractament com si es tractés d'un senyal d'hibridació. D'aquesta manera es poden extreure les dades del número de pla z on està situada, així com la seva localització en l'eix x i en l'eix y.

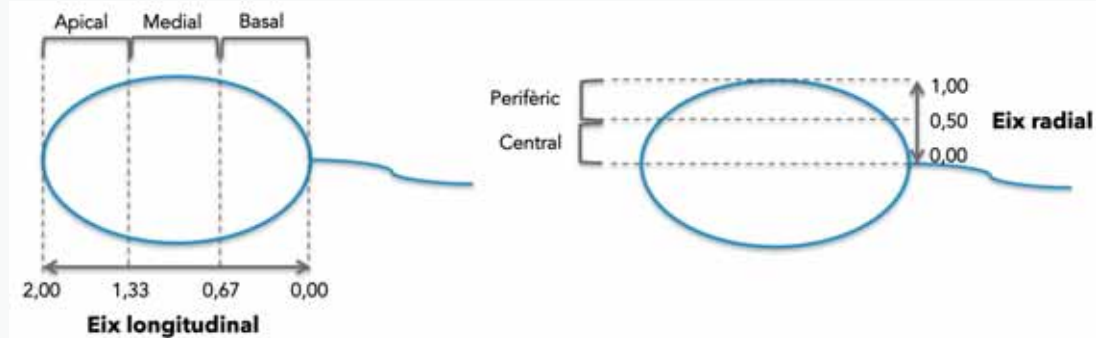
II. Càlcul de la posició dels senyals dins el nucli

El sistema optimitzat per a l'obtenció de la posició dels senyals d'hibridació dins el nucli consisteix en una fulla de càlcul (Microsoft Excel⁷), on s'introdueixen les dades obtingudes a partir del tractament de les imatges. A través d'operacions matemàtiques, aquesta eina permet obtenir dades normalitzades de la posició del senyal dins el volum nuclear, tant en l'eix xy (longitudinal) com en l'eix xz (radial):

- Per a calcular el valor de posicionament longitudinal dels senyals d'hibridació s'han tingut en compte els eixos x i y, i s'ha normalitzat la posició de la cua en $y=0$ i $x=1$. El valor obtingut es pot trobar entre 0 i 2 (0-0,67 part basal; 0,68-1,33 part medial; 1,34-2 part apical) (Figura 3.8).
- Per a calcular el valor de posicionament dels senyals d'hibridació en l'eix radial s'han tingut en compte els eixos x, y i z. El valor resultant es pot trobar entre 0 i 1 (0-0,50 part central del nucli; 0,51-1 part perifèrica del nucli) (Figura 3.8).

⁷ Microsoft Excel 2011 per Mac. Versió 14.5.2.

Figura 3.8. Particions establertes del nucli d'espermatozoide per tal de determinar el posicionament en l'eix longitudinal i l'eix radial de les dades normalitzades.



S'ha analitzat la posició dels cromosomes 6, 8, 9, 18, X i Y a partir de les imatges obtingudes en la captura secundària de dues hibridacions. A partir del conjunt de dades normalitzades, s'ha pogut determinar la localització longitudinal i radial preferent de cada cromosoma en les diferents categories de nuclis: haploides, disòmics, nul·lisòmics i diploides/md.

3.2.3. Anàlisi estadística

Les anàlisis estadístiques s'han dut a terme amb els programes Prism v5.0a (*GraphPad Software Inc.*) i JGR (*R Core Team*). En tots els casos s'han considerat significatius els p-valors $< 0,05$.

S'ha determinat si existeixen diferències en les posicions preferents de cada cromosoma entre conjunts de nuclis amb diferent genotip, tant per l'eix longitudinal com per l'eix radial. S'ha aplicat la prova no paramètrica U de Mann-Whitney per realitzar comparacions de la posició d'un determinat cromosoma entre els diferents tipus de nuclis.

Les dades de posicionament s'han representat amb gràfics de violí, que inclouen informació sobre la mediana, el rang interquartilic, el rang de valors i la densitat de les dades. A més, permeten distingir tres formes de distribució dels valors: normal (Gaussiana), uniforme (restringida entre un valor màxim i mínim) i bimodal (dues distribucions diferents de la mateixa variable) (Hintze i Nelson, 1998).

4. Resultats



4.1. Individus portadors de translocacions recíproques

4.1.1. Resultats de segregació en les poblacions d'espermatozoides analitzades

Segregació en espermatozoides no seleccionats

S'han avaluat entre 500 i 799 nuclis d'espermatozoides no seleccionats de cada individu (4.313 nuclis en total) (Taula 4.1). L'anàlisi d'homogeneïtat dels patrons de segregació entre individus ha revelat l'absència de diferències significatives ($p > 0,05$ en totes les comparacions realitzades).

A nivell poblacional, el mode de segregació alternant està representat per un $43,8\% \pm 6,6$ (mitjana \pm desviació estàndard [DE]) dels gàmetes. La resta de modes de segregació es troben representats de la següent manera: adjacent I $33,9\% \pm 5,8$; adjacent II $10,4\% \pm 8,0$; 3:1 $9,3\% \pm 4,4$; 4:0 $1,4\% \pm 1,0$; i "altres" $1,2\% \pm 1,1$ (Taula 4.1). Els productes de segregació anomenats "altres" corresponen a espermatozoides amb combinacions de senyals d'hibridació atribuïbles a esdeveniments de no disjunció a la segona divisió meiótica (43,5%) i a errors d'hibridació (56,5%). Els productes de segregació adjacent II, 3:1 i 4:0 atribuïbles a l'esdeveniment de quiasmes a les regions intersticials s'han inclòs en els resultats dels modes de segregació corresponents.

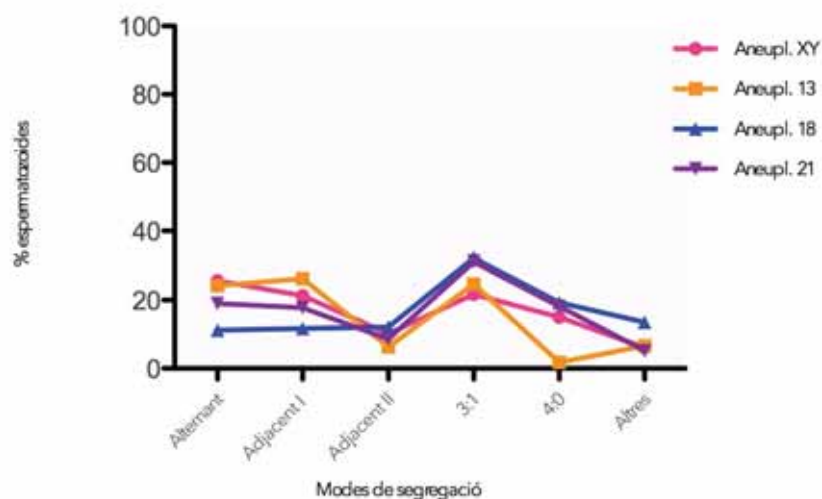
Taula 4.1. Resultats de l'estudi de segregació en espermatozoides no seleccionats procedents d'individus portadors de translocacions recíproques.

	Alternant (%)	Adjacent I (%)	Adjacent II (%)	3:1 (%)	4:0 (%)	Altres (%)	Total (n)
Rcp 1	40,2	39,0	3,3	14,6	2,0	1,0	508
Rcp 2	45,6	25,6	9,2	14,0	2,0	3,6	500
Rcp 3	46,3	26,5	17,6	7,2	2,0	0,4	501
Rcp 4	42,1	32,2	11,6	10,8	1,6	1,8	799
Rcp 5	50,6	38,4	2,0	8,2	0,2	0,6	500
Rcp 6	30,2	31,8	25,2	12,2	0,0	0,6	500
Rcp 7	45,8	37,8	10,4	4,4	0,8	0,8	502
Rcp 8	50,7	40,6	3,0	2,6	2,8	0,4	503
Mitjana	43,8	33,9	10,4	9,3	1,4	1,2	-
\pmDE	6,6	5,8	8,0	4,4	1,0	1,1	-

Segregació en espermatozoides aneuploides

S'han pogut relocalitzar i avaluar entre 73 i 293 nuclis aneuploides (disòmics i nul·lisòmics) segons l'individu (1.430 nuclis en total) (Taula 4.2). L'anàlisi d'homogeneïtat no ha mostrat diferències significatives en la distribució dels patrons de segregació entre els gàmetes disòmics i nul·lisòmics del mateix cromosoma ($p > 0,05$ en totes les comparacions realitzades). Tampoc s'han observat diferències entre gàmetes amb diferents cromosomes implicats en l'aneuploidia (disòmics + nul·lisòmics) ($p > 0,05$ en totes les comparacions realitzades) (Figura 4.1). Els resultats de segregació desglossats per cada tipus d'aneuploidia estan detallats a l'apartat 8.1 de l'Annex (Taula 8.1, Taula 8.2, Taula 8.3 i Taula 8.4). L'homogeneïtat en la distribució dels patrons ha permès avaluar les dades conjuntament (disòmics i nul·lisòmics pels cinc cromosomes analitzats) en l'anàlisi de variacions individuals i poblacionals.

Figura 4.1. Gràfic de distribució dels patrons de segregació en espermatozoides aneuploides pels diferents cromosomes avaluats.



A nivell individual, els modes de segregació alternant i adjacent I presenten una reducció significativa en tots els individus ($p < 0,05$), al contrari que els modes 3:1 i "altres", els quals es troben incrementats ($p < 0,05$). La segregació 4:0 mostra un increment significatiu ($p < 0,05$) en sis dels vuit individus (excepte Rcp 2, $p = 0,7499$; i Rcp 6, $p = 0,1135$). La segregació adjacent II no presenta diferències significatives en cap individu a excepció de Rcp 3 (disminució significativa, $p = 0,0077$) (Taula 4.2).

El patró de segregació també s'ha analitzat a nivell poblacional. En aquest cas les segregacions alternant i adjacent I presenten una reducció significativa ($p < 0,001$ en els dos modes), amb freqüències de $21,8\% \pm 4,6$ i $20,3\% \pm 6,1$ respectivament. En canvi, les

segregacions 3:1, 4:0 i "altres" mostren increments significatius amb percentatges del 28,2% \pm 9,3 ($p=0,0016$), 13,2% \pm 11,4 ($p=0,008$) i 7,2% \pm 4,7 ($p=0,0016$), respectivament. Els productes de segregació "altres" s'atribueixen a esdeveniments de no disjunció a la segona divisió meiòtica (54%) i a errors d'hibridació (46%). La segregació adjacent II amb un 9,3% \pm 9,1 no presenta diferències significatives ($p=0,7130$) (Taula 4.2) (Figura 4.2). Els productes de segregació adjacent II, 3:1 i 4:0 atribuïbles a l'esdeveniment de quiasmes a les regions intersticials s'han inclòs en els resultats dels modes de segregació corresponents.

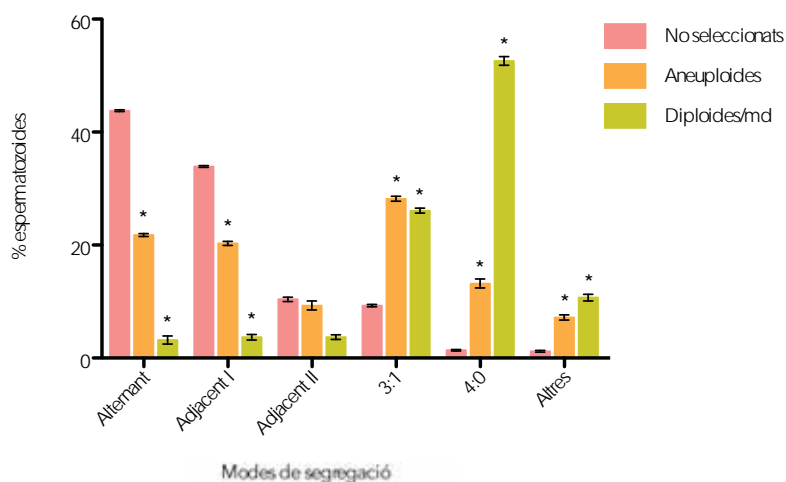
Taula 4.2. Resultats de l'estudi de segregació en espermatozoides aneuploides procedents d'individus portadors de translocacions recíproques.

	Alternant (%)	Adjacent I (%)	Adjacent II (%)	3:1 (%)	4:0 (%)	Altres (%)	Total (n)
Rcp 1	24,6 ^a	18,8 ^a	4,1	27,6 ^a	19,1 ^a	5,8 ^a	293
Rcp 2	17,5 ^a	15,1 ^a	8,4	40,4 ^a	2,4	16,3 ^a	166
Rcp 3	16,7 ^a	14,3 ^a	8,7 ^a	25,4 ^a	24,6 ^a	10,3 ^a	126
Rcp 4	16,4 ^a	16,4 ^a	11,0	26,0 ^a	24,7 ^a	5,5 ^a	73
Rcp 5	24,4 ^a	30,5 ^a	2,0	34,5 ^a	5,6 ^a	3,0 ^a	197
Rcp 6	12,0 ^a	12,0 ^a	30,5	34,5 ^a	0,5	10,5 ^a	200
Rcp 7	22,5 ^a	17,5 ^a	5,7	12,5 ^a	5,4 ^a	2,5 ^a	185
Rcp 8	22,6 ^a	24,7 ^a	3,7	16,8 ^a	27,9 ^a	4,2 ^a	190
Mitjana	21,8 ^b	20,3 ^b	9,3	28,2 ^b	13,2 ^b	7,2 ^b	-
\pmDE	4,6	6,1	9,1	9,3	11,4	4,7	-

^a Diferències intraindividuals significatives ($p<0,05$) respecte el mateix mode de segregació de la població d'espermatozoides no seleccionats (Taula 4.1).

^b Diferències significatives ($p<0,05$) respecte la freqüència mitjana de la població d'espermatozoides no seleccionats (Taula 4.1).

Figura 4.2. Freqüències mitjanes dels diferents modes de segregació en les poblacions d'espermatozoides analitzades en portadors de translocacions recíproques.



* $p < 0,05$ respecte la mitjana d'espermatozoides no seleccionats
La barra d'error representa el SEM (*Standard Error of the Mean*)

Segregació en espermatozoides diploides/md

S'han pogut relocalitzar i avaluar entre 70 i 414 espermatozoides diploides/md per individu (1.284 espermatozoides en total) (Taula 4.3). En tots els individus, les segregacions alternant i adjacent I presenten freqüències significativament inferiors a les observades en espermatozoides no seleccionats ($p < 0,05$ en totes les comparacions realitzades). De forma oposada, es troben incrementats els gàmetes resultants de les segregacions 3:1, 4:0 i "altres" ($p < 0,05$ en totes les comparacions realitzades). Pel que fa a la segregació adjacent II, només es detecten reduccions significatives en tres casos (Rcp 3, $p < 0,001$; Rcp 5, $p = 0,0338$; i Rcp 6, $p < 0,001$) (Taula 4.3).

A nivell poblacional, les segregacions alternant i adjacent I presenten freqüències de $3,2\% \pm 4,6$ i $3,7\% \pm 3,5$ respectivament, que són significativament inferiors a la freqüència descrita en espermatozoides no seleccionats ($p < 0,001$ en els dos casos). En canvi, es troben incrementades les segregacions 3:1, 4:0 i "altres", amb freqüències de $26,1\% \pm 8,1$; $52,6\% \pm 19,8$ i $10,7\% \pm 6,8$, respectivament ($p < 0,001$ en totes les comparacions realitzades). Els productes de segregació "altres" s'atribueixen de forma majoritària a esdeveniments de no disjunció a la segona divisió meiótica (83,7%) i en menor mesura a errors d'hibridació (16,3%). La segregació adjacent II, amb una freqüència de $3,7\% \pm 2,4$ no presenta diferències significatives ($p = 0,1719$) (Taula 4.3) (Figura 4.2). Els productes de segregació adjacent II, 3:1 i 4:0 atribuïbles a l'esdeveniment de quismes a les regions intersticials s'han inclòs en els resultats dels modes de segregació corresponents.

Taula 4.3. Resultats de l'estudi de segregació en espermatozoides diploides/md procedents d'individus portadors de translocacions recíproques

	Alternant (%)	Adjacent I (%)	Adjacent II (%)	3:1 (%)	4:0 (%)	Altres (%)	Total (n)
Rcp 1	1,4 ^a	3,6 ^a	2,2	24,6 ^a	56,5 ^a	11,6 ^a	414
Rcp 2	14,4 ^a	9,9 ^a	5,4	40,5 ^a	13,5 ^a	16,2 ^a	111
Rcp 3	1,2 ^a	1,2 ^a	4,3 ^a	24,1 ^a	60,5 ^a	8,7 ^a	253
Rcp 4	1,4 ^a	1,4 ^a	4,3	28,6 ^a	57,1 ^a	7,1 ^a	70
Rcp 5	1,6 ^a	3,2 ^a	6,5 ^a	21,0 ^a	53,2 ^a	14,5 ^a	62
Rcp 6	5,3 ^a	2,7 ^a	8,0 ^a	37,3 ^a	21,3 ^a	25,3 ^a	75
Rcp 7	1,1 ^a	9,5 ^a	7,4	32,6 ^a	43,2 ^a	6,3 ^a	95
Rcp 8	4,4 ^a	2,5 ^a	1,0	17,2 ^a	70,1 ^a	4,9 ^a	204
Mitjana	3,2 ^b	3,7 ^b	3,7	26,1 ^b	52,6 ^b	10,7 ^b	-
±DE	4,6	3,5	2,4	8,1	19,8	6,8	-

^a Diferències intraindividuals significatives ($p < 0,05$) respecte el mateix mode de segregació de la població d'espermatozoides no seleccionats (Taula 4.1).

^b Diferències significatives ($p < 0,05$) respecte la freqüència mitjana de la població d'espermatozoides no seleccionats (Taula 4.1)

4.1.2. Article I

Accumulation of numerical and structural imbalances in spermatozoa from reciprocal translocation carriers

Anna Godo, Joan Blanco, Francesca Vidal, Ester Anton

Human Reproduction (2013) Vol.28, pp.840-849

4.2. Individus portadors de translocacions Robertsonianes

4.2.1. Resultats de segregació en les poblacions d'espermatozoides analitzades

Segregació en espermatozoides no seleccionats

En cada individu s'han analitzat 1.000 espermatozoides no seleccionats (11.000 espermatozoides en total) (Taula 4.4). S'ha observat un alt grau de similitud dels patrons de segregació entre individus pel que fa als resultats de segregació ($p > 0,05$ en totes les comparacions realitzades).

En conjunt, el patró de segregació mostra una prevalença de productes equilibrats amb un 84,3% $\pm 3,6$ de gàmetes amb segregació alternant. La segregació adjacent s'ha observat en un 14,6% $\pm 3,6$ dels espermatozoides i la 3:0 en un 1,0% $\pm 0,6$. La categoria "altres", atribuïda exclusivament a esdeveniments de no disjunció de la segona divisió meiòtica és molt escassa (0,1% $\pm 0,2$) (Taula 4.4).

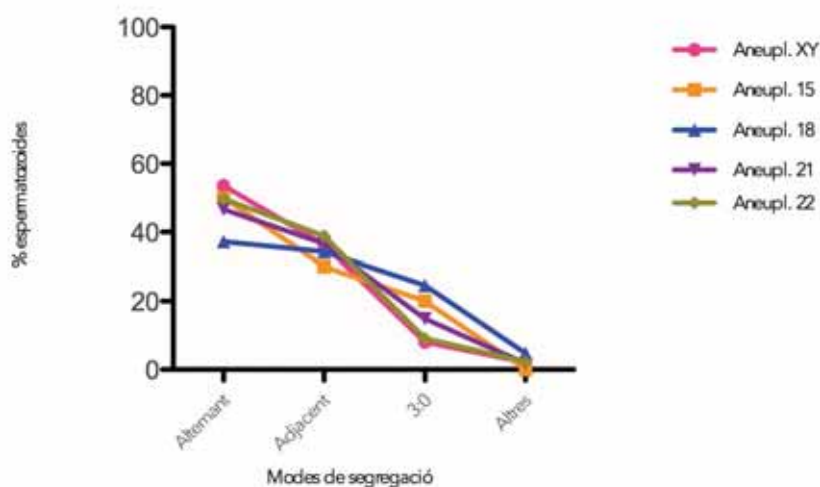
Taula 4.4. Resultats de l'estudi de segregació en espermatozoides no seleccionats procedents d'individus portadors de translocacions Robertsonianes.

	Alternant (%)	Adjacent (%)	3:0 (%)	Altres (%)	Total (n)
Rob 1	87,5	10,0	2,3	0,2	1.000
Rob 2	87,7	11,6	0,7	0,0	1.000
Rob 3	86,1	12,8	1,1	0,0	1.000
Rob 4	79,1	19,1	1,6	0,2	1.000
Rob 5	82,4	17,0	0,5	0,1	1.000
Rob 6	85,3	14,5	0,2	0,0	1.000
Rob 7	89,3	9,7	0,9	0,1	1.000
Rob 8	84,5	15,0	0,5	0,0	1.000
Rob 9	77,5	20,7	1,3	0,5	1.000
Rob 10	86,3	13,0	0,7	0,0	1.000
Rob 11	81,7	17,3	0,9	0,1	1.000
Mitjana	84,3	14,6	1,0	0,1	-
\pmDE	3,7	3,6	0,6	0,2	-

Segregació en espermatozoides aneuploides

S'han pogut relocalitzar i analitzar entre 87 i 375 espermatozoides aneuploides per individu (1.691 espermatozoides en total) (Taula 4.5). L'anàlisi d'homogeneïtat no ha mostrat diferències significatives en la distribució dels patrons de segregació entre els gàmetes disòmic i nul·lisòmic del mateix cromosoma ($p > 0,05$ en totes les comparacions realitzades). Tampoc s'han observat diferències entre gàmetes amb diferents cromosomes implicats en l'aneuploidia (disòmic + nul·lisòmic) ($p > 0,05$ en totes les comparacions realitzades) (Figura 4.3). Els resultats de segregació desglossats per cada tipus d'aneuploidia estan detallats a l'apartat 8.1 de l'Annex (Taula 8.5, Taula 8.6, Taula 8.7, Taula 8.8 i Taula 8.9). L'homogeneïtat en la distribució dels patrons ha permès avaluar les dades conjuntament (disòmic i nul·lisòmic pels cinc cromosomes analitzats) en l'anàlisi de variacions individuals i poblacionals.

Figura 4.3. Gràfic de distribució dels patrons de segregació en espermatozoides aneuploides pels diferents cromosomes avaluats.



En tots els individus s'observa una disminució significativa de la segregació equilibrada (alternant) respecte els espermatozoides no seleccionats, i increments en els modes desequilibrats adjacent, 3:0 i "altres" ($p < 0,05$ en totes les comparacions realitzades) (Taula 4.5).

Pel que fa al comportament poblacional, s'observen els mateixos canvis en el patró: la segregació alternant amb un $50,7\% \pm 11,7$ es troba disminuïda ($p = 0,0038$). En canvi, la segregació adjacent ($36,6\% \pm 7,7$), la segregació 3:0 ($10,2\% \pm 6,5$), i la categoria "altres" ($2,5\% \pm 1,1$) es troben incrementades en tots els casos ($p = 0,001$) (Taula 4.5) (Figura 4.4). La

categoria "altres" s'atribueix majoritàriament a esdeveniments de no disjunció a la segona divisió meiòtica (95,1%) i de forma minoritària a errors d'hibridació (4,9%).

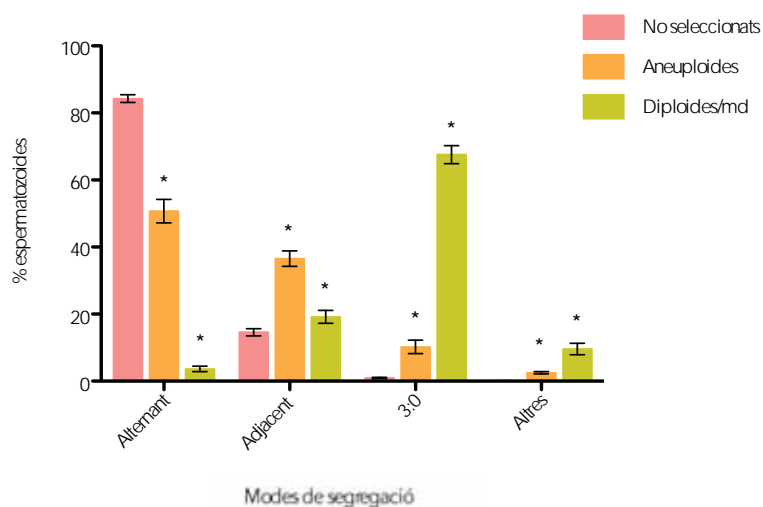
Taula 4.5. Resultats de l'estudi de segregació en espermatozoides aneuploides procedents d'individus portadors de translocacions Robertsonianes.

	Alternant (%)	Adjacent (%)	3:0 (%)	Altres (%)	Total (n)
Rob 1	53,1 ^a	25,5 ^a	17,3 ^a	4,1 ^a	98
Rob 2	59,8 ^a	32,2 ^a	5,7 ^a	2,3 ^a	87
Rob 3	68,9 ^a	20,5 ^a	8,2 ^a	2,5 ^a	122
Rob 4	42,3 ^a	41,5 ^a	14,6 ^a	1,5 ^a	130
Rob 5	53,3 ^a	39,5 ^a	5,1 ^a	2,1 ^a	375
Rob 6	58,8 ^a	35,9 ^a	3,8 ^a	1,5	131
Rob 7	26,4 ^a	46,4 ^a	25,2 ^a	1,8 ^a	163
Rob 8	40,2 ^a	43,6 ^a	13,7 ^a	2,6 ^a	117
Rob 9	48,4 ^a	38,5 ^a	8,2 ^a	4,9 ^a	182
Rob 10	60,5 ^a	32,7 ^a	5,6 ^a	1,2 ^a	162
Rob 11	50,0 ^a	33,1 ^a	13,7 ^a	3,2 ^a	124
Mitjana	50,7 ^b	36,6 ^b	10,2 ^b	2,5 ^b	
±DE	11,7	7,7	6,5	1,1	

^a Diferències intraindividuals significatives ($p < 0,05$) respecte el mateix mode de segregació de la població d'espermatozoides no seleccionats (Taula 4.4).

^b Diferències significatives ($p < 0,05$) respecte la freqüència mitjana de la població d'espermatozoides no seleccionats (Taula 4.4).

Figura 4.4. Freqüències mitjanes dels diferents modes de segregació en les poblacions d'espermatozoides analitzades en portadors de translocacions Robertsonianes.



* $p < 0,05$ respecte la mitjana d'espermatozoides no seleccionats
La barra d'error representa el SEM (*Standard Error of the Mean*)

Segregació en espermatozoides diploides/md

S'han pogut relocalitzar i analitzar entre 18 i 248 espermatozoides diploides/md per individu (876 espermatozoides en total) (Taula 4.6). Tots els individus presenten una reducció significativa en la segregació alternant i increments en la segregació 3:0 en comparació amb la població d'espermatozoides no seleccionats ($p < 0,05$ en totes les comparacions realitzades). La segregació adjacent només es troba incrementada en tres individus (Rob 1, $p = 0,0012$; Rob 7, $p < 0,001$; Rob 10, $p = 0,0086$). La categoria "altres" mostra increments significatius en tots els individus excepte Rob 2.

A nivell poblacional, la segregació alternant està present en només un $3,7\% \pm 2,8$ dels gàmetes d'aquesta categoria, i per tant, es troba reduïda significativament ($p = 0,0028$). La segregació adjacent ($19,2\% \pm 6,4$) no presenta diferències. En canvi, les segregacions desequilibrades 3:0 i "altres", representades per un $67,6\% \pm 8,8$ i un $9,6\% \pm 5,7$ respectivament, mostren freqüències significativament superiors ($p = 0,0038$ i $p = 0,0087$) (Taula 4.6) (Figura 4.4). La categoria "altres" està representada per combinacions de senyals atribuïbles majoritàriament a esdeveniments de no disjunció a la segona divisió meiótica ($98,8\%$) i una petita fracció a errors d'hibridació ($1,2\%$).

Taula 4.6. Resultats de l'estudi de segregació en espermatozoides diploides/md procedents d'individus portadors de translocacions Robertsonianes.

	Alternant (%)	Adjacent (%)	3:0 (%)	Altres (%)	Total (n)
Rob 1	3,8 ^a	21,8 ^a	61,5 ^a	12,8 ^a	78
Rob 2	0,0 ^a	16,7	83,3 ^a	0,0	18
Rob 3	2,9 ^a	23,5	61,8 ^a	11,8 ^a	34
Rob 4	3,2 ^a	18,1	69,4 ^a	9,3 ^a	248
Rob 5	2,9 ^a	18,6	67,1 ^a	11,4 ^a	70
Rob 6	3,3 ^a	13,3	73,3 ^a	10,0 ^a	30
Rob 7	4,9 ^a	32,0 ^a	59,2 ^a	3,9 ^a	103
Rob 8	0,0 ^a	14,5	78,3 ^a	7,2 ^a	69
Rob 9	10,4 ^a	9,1 ^a	58,4 ^a	22,1 ^a	77
Rob 10	3,3 ^a	25,0 ^a	61,7 ^a	10,0 ^a	60
Rob 11	2,2 ^a	14,6	78,7 ^a	4,5 ^a	89
Mitjana	3,7 ^b	19,2	67,6 ^b	9,6 ^b	-
±DE	2,8	6,4	8,8	5,7	-

^a Diferències intraindividuals significatives ($p < 0,05$) respecte el mateix mode de segregació de la població d'espermatozoides no seleccionats (Taula 4.4).

^b Diferències significatives ($p < 0,05$) respecte la freqüència mitjana de la població d'espermatozoides no seleccionats (Taula 4.4).

4.2.2. Article II

Altered segregation pattern and numerical chromosome abnormalities interrelate in sperm from Roberstonian translocation carriers

Anna Godo, Joan Blanco, Francesca Vidal, Mireia Sandalinas, Elena Garcia-Guixé, Ester Anton

Reproductive BioMedicine Online (2015) Vol.31, pp.79-88

4.3. Individu portador d'una triple translocació

4.3.1. Resultats de segregació en les poblacions d'espermatozoides analitzades

Segregació en espermatozoides no seleccionats

S'han analitzat un total de 1.143 espermatozoides (Taula 4.7). Els resultats han revelat un patró en què la segregació equilibrada 3:3 alternant és present en un 11,7% dels gàmetes. Per tant, predominen les segregacions desequilibrades, entre les que destaquen la segregació 3:3 no alternant amb un percentatge del 43,1%, i la segregació 4:2 amb un 28,9%. La segregació 3:3 no alternant està representada en un 28,9% per productes de segregació desequilibrats resultants de la disjunció de cromosomes amb centròmers homòlegs que afecta a tots els cromosomes. El 14,2% restant contenen productes de segregació resultants de la no disjunció d'un, dos o dels tres cromosomes translocats. La segregació 5:1 s'ha observat en un 0,7% dels gàmetes i no s'ha detectat cap espermatozoide amb el producte de la segregació 6:0. Finalment, s'ha observat un 15,6% de gàmetes corresponents a la categoria "altres" (Taula 4.7). Els productes de segregació d'aquesta categoria estan representats per errors d'hibridació (56,2%), per esdeveniments de recombinació a les regions intersticials dels cromosomes (24,7%) i per esdeveniments de no disjunció a la meiosi II (19,1%).

Taula 4.7. Resultats de l'estudi de segregació en espermatozoides no seleccionats procedents d'un individu portador d'una triple translocació.

	3:3 Alternant (%)	3:3 No alternant D (%) ND (%)	4:2 (%)	5:1 (%)	6:0 (%)	Altres (%)	Total (n)
Tt1	11,7	28,9 14,2	28,9	0,7	0,0	15,6	1.143

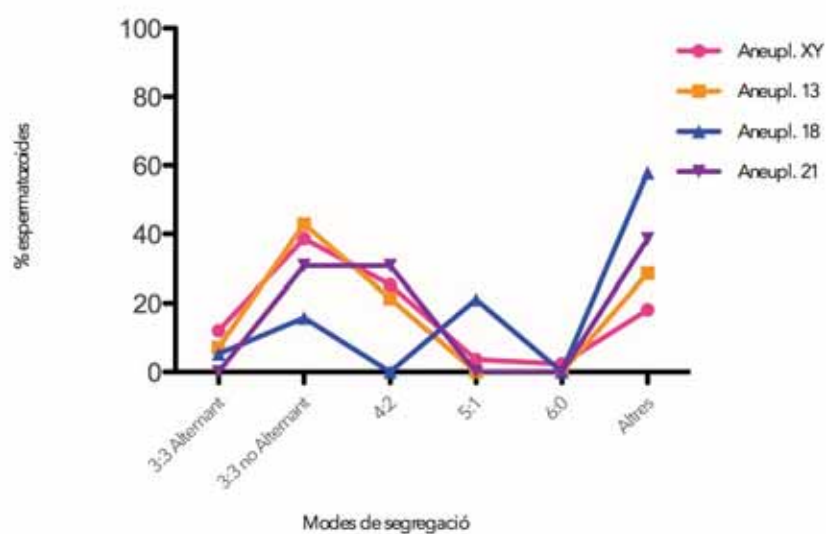
D, Disjunció de tots els cromosomes amb centròmers homòlegs; ND, No disjunció de com a mínim un parell de cromosomes amb centròmers homòlegs

Segregació en espermatozoides aneuploides

S'han relocalitzat i valorat 129 espermatozoides aneuploides (Taula 4.8). L'anàlisi d'homogeneïtat no ha mostrat diferències significatives en la distribució dels patrons de segregació entre els gàmetes disòmics i nul·lisòmics del mateix cromosoma ($p > 0,05$ en totes

les comparacions realitzades). Tampoc s'han observat diferències entre gàmetes amb diferents cromosomes implicats en l'aneuploidia (disòmics + nul·lisòmics) ($p > 0,05$ en totes les comparacions realitzades) (Figura 4.5). Els resultats de segregació desglossats per cada tipus d'aneuploidia estan detallats a l'apartat 8.1 de l'Annex (Taula 8.10, Taula 8.11, Taula 8.12 i Taula 8.13). L'homogeneïtat en la distribució dels patrons ha permès avaluar les dades conjuntament (disòmics i nul·lisòmics pels cinc cromosomes analitzats) en l'anàlisi de variacions intraindividual.

Figura 4.5. Gràfic de distribució dels patrons de segregació en espermatozoides aneuploides pels diferents cromosomes avaluats.



Tant la segregació 3:3 alternant (9,7% dels gàmetes) com la segregació 3:3 no alternant (34,9%), no mostren canvis significatius respecte els espermatozoides no seleccionats. Tot i així, hi ha una reducció significativa ($p = 0,0078$) en la freqüència de productes 3:3 no alternant resultants de la segregació de cromosomes amb centròmers homòlegs a pols cel·lulars oposats (17,8%). D'altra banda, es troben incrementades significativament les segregacions 5:1 ($p < 0,001$), 6:0 ($p < 0,001$) i "altres" ($p = 0,0019$) (Taula 4.5) (Figura 4.6). Els productes de segregació de la categoria "altres" estan representats principalment per esdeveniments de no disjunció a la meiosi II (54,3%), però també per esdeveniments de recombinació a les regions intersticials dels cromosomes (25,7%) o per errors d'hibridació (20%).

Resultats

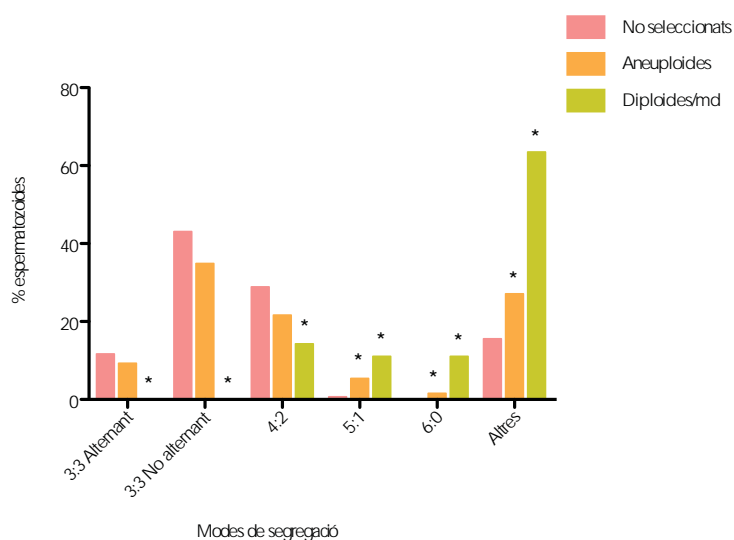
Taula 4.8. Resultats de l'estudi de segregació en espermatozoides aneuploides procedents d'un individu portador d'una triple translocació.

	3:3 Alternant (%)	3:3 No alternant D (%)	3:3 No alternant ND (%)	4:2 (%)	5:1 (%)	6:0 (%)	Altres (%)	Total (n)
Tt1	9,3	17,8 ^a	17,1	21,7	5,4 ^a	1,6 ^a	27,1 ^a	129

D, Disjunció de tots els centròmers homòlegs; ND, No disjunció de com a mínim un dels centròmers homòlegs

^a Diferències intraindividuals significatives ($p < 0,05$) respecte el mateix mode de segregació de la població d'espermatozoides no seleccionats (Taula 4.7).

Figura 4.6. Freqüències mitjanes dels diferents modes de segregació les poblacions d'espermatozoides analitzades en el portador de la triple translocació.



* $p < 0,05$ respecte la freqüència d'espermatozoides no seleccionats

Segregació en espermatozoides diploides/md

S'han pogut relocalitzar i valorar 63 espermatozoides diploides/md (Taula 4.9). No s'ha observat cap espermatozoide portador d'una segregació equilibrada 3:3 alternant ni 3:3 no alternant, per tant aquests modes estan significativament reduïts respecte els espermatozoides no seleccionats ($p = 0,0038$ i $p < 0,001$, respectivament). La segregació 4:2, amb un 14,3% també mostra una reducció significativa ($p = 0,0121$). En canvi, les segregacions 5:1 i 6:0 amb una freqüència de 11,1% en ambdós casos, es troben incrementades ($p < 0,001$ en els dos casos). De la mateixa forma, la categoria de segregació "altres" mostra un increment significatiu arribant al 63,5% ($p < 0,001$) (Taula 4.9) (Figura 4.6). Els productes d'aquesta categoria s'atribueixen a esdeveniments de no disjunció a la meiosi

II (45%), a esdeveniments de recombinació a les regions intersticials dels cromosomes (35%) i a errors d'hibridació (20%).

Taula 4.9. Resultats de l'estudi de segregació en espermatozoides diploides/md procedents d'un individu portador d'una triple translocació.

	3:3 Alternant (%)	3:3 No alternant		4:2 (%)	5:1 (%)	6:0 (%)	Altres (%)	Total (n)
		D (%)	ND (%)					
Tt1	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	14,3 ^a	11,1 ^a	11,1 ^a	63,5 ^a	63

D, Disjunció de tots els centròmers homòlegs; ND, No disjunció de com a mínim un dels centròmers homòlegs

^a Diferències intraindividuals significatives ($p < 0,05$) respecte el mateix mode de segregació de la població d'espermatozoides no seleccionats (Taula 4.7).

4.3.2. Article III

Sequential FISH allows the determination of the segregation outcome and the presence of numerical anomalies in spermatozoa from a $t(1;8;2)(q42;p21;p15)$ carrier

Anna Godo, Joan Blanco, Francesca Vidal, Mònica Parriego, Montserrat Boada, Ester Anton

Journal of Assisted Reproduction and Genetics (2013) Vol.30, pp.115-1123

4.4. Posicionament cromosòmic en nuclis d'espermatozoides

El desenvolupament de la metodologia d'anàlisi de territoris cromosòmics ha permès obtenir dades de posicionament dels centròmers dels cinc cromosomes analitzats a partir de l'aplicació de dues rondes de FISH. En total s'han analitzat 39 nuclis d'espermatozoides provinents d'un sol individu. Aquests nuclis s'han classificat en diferents categories segons el genotip que presentaven, inferit a partir de l'anàlisi dels cromosomes X/Y/18 en la primera ronda de FISH (Taula 4.10).

Els valors de posicionament de cada cromosoma obtinguts en els nuclis amb diferents genotips estan detallats a l'apartat 8.2 de l'Annex (Taula 8.14, Taula 8.15, Taula 8.16, Taula 8.17, Taula 8.18 i Taula 8.19). La comparació estadística de la posició de cada cromosoma entre nuclis amb diferents genotips no mostra diferències significatives pel que fa a l'eix longitudinal ($p > 0,05$). En l'eix radial, la majoria de cromosomes tampoc mostren diferències de posicionament ($p > 0,05$), a excepció del cromosoma 6 entre nuclis Hapl. Y i Dipl. XY ($p = 0,0048$), Hapl. Y i Nul. XY ($p = 0,0235$), i Dis. XY i Dipl. XY ($p = 0,0203$) (Taula 4.10). No s'han pogut realitzar comparacions estadístiques amb les dades dels nuclis amb genotips Dis.18 (X), Dis.18 (Y) i Dipl./md XX degut al reduït nombre de dades (menys de 3 valors).

La distribució dels valors de la posició centromèrica dels cromosomes al llarg de l'eix longitudinal i de l'eix radial dels espermatozoides s'ha representat a través de gràfics de violí, que es troben recollits a l'apartat 8.2 de l'Annex (Figura 8.1, Figura 8.2, Figura 8.3, Figura 8.4, Figura 8.5 i Figura 8.6). D'altra banda, aquests valors també s'han categoritzat en les diferents particions nuclears preestablertes en l'eix longitudinal i l'eix radial, tal i com s'ha detallat a l'apartat 3.2.2 de Material i mètodes, i s'han representat en forma d'histogrames també recollits a l'Annex (Figura 8.1, Figura 8.2, Figura 8.3, Figura 8.4, Figura 8.5 i Figura 8.6). La interpretació dels gràfics de violí i dels histogrames es troba detallada a la Taula 4.10 que es mostra a continuació, on es presenta una síntesi dels resultats preliminars sobre el posicionament preferent de cada cromosoma en l'eix longitudinal i radial.

Taula 4.10. Posicionament dels centròmers dels cromosomes X, Y, 6, 8, 9 i 18 en relació a l'eix longitudinal i radial en espermatozoides amb diferents genotips.

Cr.	Genotip (n° nuclis)	Posició en l'eix longitudinal ^a (%nuclis)	Posició en l'eix radial ^b (%nuclis)	Interpretació dades ^c	Figura Annex
X	Hapl. X (n=10)	Medial (70%)	Central (60%)	Posició preferentment medial en l'eix longitudinal (excepte Dipl./md XX). Posició aleatòria al llarg de l'eix radial.	Figura 8.1
	Dis. XY (n=9)	Medial (66,7%)	Perifèric (55,6%)		
	Dis. 18 (X) (n=1)	Medial (100%)	Perifèric (100%)		
	Dipl./md XY (n=3)	Medial (100%)	Central (66,7%)		
	Dipl./md XX (n=1)	Basal (100%)	Perifèric (100%)		
Y	Hapl. Y (n=10)	Medial (80%)	Central (50%)/ Perifèric (50%)	Posició aleatòria al llarg dels dos eixos.	Figura 8.2
	Dis. (XY) (n=9)	Basal (66,7%)	Central (77,8%)		
	Dis. 18 (Y) (n=1)	Apical (100%)	Perifèric (100%)		
	Dipl./md XY (n=3)	Medial (66,7%)	Central (66,7%)		
6	Hapl. X (n=10)	Medial (60%)	Perifèric (90%)	Posició aleatòria al llarg de l'eix longitudinal. Posició preferentment perifèrica en l'eix radial.	Figura 8.3
	Hapl. Y (n=10)	Medial (60%)	Perifèric (70%)		
	Dis. XY (n=9)	Medial (55,6%)	Perifèric (77,8%)		
	Nul. XY (n=4)	Basal (50%)	Perifèric (100%)		
	Dis. 18 (X) (n=1)	Apical (100%)	Perifèric (100%)		
	Dis. 18 (Y) (n=1)	Apical (100%)	Perifèric (100%)		
	Dipl./md XY (n=3)	Basal (33,3%)/ Medial (33,3%)/ Apical (33,3%)	Perifèric (100%)		
	Dipl./md XX (n=1)	Medial (50%)/ Apical (50%)	Perifèric (100%)		
8	Hapl. X (n=10)	Medial (70%)	Perifèric (70%)	Posició aleatòria en l'eix longitudinal. Posició preferentment perifèrica en l'eix radial (excepte Dipl./md XX).	Figura 8.4
	Hapl. Y (n=10)	Medial (80%)	Perifèric (80%)		
	Dis. XY (n=9)	Medial (77,8%)	Perifèric (55,6%)		
	Nul. XY (n=4)	Basal (50%)	Perifèric (75%)		
	Dis. 18 (X) (n=1)	Apical (100%)	Perifèric (100%)		
	Dis. 18 (Y) (n=1)	Basal (100%)	Perifèric (100%)		
	Dipl./md XY (n=3)	Medial (66,7%)	Perifèric (83,3%)		

Resultats

Cr.	Genotip (n° nuclis)	Posició en l'eix longitudinal ^a (%nuclis)	Posició en l'eix radial ^b (%nuclis)	Interpretació dades ^c	Figura Annex
	Dipl./md XX (n=1)	Basal (50%)/ Medial (50%)	Central (50%)/ Perifèric (50%)		
9	Hapl. X (n=10)	Medial (50%)	Perifèric (70%)	Posició preferentment medial al llarg de l'eix longitudinal. Posició referentment perifèrica en l'eix radial (excepte per Dis.18 [Y] i Dipl./md XX).	Figura 8.5
	Hapl. Y (n=10)	Medial (80%)	Perifèric (60%)		
	Dis. XY (n=9)	Medial (44,4%)	Perifèric (55,6%)		
	Nul. XY (n=4)	Medial (50%)	Perifèric (75%)		
	Dis. 18 (X) (n=1)	Medial (100%)	Central (100%)		
	Dis. 18 (Y) (n=1)	Medial (100%)	Central (100%)		
	Dipl./md XY (n=3)	Medial (66,7%)	Perifèric (66,7%)		
	Dipl./md XX (n=1)	Medial (100%)	Central (100%)		
18	Hapl. X (n=10)	Medial (80%)	Central (50%)/ Perifèric (50%)	Posició preferentment basal o medial en l'eix longitudinal. Posició preferentment perifèrica en l'eix radial (excepte per Hapl. X, Dis.18 [X] i Dipl./md XX).	Figura 8.6
	Hapl. Y (n=10)	Basal (40%)/ Medial (40%)	Perifèric (70%)		
	Dis. XY (n=9)	Medial (55,6%)	Perifèric (77,8%)		
	Nul. XY (n=4)	Apical (50%)	Perifèric (75%)		
	Dis. 18 (X) (n=1)	Medial (100%)	Central (50%)/ Perifèric (50%)		
	Dis. 18 (Y) (n=1)	Basal (50%)/ Medial (50%)	Perifèric (100%)		
	Dipl./md XY (n=3)	Medial (66,7%)	Perifèric (66,7%)		
	Dipl./md XX (n=1)	Medial (100%)	Central (100%)		

^a Posició preferent dels senyals en l'eix longitudinal (basal, medial o apical). S'indica la categoria amb una major freqüència de cromosomes en els histogrames de la corresponent figura de l'Annex.

^b Posició preferent dels senyals en l'eix radial (central o perifèric). S'indica la categoria amb una major freqüència de cromosomes en els histogrames de la corresponent figura de l'Annex.

^c Interpretació conjunta dels histogrames i dels gràfics de violí per cada cromosoma.

5. Discussió



5.1. Consideracions metodològiques

5.1.1. Anàlisi del contingut cromosòmic en espermatozoides

La tècnica de FISH sobre nuclis descondensats d'espermatozoides permet inferir la seva constitució cromosòmica a partir de la valoració de la presència o absència de senyals d'hibridació. En el present treball aquesta metodologia s'ha aplicat de forma seqüencial i ha permès analitzar conjuntament la presència d'anomalies numèriques i la segregació dels cromosomes reorganitzats en individus portadors de translocacions. Les elevades eficiències d'hibridació de les sondes de DNA utilitzades i l'homogeneïtat dels resultats obtinguts entre portadors del mateix tipus de reorganització demostren la validesa i fiabilitat d'aquesta metodologia en l'anàlisi realitzada, a més de l'adequació dels criteris de valoració utilitzats. Tot i així, la tècnica presenta una sèrie de limitacions que en alguns casos dificulten l'assignació de genotips:

- La primera està relacionada amb el fet de que en cada hibridació només es poden analitzar un nombre limitat de cromosomes (que ve determinat principalment pel número de fluorocroms que es poden distingir simultàniament a través del microscopi de fluorescència). Per aquest motiu, en els estudis de detecció d'anomalies numèriques no es pot obtenir informació de tot el complement cromosòmic. Aquesta limitació es manifesta especialment en espermatozoides amb dos senyals d'hibridació per a cada fluorocrom que, en la literatura especialitzada, es classifiquen com a diploides. No obstant, no es pot confirmar amb certesa si el contingut cromosòmic d'aquests nuclis és $2n$ o si són nuclis portadors de múltiples disomies que afecten els diversos cromosomes analitzats. Per aquesta raó, aquests espermatozoides s'han classificat *a priori* com a diploides o múltiples disòmics (diploides/md).

De la mateixa forma, en els estudis de segregació aquest tipus de limitació metodològica no permet distingir els nuclis amb un contingut $2n$ dels productes resultants de les segregacions 4:0, 3:0 o 6:0 (segons el tipus de translocació). En aquest sentit, tampoc es pot discriminar entre els productes complementaris d'aquestes segregacions (absència de cromosomes reorganitzats) i els errors d'hibridació de totes les sondes utilitzades.

D'altra banda, tampoc es pot afirmar inequívocament que els espermatozoides classificats com haploides per presentar un únic senyal d'hibridació pels cromosomes analitzats, no presentin alteracions per als cromosomes no avaluats.

- La població control utilitzada en els estudis de segregació han estat espermatozoides no seleccionats i no una població específica d'espermatozoides haploides. Les raons d'aquesta decisió es basen primerament, en el fet que les freqüències d'anomalies numèriques observades pel conjunt de cromosomes estudiats en les mostres analitzades són molt baixes (varien entre l'1 i el 4%; Godo et al. 2013; Godo et al. 2013b; Godo et al. 2015). Aquestes freqüències no difereixen excessivament de la incidència total d'aneuploidies estimada en espermatozoides d'individus control (3-6%, Egozcue et al. 1997; Tempest 2011]. Per tant, encara que els individus analitzats mostrin determinats increments significatius d'anomalies numèriques respecte les dades control, aquest fet té poca influència quan es realitza un recompte a l'atzar d'espermatozoides, ja que les aneuploidies representen un percentatge poc significatiu. A més, el recompte aleatori d'espermatozoides és el tipus de valoració que es fa en un estudi de segregació estàndard de qualsevol reorganització cromosòmica i això permet comparar les dades obtingudes amb les descrites a la literatura. D'altra banda, com ja s'ha comentat, no es pot afirmar que els espermatozoides classificats com haploides no presentin alteracions per als cromosomes no avaluats.
- Una altra limitació en l'assignació de genotips està relacionada amb la utilització de sondes específiques per a regions cromosòmiques concretes. En el cas de l'estudi de segregació, aquest fet comporta la impossibilitat de distingir entre els productes de segregació normals i els equilibrats resultants de la segregació alternant, ja que les sondes hibriden en regions concretes encara que pertanyin als cromosomes normals o als derivatius. De la mateixa manera, no és possible distingir els productes de la segregació alternant o adjacent I quan es produeixen quiasmes a les regions intersticials dels tetravalents.

5.1.2. Anàlisi de territoris cromosòmics

El sistema desenvolupat per a l'anàlisi de CT en nuclis d'espermatozoides ha permès obtenir imatges tridimensionals i extreure les dades necessàries per al posterior càlcul de posicionament dels centròmers dins el nucli. El sistema desenvolupat permet utilitzar l'objectiu de 20x en la captura primària amb una resolució suficient per poder classificar els

nuclis segons el genotip, i per tant, permet capturar un elevat nombre de nuclis en un temps relativament curt.

Amb el processament de les imatges, s'ha aconseguit obtenir informació de la mida dels nuclis i dels senyals, així com de la seva localització. A partir de la normalització dels valors de posicionament dels senyals en l'eix radial i l'eix longitudinal s'han pogut comparar els resultats procedents de diferents nuclis, que poden presentar formes i mides lleugerament diferents. Això permet d'una banda, comparar la posició preferent de cada cromosoma en nuclis amb el mateix genotip o realitzar comparacions entre genotips diferents. Per altra banda, també permet comparar les posicions preferents de diversos cromosomes dins el mateix nucli, tot i que els cromosomes s'hagin valorat en hibridacions successives.

La divisió de l'eix longitudinal en tres segments de mida equivalent (basal, medial, apical) i la divisió de l'eix radial en dos segments (central, perifèric), és la utilitzada en la majoria dels estudis de posicionament tridimensional en nuclis d'espermatozoides (Manvelyan et al. 2008; Alladin et al. 2013) i permet classificar els valors en les diferents categories, per obtenir dades qualitatives de la disposició dels cromosomes. De forma complementària, la representació de dades a través dels gràfics de violí, permet classificar el posicionament preferent dels cromosomes segons el seu patró de distribució de les dades. Per exemple, les distribucions normals o uniformes fan referència a una posició preferent d'un determinat cromosoma. En canvi, una distribució bimodal indicaria que un cromosoma té dues posicions preferents en nuclis amb el mateix genotip. En aquest sentit, és una eina útil quan s'analitzen nuclis disòmics o diploides/md, ja que permetrà distingir si els dos mateixos cromosomes ocupen la mateixa regió o regions diferents dins el nucli.

El baix nombre de dades disponibles representa una limitació important en la rellevància dels resultats obtinguts referents a la distribució dels senyals, així com en la comparació estadística dels valors, i per tant no es poden extreure conclusions definitives respecte les posicions preferents de cada cromosoma ni si hi ha canvis de posicionament de certs cromosomes entre nuclis amb diferents genotips. Tot i així, l'obtenció de les dades preliminars ha permès validar la metodologia d'anàlisi desenvolupada (sistema de captura, tractament de les imatge i càlcul de la posició dels senyals), i confirmar que és un mètode robust que pot aportar dades interessants quan s'apliqui en un conjunt més gran de dades. Així doncs, seria molt interessant la utilització d'aquesta metodologia per determinar de quina forma la presència d'una reorganització podria alterar les localitzacions preferents de la resta de cromosomes en un determinat nucli, i com això pot arribar a afectar la fertilitat dels individus.

5.2. Segregació alterada en espermatozoides amb anomalies cromosòmiques numèriques

Els estudis duts a terme per analitzar el contingut cromosòmic en espermatozoides d'individus portadors de translocacions han permès concloure que els espermatozoides amb anomalies numèriques presenten un patró alterat de segregació dels cromosomes reorganitzats respecte els resultats en espermatozoides no seleccionats. Per tant, hi ha evidències per afirmar que existeix una relació entre una segregació desequilibrada dels cromosomes reorganitzats i els fenòmens de no disjunció procedents de l'ICE .

Patró general de segregació: espermatozoides no seleccionats

L'anàlisi dels productes de segregació en espermatozoides no seleccionats demostra un comportament homogeni entre individus pel que fa als patrons de segregació, que coincideix amb el descrit a la bibliografia per cada tipus de reorganització (translocacions recíproques: revisat per Anton et al. 2008; translocacions Robertsonianes: revisat per Anton et al. 2010; triples translocacions: Cifuentes et al. 1998; Loup et al. 2010; Pellestor et al. 2011b; Hornak et al. 2014).

En els tres tipus de translocacions analitzades s'ha observat una segregació preferent dels cromosomes amb centròmers homòlegs a pols cel·lulars oposats. En el cas de les translocacions recíproques s'afavoreix la segregació alternant i adjacent I, en translocacions Robertsonianes s'afavoreix la segregació alternant; i en el portador de la triple translocació és majoritari el conjunt dels productes de segregació 3:3 alternant i 3:3 no alternant que impliquen la segregació dels cromosomes amb centròmers homòlegs. Aquestes observacions indiquen que el risc real de producció de gàmetes desequilibrats és significativament inferior al risc teòric, calculat tenint en compte els modes de segregació desequilibrats en relació a tots els modes teòrics de segregació. Per exemple, el risc teòric de producció de gàmetes desequilibrats en portadors de translocacions recíproques seria d'un 87,5% (12/16 productes són desequilibrats), i en canvi, el percentatge observat de gàmetes desequilibrats produïts per aquests portadors és del 56,2% de mitjana. En portadors de translocacions Robertsonianes el risc teòric seria del 75% (6/8 productes són desequilibrats) mentre que la mitjana d'espermatozoides alterats observats en aquests individus tan sols és del 15,7%. En el portador de la triple translocació esperaríem trobar un 96,9% de productes desequilibrats (62/64 productes), que es redueix a un 88,3% en

l'estimació del risc real. Una possible explicació del fet que els modes de segregació amb disjunció de centròmers homòlegs es trobin afavorits, es basa en l'orientació sintètica que adoptarien de forma preferent els cromosomes reorganitzats quan es troben a la placa metafàsica durant la primera divisió meiótica. De fet, aquesta orientació és la que genera un correcte equilibri de forces als cinetocors i és la necessària per una segregació normal de cromosomes homòlegs. En cas que no es produeixi la orientació sintètica dels cromosomes, les forces d'equilibri del fus es veuen descompensades i han d'intervenir els mecanismes de correcció del punt de control (veure apartat 1.2.2). Per això, els modes que impliquen cosegregacions de cromosomes que presenten centròmers homòlegs es veuen menys afavorides. En el cas de les translocacions recíproques, aquestes segregacions serien l'adjacent II i 4:0 (inclouen dues no disjuncions de centròmers homòlegs), i la 3:1 (implica una no disjunció). En el cas de les translocacions Robertsonianes serien l'adjacent (inclou una no disjunció) i la 3:0 (implica dues no disjuncions). Finalment, en la triple translocació serien la 3:3 no alternant (quan implica una no disjunció), la 4:2 (pot implicar una o dues no disjuncions), la 5:1 (inclou dues no disjuncions) i la 6:0 (inclou tres no disjuncions).

En tots els individus analitzats també s'han observat certes combinacions de senyals no atribuïbles a cap dels modes de segregació teòrics i s'han agrupat sota la denominació "altres". En portadors de translocacions recíproques i Robertsonianes, aquesta freqüència és molt baixa (0,1-1,2%), mentre que en el portador de la triple translocació és més elevada, amb una freqüència del 15,6%. En aquest últim cas, més de la meitat d'aquests productes de segregació d'aquesta categoria s'han assignat a errors d'hibridació, que es poden explicar per l'elevada complexitat de l'anàlisi realitzada, la qual ha inclòs tres rondes de FISH sobre els mateixos nuclis. Per tant la probabilitat de que hi hagi errors d'hibridació en el total de les rondes és superior que quan només se'n realitzen dues.

La majoria dels estudis de segregació publicats també descriuen la presència de productes no atribuïbles a cap dels modes teòrics de segregació en els diferents tipus de translocacions. Les freqüències descrites són similars a la dels individus analitzats, com per exemple un 0,9% de mitjana en translocacions recíproques (Anton et al. 2008), un 1% en translocacions Robertsonianes (Anton et al. 2010) i un 10% en portadors de triples translocacions (Loup et al. 2010; Pellestor et al. 2011b; Hornak et al. 2014).

Patró de segregació en espermatozoides aneuploides

En l'estudi de detecció d'anomalies numèriques en espermatozoides s'han observat aneuploidies per tots els cromosomes estudiats, amb una implicació preferent dels

cromosomes sexuals. La preferència d'aneuploidies en aquests cromosomes s'explica per la reduïda regió d'homologia que presenten, que només permet l'establiment d'un quiasma en la regió terminal del braç p (regió PAR) (Codina-Pascual et al. 2006a). Tenint en compte l'origen de l'ICE, aquesta dada dóna suport a l'alta incidència d'anomalies sinàptiques en la SV durant la profase I (veure apartat 1.5.2), així com a l'elevada susceptibilitat dels cromosomes sexuals a participar en fenòmens d'heterosinapsi. Tots aquests esdeveniments afavoreixen una recombinació meiòtica aberrant, que està relacionada amb la no disjunció posterior d'aquests cromosomes (Sun et al. 2008).

El fet que no hi hagi diferències significatives en la distribució del patró de segregació entre els gàmetes aneuploides per diferents cromosomes, ni entre els gàmetes amb diferents tipus d'aneuploidia (disomia o nul·lisomia), indica una contribució equivalent de cada tipus d'aneuploidia als patrons alterats de segregació que representen aquests gàmetes. Aquestes dades assenyalen que un cop es desencadena el fenomen d'interferència en la segregació d'altres cromosomes, aquest fet és independent del cromosoma i del tipus d'anomalia numèrica que s'hi vegin implicades.

Pel que fa a les alteracions que mostra el patró de segregació observat en espermatozoides aneuploides respecte els espermatozoides no seleccionats, cal destacar una reducció significativa dels productes de segregació equilibrats en portadors de translocacions recíproques i Robertsonianes, així com un augment de les segregacions 3:1/4:0 i 2:1/3:0, respectivament. En el cas específic de portadors de translocacions recíproques, també hi ha un reducció en la freqüència de la segregació 2:2 adjacent I. A diferència de les reorganitzacions anteriors on les dades provenen d'un conjunt d'individus, en el cas de la triple translocació només s'ha analitzat un individu i per tant, els resultats inclouen un nombre menor d'observacions. En aquest portador, els espermatozoides aneuploides presenten un patró alterat de segregació, però a diferència dels casos anteriors, no es tracta d'una acumulació de segregacions desequilibrades sinó d'un canvi en la distribució dels modes desequilibrats. S'observa un increment en els modes de segregació 5:1, 6:0 i "altres", acompanyat d'una reducció del mode de segregació desequilibrat 3:3 associat a productes amb disjunció dels cromosomes homòlegs.

En totes les reorganitzacions també s'han observat increments de productes de segregació "altres". La majoria dels nuclis d'aquesta categoria s'han pogut relacionar amb esdeveniments de no disjunció a la meiosi II, fet que suggereix l'existència d'una relació entre els esdeveniments de la primera i la segona divisió meiòtica. Aquest fenomen ha estat descrit en oòcits per Lamb et al. (1997) en un estudi on s'ha observat que la localització

pericentromèrica de quiasmes en el cromosoma 21 està relacionada amb un increment en la susceptibilitat d'error de disjunció d'aquest cromosoma a la meiosi II. Estudis posteriors han ampliat i confirmat aquestes dades (Oliver et al. 2008, 2012).

Patró de segregació en espermatozoides diploides/md

El patró de segregació observat en espermatozoides diploides/md presenta alteracions significatives respecte el patró que mostren els espermatozoides no seleccionats. En conjunt, els productes de segregació equilibrats són molt escassos (fins i tot nuls en el portador de la triple translocació). Tant en el cas de les translocacions recíproques com Robertsonianes, els productes de segregació majoritaris coincideixen amb els que s'esperarien en nuclis diploides: en translocacions recíproques un 52,6% dels nuclis classificats com a diploides/md en l'estudi d'anomalies numèriques presenten un contingut 4:0 dels cromosomes reorganitzats, i en translocacions Robertsonianes un 67,6% dels nuclis diploides/md presenten un contingut 3:0. En canvi, en el cas de la triple translocació aquesta premissa no es compleix, ja que només un 11,1% dels nuclis diploides/md presenten un contingut 6:0.

Per tant, hi ha una part dels espermatozoides classificats com a diploides/md en l'estudi d'anomalies numèriques (caracteritzats per presentar dos senyals per cada cromosoma avaluat) que a l'anàlisi de segregació mostren productes corresponents a segregacions diferents de les que s'esperen en nuclis $2n$. Aquesta dada posa de manifest que la població d'espermatozoides classificats a priori com a diploides/md, no està formada exclusivament per espermatozoides diploides sinó que també inclou nuclis amb múltiples disomies (md). Aquesta situació és especialment evident en el portador de la triple translocació, on la majoria d'espermatozoides categoritzats com a diploides/md serien, de fet, múltiples disòmics. També s'observa en els portadors de translocacions recíproques, on ho serien gairebé la meitat dels gàmetes, o en portadors de translocacions Robertsonianes, on ho serien un terç dels gàmetes.

Al igual que en els espermatozoides aneuploides, els espermatozoides diploides/md també presenten increments de productes de segregació classificats com a "altres". La majoria dels nuclis classificats en aquesta categoria s'han pogut relacionar amb esdeveniments de no disjunció a la meiosi II. Per tant, aquests resultats reforcen la idea d'una relació entre una alteració de la recombinació durant la meiosi I i una no disjunció en la meiosi II (Lamb et al. 1997; Oliver et al. 2008, 2012).

5.3. Progressió meiòtica alterada

Els mecanismes cel·lulars que participen en els punts de control de l'espermatogènesi són els responsables de que la producció d'espermatozoides tingui lloc de forma correcta. Tot i així, s'ha demostrat que els punts de control no sempre són eficients (Khodjakov i Rieder, 2009) i per tant, el seu grau d'efectivitat pot determinar el grau d'anomalies presents en espermatozoides.

Estudis en models murins portadors de translocacions Robertsonianes han relacionat la presència de cromosomes reorganitzats amb una disminució de l'efectivitat dels punts de control. Per exemple, han mostrat que cèl·lules germinals amb anomalies sinàptiques poden superar el punt de control de paquitè (Eaker et al. 2001; Manterola et al. 2009). També han observat que el punt de control SAC és efectiu detectant anomalies de posicionament dels cromosomes a la placa metafàsica, però després d'una aturada prolongada del cicle cel·lular, l'efectivitat d'aquest punt de control a l'hora d'eliminar els gàmetes anormals es redueix. Com a conseqüència, s'observen increments significatius d'espermatozoides aneuploides (Eaker et al. 2001).

De la mateixa manera, la presència de cromosomes reorganitzats en homes portadors de reorganitzacions cromosòmiques estructurals s'ha relacionat amb un increment d'anomalies en els espermatozoides, com per exemple la presència de marcadors apoptòtics, de fragmentació en el DNA (Brugnon et al. 2006, 2010; Perrin et al. 2009), o aneuploidies (Anton et al. 2011); que també es produïrien com a conseqüència de la reducció en l'efectivitat dels punts de control.

A continuació es detallen els factors que al llarg de les diverses etapes de l'espermatogènesi poden afectar la funcionalitat dels punts de control, reduir la seva eficiència, i en últim terme, conduir a una acumulació de fenòmens de no disjunció en els gàmetes d'individus portadors de reorganitzacions cromosòmiques.

5.3.1. Punt de control de paquitè: heterosinapsi

Tal i com s'ha demostrat en estudis d'espermatòcits d'individus portadors de reorganitzacions cromosòmiques, és habitual que els multivalents presentin regions asinàptiques en l'etapa de paquitè (veure apartat 1.5.2). S'ha descrit que aquestes anomalies comporten la heterocromatinització i el silenciament gènic de les regions implicades. En cas

que la regió afectada presenti gens essencials pel progrés de les cèl·lules a través de profase I, les cèl·lules quedaran bloquejades (Burgoyne et al. 2009). Un dels mecanismes que poden adoptar els espermatòcits per tal d'evitar l'apoptosi induïda pels mecanismes del punt de control de paquità, és l'aparellament heteròleg de les regions asinàptiques amb regions no homòlogues (Burgoyne et al. 2009). Sciurano et al. (2011) va suggerir que l'heterosinapsi produeix un canvi de localització nuclear de la cromatina transcripcionalment activa (es troba en cromosomes correctament aparellats) i de la cromatina transcripcionalment inactiva (regions asinàptiques dels cromosomes no aparellats). Aquesta hipòtesi es veu reforçada per altres estudis realitzats amb tècniques moleculars de captura de conformació cromosòmica (*Circularized Chromosome Conformation Capture, 4C*), que han demostrat que la cromatina activa i la inactiva es troben en dominis nuclears diferents, i que existeixen regions de contacte entre diferents cromosomes (de Laat i Grosveld, 2007).

Una conseqüència d'aquestes associacions heteròlogues seria l'alteració de la posició nuclear dels cromosomes segons l'estat de la cromatina (activa o inactiva), de forma que els cromosomes amb regions asinàptiques quedarien posicionats propers, dins d'un mateix domini nuclear. Per tant, l'heterosinapsi podria alterar les relacions de proximitat entre els cromosomes, que afectarien l'arquitectura nuclear global, així com la localització preferent dels cromosomes dins el nucli de l'espermatòcit. Una altra de les conseqüències de l'heterosinapsi podria ser una alteració en la formació i la distribució dels quiasmes en els cromosomes reorganitzats, promoguda pels problemes sinàptics d'aquests cromosomes (Pigozzi et al. 2005; Ferguson et al. 2008; Leng et al. 2009). A més, aquest fenomen d'alteració dels punts recombinació es podria estendre també als altres cromosomes implicats en l'heterosinapsi (Leng et al. 2009).

5.3.2. Punt de control SAC: posicionament dels cromosomes a la placa metafàsica

El número de quiasmes i la seva localització són característiques fonamentals per a la correcta orientació dels cromosomes al fus (Bhalla i Dernburg, 2008). Alteracions d'aquests esdeveniments en els cromosomes implicats en l'heterosinapsi poden comportar la formació d'un fus asimètric i per tant, la incorrecta orientació dels cromosomes (Eichenlaub-Ritter i Winking, 1990; Tepperberg et al. 1999; Eaker et al. 2001), així com errors en la seva posterior segregació (Shi et al. 2001; Ma et al. 2006; Lu et al. 2012).

S'ha observat que la posició relativa dels bivalents a la placa metafàsica no és aleatòria (Vergés et al. 2014). A més, estudis en metafases I de portadors de translocacions Robertsonianes, mostren una alteració de la posició relativa dels bivalents com a conseqüència de la reorganització (Solé et al. 2015). Per tant, es podria assumir que en portadors de reorganitzacions cromosòmiques, l'alteració de la posició relativa dels cromosomes participants en l'heterosinapsi durant l'etapa de paquitè, es podria mantenir alterada fins a metafase I. De fet, hi ha estudis que han suggerit que els cromosomes mantenen la seva posició relativa al llarg de la mitosi (Nagele et al. 1995) i que aquest posicionament preferent es transmet d'una divisió mitòtica a la següent (Gerlich et al. 2003). En el cas d'una alteració de la posició relativa dels cromosomes a metafase I, aquest posicionament incorrecte a la placa metafàsica podria provocar una aturada prolongada del cicle a través dels mecanismes del SAC. Tot i l'actuació dels mecanismes de reparació cel·lular, hi ha evidències que el SAC no és del tot eficient eliminant espermatòcits amb alteracions (Eaker et al. 2001). Per exemple, s'ha observat que pot hi pot haver progressió meiótica encara que no s'hagi assolit completament la unió correcta dels microtúbuls als cinetocors, o que no s'hagi establert un equilibri de forces (Malmanche et al. 2006, Sebestova et al. 2012). També s'ha descrit la possibilitat de que calgui assolir un mínim d'errors en la unió dels cromosomes als microtúbuls del fus per tal de que s'activin els mecanismes del SAC i s'aturi el cicle cel·lular (Sun i Kim, 2012). En qualsevol cas, l'aturada meiótica prolongada es podria resoldre a través de dos possibles mecanismes d'evasió del SAC:

- Un mecanisme seria l'entrada prematura a l'anafase mitjançant un fenomen descrit en mitosi, anomenat "mitotic slippage". Segons aquest mecanisme, després d'un d'aturada en metafase, les cèl·lules poden entrar en anafase encara que no s'hagin completat els requisits del SAC. Estudis realitzats en cèl·lules mitòtiques humanes (RPE1) i de marsupial (Ptk1) proposen que durant l'aturada a metafase, la ciclina B es va degradant progressivament a través de la proteòlisi dependent d'ubiquitina i promoguda per APC^{CDC20}. Tot i ser una eliminació gradual, quan els nivells de la ciclina B disminueixen fins a un cert llindar, es permet la sortida de mitosi (Brito i Rieder, 2006). En portadors de translocacions cromosòmiques, aquesta situació comportaria resolucions meiótiques errònies en una freqüència més elevada, que podrien incloure errors tant en la segregació dels cromosomes reorganitzats com en la segregació d'altres cromosomes amb problemes de posicionament en el fus. Per tant, es formarien espermatozoides que presentarien productes de segregació desequilibrats i aneuploidies simultàniament.

La presència d'espermatozoides portadors de múltiples disomies i els increments de productes de segregació "altres" en espermatozoides amb anomalies numèriques, donen suport a un fenomen de no disjunció generalitzat. En aquest sentit, tot i que és important considerar que l'eficiència d'hibridació de les sondes utilitzades és molt elevada, una part de les combinacions de senyals "altres" observades en l'estudi de segregació s'han atribuït a errors d'hibridació en les diferents reorganitzacions. Per tant, aquestes combinacions de senyals podrien indicar més aviat un contingut cromosòmic caòtic dels espermatozoides, que inclouria diferents tipus d'anomalies cromosòmiques.

- Un altre mecanisme seria a través de la sortida de la meiosi amb absència de citocinesi i la conseqüent producció d'espermatozoides diploides. Aquest mecanisme va ser proposat per Egozcue et al. (2000) com a explicació a la freqüent presència de taxes incrementades d'espermatozoides diploides en individus infèrtils. En una revisió sobre mecanismes de generació d'aneuploidies relacionades amb càncer, Weaver i Cleveland (2006) van definir aquest mecanisme com un fenomen d'adaptació del punt de control SAC en cèl·lules mitòtiques amb un fus aberrant, que dona lloc a la generació de tetraploidies. El mecanisme d'evasió del SAC en aquestes circumstàncies seria molt semblant al que té lloc durant el "mitotic slippage" (Brito i Rieder, 2006), però recentment estudis en llevat han proposat que aquesta adaptació del SAC també podria tenir lloc a través d'altres mecanismes, com una fosforilació d'APC/C que augmentaria la seva afinitat per CDC20 i, passat un llindar de formació d'APC/C^{CDC20}, es podria superar el punt de control (Vernieri et al. 2013). Per tant, la presència d'increments d'espermatozoides diploides en els individus analitzats (16/20 individus portadors de reorganitzacions mostren increments significatius de diploidies respecte la població control [Godo et al. 2013a, Godo et al. 2013b, Godo et al. 2015]) es podria relacionar amb l'evasió del SAC i la conseqüent sortida de meiosi amb absència de citocinesi.

Considerant tota la informació detallada als apartats 5.3.1 i 5.3.2, és plausible que la formació d'un fus anòmal i la conseqüent aturada meiòtica en portadors de reorganitzacions cromosòmiques tingui lloc en una freqüència superior a la que es dona en individus amb cariotip normal. Els resultats obtinguts en els portadors de les diverses translocacions analitzades donen suport a la seqüència d'esdeveniments anteriorment esmentats.

És important remarcar que tots els estudis s'han realitzat en individus que presenten un ICE positiu, per tant, les conclusions extretes s'han de limitar als individus amb aquesta

característica. Tot i així, els mecanismes de correcció cel·lular són comuns per tots els individus, i per tant el mateix fenomen d'acumulació de diferents tipus d'anomalies cromosòmiques en els gàmetes també es podria observar en la resta d'individus portadors de reorganitzacions, encara que no presentin increments d'anomalies numèriques (ICE negatiu). La diferència es basaria en la freqüència en què succeeixen les anomalies d'aparellament en els espermatòcits, que són les que desencadenarien el fenomen d'interferència en la segregació cromosòmica.

5.3.3. Punt de control post-meiótic

Un cop superada l'etapa meiótica, hi ha d'altres factors que poden afectar la maduració de les espermatides a espermatozoides. Tal i com s'ha descrit prèviament a l'apartat 1.2.3, una organització anòmala de l'heterocromatina en la profase I podria alterar l'expressió gènica en l'espermioogènesi. Per tant, si factors de transcripció essencials en la regulació de gens específics d'aquest procés es troben en regions anormalment heterocromatinitzades, la seva expressió quedarà silenciada (Martianov et al. 2002; Heard i Turner, 2011). Aquest efecte de silenciament seria aplicable a aquelles cèl·lules germinals de portadors de reorganitzacions en les quals el fenomen d'heterocromatinització hagi afectat regions cromosòmiques no habituals. La possible alteració de l'expressió gènica en l'espermioogènesi és un aspecte que també podria contribuir als problemes de fertilitat d'aquests individus. Per exemple, afectacions en la diferenciació dels espermatozoides podrien tenir un efecte en els paràmetres seminals. De fet, a la literatura s'evidencia l'elevada incidència d'individus infèrtils portadors de reorganitzacions amb alteracions seminals: 69,2% dels portadors de translocacions recíproques (revisat per Vozdova et al. 2013), 40,5% dels portadors de translocacions Robertsonianes (revisat per Vozdova et al. 2013) i un 100% dels individus estudiats portadors de triples translocacions (Pellestor et al. 2011a).

5.3.4. Estudis en oòcits i embrions

Els estudis realitzats en oòcits permeten avaluar si els fenòmens descrits anteriorment tenen lloc durant la meiosi femenina. S'ha descrit que els punts de control de l'oogènesi són menys eficients que els de l'espermatoogènesi, i per tant, impliquen una major susceptibilitat a permetre l'aparició d'aneuploidies (Morelli i Cohen, 2005).

En aquest sentit, només hi ha un estudi realitzat en oòcits procedents de dues dones portadores de translocacions Robertsonianes en el que s'avalua conjuntament els contingut dels cromosomes reorganitzats i d'altres cromosomes (Pujol et al. 2003). El 66,7% (2/3) dels oòcits haploides van mostrar productes de segregació equilibrats, mentre que només el 47% (8/17) dels oòcits detectats com aneuploides van mostrar productes de segregació equilibrats. Tot i la limitació tant en el nombre de dones portadores incloses en aquest estudi com en el nombre cèl·lules analitzades, aquests resultats apunten a l'existència d'un lligam entre la producció d'oòcits aneuploides i la presència de productes de segregació desequilibrats, que estarien en la línia dels resultats obtinguts en espermatozoides.

Per altra banda, les Taules 5.1 i 5.2 detallen les dades publicades referents a estudis de DGP en embrions de progenitors portadors de translocacions recíproques i Robertsonianes respectivament (homes, dones o ambdós). Aquests estudis realitzats amb les tècniques de FISH, CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) o microarray-CGH han permès extreure informació sobre els productes de segregació dels cromosomes reorganitzats en embrions euploides o embrions aneuploides (portadors de com a mínim una anomalia numèrica no relacionada amb els cromosomes reorganitzats). Fins al moment, no hi ha dades publicades que permetin disposar d'aquesta informació en el cas de portadors de triples translocacions.

Taula 5.1. Recull de dades de DGP en embrions procedents de portadors de translocacions recíproques a partir de les quals es pot relacionar la presència d'aneuploidies amb els productes de segregació.

Total portadors (n)	Embrions euploides		Embrions aneuploides		Total embrions (n)	Mètode
	Segregació % (n)		Segregació % (n)			
	Eq.	Deseq.	Eq.	Deseq.		
26 (15H, 11D) ^{a,b}	24,6 (15)	75,4 (46)	16,1 (9)	83,9 (47)	117	
5 (H) ^b	38,5 (5)	61,5 (8)	11,8 (4)	88,2 (30)	47	FISH
8 (D) ^b	50,0 (3)	50,0 (3)	25,0 (2)	75,0 (8)	16	
53 (27H, 26D) ^{c,d,e}	36,0 (64)	64,0 (114)	39,0 (103)	61,0 (161)	442	CGH/
21 (H) ^{c,e}	36,0 (27)	64,0 (48)	46,5 (40)	53,5 (46)	161	microarray-
18 (D) ^{c,e,f}	31,8 (27)	68,2 (58)	38,5 (35)	61,5 (56)	176	CGH

H, homes portadors; D, dones portades; Eq., segregació equilibrada; Deseq., segregació desequilibrada

^a Gianaroli et al. 2002; ^b Pujol et al. 2006; ^c Alfarawati et al. 2011; ^d Fiorentino et al. 2011; ^e Colls et al. 2012; ^f Rius et al. 2011

Taula 5.2. Recull de dades de DGP en embrions procedents de portadors de translocacions Robertsonianes a partir de les quals es pot relacionar la presència d'aneuploidies amb els productes de segregació.

Total portadors (n)	Embrions euploides		Embrions aneuploides		Total embrions (n)	Mètode
	Segregació % (n)		Segregació % (n)			
	Eq.	Deseq.	Eq.	Deseq.		
4 (3H, 1D) ^a	59,1 (26)	40,9 (18)	45,6 (26)	54,4 (31)	101	FISH
28 (14H, 14D) ^{b,d,e}	74,7 (68)	25,3 (23)	69,6 (96)	30,4 (42)	229	CGH/
16 (H) ^{b,c,d,e}	75,0 (57)	25,0 (19)	76,4 (68)	23,6 (21)	165	microarray-
14 (D) ^{b,d,e}	71,4 (25)	28,6 (10)	58,8 (47)	41,2 (33)	115	CGH

H, homes portadors; D, dones portades; Eq., segregació equilibrada; Deseq., segregació desequilibrada

^a Gianaroli et al. 2002; ^b Alfarawati et al. 2011; ^c Fiorentino et al. 2011; ^d Rius et al. 2011; ^e Colls et al. 2012

Els resultats de DGP no revelen una relació evident entre la formació d'embrions aneuploides amb productes de segregació desequilibrats, independentment del progenitor afectat o del tipus de metodologia utilitzada. S'han realitzat comparacions estadístiques de les freqüències de segregacions equilibrades o desequilibrades entre embrions euploides i aneuploides i no s'ha trobat cap diferència significativa (p -valor > 0,05; test χ^2).

Per altra banda, a partir de les dades recollides a les Taules 5.1 i 5.2 també es pot inferir que més del 50% d'embrions analitzats en tots els estudis esmentats són aneuploides. Aquesta dada no és del tot sorprenent, ja que Alfarawati et al. (2012) van detectar un 65,3% d'embrions aneuploides mitjançant microarray-CGH en un grup d'embrions control amb cariotip normal. Així doncs, l'origen de moltes aneuploidies embrionàries no estaria relacionat amb la presència dels cromosomes reorganitzats, ja que aquestes són presents per igual en embrions amb productes de segregació equilibrats o desequilibrats. No obstant, considerem que l'elevada incidència d'embrions aneuploides podria emascarar una suposada associació entre els productes de segregació desequilibrats dels cromosomes reorganitzats i les anomalies numèriques per cromosomes no relacionats.

6. Conclusions



Primera

La metodologia de FISH aplicada de forma seqüencial sobre espermatozoides procedents d'individus portadors de translocacions permet identificar la presència d'anomalies numèriques i determinar el mode de segregació dels cromosomes reorganitzats en els mateixos nuclis.

Segona

Els patrons de segregació en espermatozoides no seleccionats d'individus portadors del mateix tipus de translocació presenten un alt grau d'homogeneïtat. De forma general es caracteritzen per una elevada freqüència de productes resultants de la disjunció a pols oposats dels cromosomes amb centròmers homòlegs. En tots els casos, el risc real de producció de gàmetes desequilibrats és inferior al risc teòric.

Tercera

Els espermatozoides amb anomalies numèriques mostren un patró de segregació alterat. De forma general s'afavoreix la formació de productes desequilibrats resultants de modes de segregació que impliquen la no disjunció. Per tant, existeix una relació entre els fenòmens de no disjunció que afecten als cromosomes reorganitzats i els que afecten als cromosomes no implicats en la reorganització.

Quarta

El model proposat per explicar l'acumulació d'anomalies cromosòmiques en els mateixos gàmetes es basa en un efecte bidireccional de l'heterosinapsi sobre els cromosomes implicats, que comporta canvis en la localització nuclear dels cromosomes, una alteració en la formació de quiasmes i problemes d'orientació dels cromosomes a metafase I. Aquestes anomalies provocarien una aturada meiòtica prolongada, que en cas de no corregir-se, es resoldria a través de l'evasió del punt de control, afavorint fenòmens de no disjunció generalitzats.

Cinquena

La metodologia desenvolupada per a l'anàlisi del posicionament cromosòmic en espermatozoides permet la captura tridimensional dels nuclis i l'establiment de la localització preferent dels cromosomes sobre l'eix radial i longitudinal.

7. Bibliografia



A

- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Wells D. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Hum Reprod* 2011;26:1560-1574.
- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Wells D. Embryos of robertsonian translocation carriers exhibit a mitotic interchromosomal effect that enhances genetic instability during early development. *PLoS Genet* 2012;8:e1003025.
- Alladin N, Moskovtsev SI, Russell H, Kenigsberg S, Lulat AG-M, Librach CL. The three-dimensional image analysis of the chromocenter in motile and immotile human sperm. *Syst Biol Reprod Med* 2013;59:146-152.
- Amann RP. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl* 2008;29:469-487.
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod* 2004;19:1345-1351.
- Anton E, Vidal F, Blanco J. Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod* 2007;22:2088-2092.
- Anton E, Vidal F, Blanco J. Reciprocal translocations: tracing their meiotic behavior. *Genet Med* 2008;10:730-738.
- Anton E, Blanco J, Vidal F. Meiotic behavior of three D;G Robertsonian translocations: segregation and interchromosomal effect. *J Hum Genet* 2010;55:541-545.
- Anton E, Vidal F, Blanco J. Interchromosomal effect analyses by sperm FISH: incidence and distribution among reorganization carriers. *Syst Biol Reprod Med* 2011;57:268-278.
- Armstrong SJ, Hultén M. Meiotic segregation analysis by FISH investigations in sperm and spermatocytes of translocation heterozygotes. *Eur J Hum Genet* 1998;6:430-431.
- Aurias A, Prieur M, Dutrillaux B, Lejeune J. Systematic analysis of 95 reciprocal translocations of autosomes. *Hum Genet* 1978;45:259-282.

B

- Baudat F, Imai Y, de Massy B. Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nat Rev Genet* 2013;14:794-806.
- Bhalla N, Dernburg AF. Prelude to a division. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008;24:397-424.

Bibliografia

- Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1996;11:722-726.
- Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, Fauth C, et al. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol* 2005;3:e157.
- Brito DA, Rieder CL. Mitotic Checkpoint Slippage in Humans Occurs via Cyclin B Destruction in the Presence of an Active Checkpoint. *Curr Biol* 2006;16:1194-1200.
- Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, et al. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod* 2006;21:685-693.
- Brugnon F, Janny L, Communal Y, Darcha C, Szczepaniak C, Pellestor F, et al. Apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm from Robertsonian translocation carrier patients. *Hum Reprod* 2010;25:1631-1642.
- Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Turner JMA. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat Rev Genet* 2009;10:207-216.

C

- Chandley AC, Speed RM, McBeath S, Hargreave TB. A human 9;20 reciprocal translocation associated with male infertility analyzed at prophase and metaphase I of meiosis. *Cytogenet Cell Genet* 1986;41:145-153.
- Cifuentes P, Navarro J, Míguez L, Egozcue J, Benet J. Sperm segregation analysis of a complex chromosome rearrangement, 2;22;11, by whole chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet* 1998;82:204-209.
- Codina-Pascual M, Campillo M, Kraus J, Speicher MR, Egozcue J, Navarro J, et al. Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and effects on human male meiosis. *Mol Hum Reprod* 2006a;12:123-133.
- Codina-Pascual M, Navarro J, Oliver-Bonet M, Kraus J, Speicher M, Arango O, et al. Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes. *Hum Reprod* 2006b;21:1490.
- Colls P, Escudero T, Fischer J, Cekleniak NA, Ben-Ozer S, Meyer B, et al. Validation of array comparative genome hybridization for diagnosis of translocations in preimplantation human embryos. *Reprod Biomed Online* 2012;24:621-629.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010;16:231-245.

- Couzin DA, Watt JL. Structural rearrangements in the children with parents of trisomy. *1987*;280-282.
- Cremer T, Cremer M. Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a003889.
- Cremer T, Küpper K, Dietzel S, Fakan S. Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: On the way from structure to function. *Biol Cell* 2004;96:555-567.
- Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol* 1999;145:1119-1131.

E

- Eaker S, Pyle A, Cobb J, Handel MA. Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci* 2001;114:2953-2965.
- Egozcue J, Blanco J, Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 1997;3:441-452.
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, et al. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000;6:93-105.
- Eichenlaub-Ritter U, Winking H. Nondisjunction, disturbances in spindle structure, and characteristics of chromosome alignment in maturing oocytes of mice heterozygous for Robertsonian translocations. *Cytogenet Cell Genet* 1990;54:47-54.

F

- Ferguson KA, 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* 2008;23:988-995.
- Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online* 2007;14:734-745.
- Finch KA, Fonseka KGL, Abogrein A, Ioannou D, Handyside AH, Thornhill AR, et al. Nuclear organization in human sperm: preliminary evidence for altered sex chromosome centromere position in infertile males. *Hum Reprod* 2008;23:1263-1270.

Bibliografia

Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, Biricik A, Kokkali G, Rienzi L, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 2011;26:1925-1935.

Foster HA, Abeydeera LR, Griffin DK, Bridger JM. Non-random chromosome positioning in mammalian sperm nuclei, with migration of the sex chromosomes during late spermatogenesis. *J Cell Sci* 2005;118:1811-1820.

Foster DA, Yellen P, Xu L, Saqcena M. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). *Genes Cancer* 2010;1:1124-1131.

G

Gabriel-Robez O, Ratomponirina C, Dutrillaux B, Carré-Pigeon F, Rumpler Y. Meiotic association between the XY chromosomes and the autosomal quadrivalent of a reciprocal translocation in two infertile men, 46,XY,t(9;22) and 46,XY,t(17;21). *Cytogenet Cell Genet* 1986;43:154-160.

Gardner R, Sutherland G, Shaffer L. Chromosomal abnormalities and genetic counseling. 2011; Oxford University Press, Inc.: New York.

Gerlich D, Kalbfuss B, Daigle N, Eils R, Ellenberg J. Global Chromosome Positions Are Transmitted through Mitosis in Mammalian Cells. *Cell* 2003;112:751-764.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S, Balicchia B, Escudero T, et al. Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod* 2002;17:3201-3207.

Godo A, Blanco J, Vidal F, Anton E. Accumulation of numerical and structural chromosome imbalances in spermatozoa from reciprocal translocation carriers. *Hum Reprod* 2013a;28:840-849.

Godo A, Blanco J, Vidal F, Parriego M, Boada M, Anton E. Sequential FISH allows the determination of the segregation outcome and the presence of numerical anomalies in spermatozoa from a t(1;8;2)(q42;p21;p15) carrier. *J Assist Reprod Genet* 2013b;30:1115-1123.

Godo A, Blanco J, Vidal F, Sandalinas M, Garcia-Guixé E, Anton E. Altered segregation pattern and numerical chromosome abnormalities interrelate in spermatozoa from Robertsonian translocation carriers. *Reprod Biomed Online* 2015;31:79-88.

Goetze S, Mateos-Langerak J, Gierman HJ, de Leeuw W, Giromus O, Indemans MHG, et al. The three-dimensional structure of human interphase chromosomes is related to the transcriptome map. *Mol Cell Biol* 2007;27:4475-4487.

Grasser F, Neusser M, Fiegler H, Thormeyer T, Cremer M, Carter NP, et al. Replication-timing-correlated spatial chromatin arrangements in cancer and in primate interphase nuclei. *J Cell Sci* 2008;121:1876-1886.

Guichaoua MR, Quack B, Speed RM, Noel B, Chandley AC, Luciani JM. Infertility in human males with autosomal translocations: meiotic study of a 14;22 Robertsonian translocation. *Hum Genet* 1990;86:162-166.

H

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

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

Hazzouri M, Rousseaux S, Mongelard F, Usson Y, Pelletier R, Faure AK, et al. Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. *Mol Reprod Dev* 2000;55:307-315.

Heard E, Turner J. Function of the sex chromosomes in mammalian fertility. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:1-17.

Hill AS, Foot NJ, Chaplin TL, Young BD. The most frequent constitutional translocation in humans, the t(11;22)(q23;q11) is due to a highly specific alu-mediated recombination. *Hum Mol Genet* 2000;9:1525-1532.

Hintze J, Nelson R. Violin plots: A Box Plot-Density Trace Synergism. *Am Statistician* 1998;53:181-184.

Holland AJ, Böttger F, Stemmann O, Taylor SS. Protein phosphatase 2A and separase form a complex regulated by separase autocleavage. *J Biol Chem* 2007;282:24623-24632.

Hornak M, Vozdova M, Musilova P, Prinosilova P, Oracova E, Linkova V, et al. Comprehensive meiotic segregation analysis of a 4-breakpoint t(1;3;6) complex chromosome rearrangement using single sperm array comparative genomic hybridization and FISH. *Reprod Biomed Online* 2014;29:499-508.

I

Ioannou D, Meershoek EJ, Christopikou D, Ellis M, Thornhill AR, Griffin DK. Nuclear organisation of sperm remains remarkably unaffected in the presence of defective spermatogenesis. *Chromosom Res* 2011;19:741-753.

J

Johanisson R, Löhrs U, Wolff HH, Schwinger E. Two different XY-quadrivalent associations and impairment of fertility in men. *Cytogenet Cell Genet* 1987;45:222-230.

K

Karamysheva T, Kosyakova N, Guediche N, Liehr T. Small supernumerary marker chromosomes and the nuclear architecture of sperm – a study in a fertile and an infertile brother. *Syst Biol Reprod Med* 2015;61:32-36.

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

Kato T, Kurahashi H, Emanuel BS. Chromosomal translocations and palindromic AT-rich repeats. *Curr Opin Genet Dev* 2012;22:221-228.

Khodjakov A, Rieder CL. The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. *J Biol* 2009;8:88.2-88.5.

Kirkpatrick G, Ma S. Meiotic segregation and interchromosomal effects in a rare (1:2:10) complex chromosomal rearrangement. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:77-81.

Kirkpatrick G, Ren H, Liehr T, Chow V, Ma S. Meiotic and sperm aneuploidy studies in three carriers of Robertsonian translocations and small supernumerary marker chromosomes. *Fertil Steril* 2015;103:1162-1169.e7.

L

de Laat W, Grosveld F. Inter-chromosomal gene regulation in the mammalian cell nucleus. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17:456-464.

- Lamb NE, Feingold E, Savage A, Avramopoulos D, Freeman S, Gu Y, et al. Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. *Hum Mol Genet* 1997;6:1391-1399.
- Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS. The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* 2012;22:R966-R980.
- Lejeune J. Autosomal disorders. *Pediatrics* 1963;32:326-337.
- Leng M, Li G, Zhong L, Hou H, Yu D, Shi Q. Abnormal synapses and recombination in an azoospermic male carrier of a reciprocal translocation t(1;21). *Fertil Steril* 2009;91:1293.e17-e22.
- Li XC, Bolcun-Filas E, Schimenti JC. Genetic evidence that synaptonemal complex axial elements govern recombination pathway choice in mice. *Genetics* 2011;189:71-82.
- Lindembaum R, Hultén M, McDermott A, Seabright M. The prevalence of translocations in parents of children with regular trisomy 21 : a possible interchromosomal effect? *J Med Genet* 1985;22:24-28.
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, et al. *Molecular Cell Biology*, 6th ed. 2007; W.H. Freeman and Company, New York.
- Loup V, Bernicot I, Janssens P, Hedon B, Hamamah S, Pellestor F, et al. Combined FISH and PRINS sperm analysis of complex chromosome rearrangement t(1;19;13): an approach facilitating PGD. *Mol Hum Reprod* 2010;16:111-116.
- Lu S, Zong C, Fan W, Yang M, Li J. Probing meiotic recombination and aneuploidy of single sperm cells by whole genome sequencing. *Science* 2012;338:1627-1630.
- Luciani JM, Guichaoua MR, Mattei A, Morazzani MR. Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. *Cytogenet Cell Genet* 1984;38:14-22.

M

- Ma S, Ferguson KA, Arsovska S, Moens P, Chow V. Reduced recombination associated with the production of aneuploid sperm in an infertile man: a case report. *Hum Reprod* 2006;21:980-985.
- Malmanche N, Maia A, Sunkel CE. The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett* 2006;580:2888-2895.
- Manterola M, Page J, Vasco C, Berríos S, Parra MT, Viera A, et al. A high incidence of meiotic silencing of unsynapsed chromatin is not associated with substantial pachytene loss in heterozygous male mice carrying multiple simple robertsonian translocations. *PLoS Genet* 2009;5:e1000625.

Bibliografia

- Manvelyan M, Hunstig F, Bhatt S, Mrasek K, Pellestor F, Weise A, et al. Chromosome distribution in human sperm - a 3D multicolor banding-study. *Mol Cytogenet* 2008;1:25.
- Martianov I, Brancorsini S, Gansmuller A, Parvinen M, Davidson I, Sassone-Corsi P. Distinct functions of TBP and TLF/TRF2 during spermatogenesis: requirement of TLF for heterochromatic chromocenter formation in haploid round spermatids. *Development* 2002;129:945-955.
- Mau-Holzmann U. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:317-336.
- Mikkelsen M. Down's syndrome. Current stage of cytogenetic research. *Humangenetik* 1971;12:1-28.
- Millan NM, Lau P, Hann M, Ioannou D. Hierarchical radial and polar organisation of chromosomes in human sperm. *Chromosom Res* 2012;20:875-887.
- Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: More than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 2010;139:287-301.
- Molina O, Sarrate Z, Vidal F, Blanco J. FISH on sperm: spot-counting to stop counting? Not yet. *Fertil Steril* 2009;92:1474-1480.
- Morelli MA, Cohen PE. Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 2005;130:761-781.
- Mudrak O, Tomilin N, Zalensky A. Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus. *J Cell Sci* 2005;118:4541-4550.
- Mudrak OS, B Nazarov I, Jones EL, Zalensky AO. Positioning of chromosomes in human spermatozoa is determined by ordered centromere arrangement. *PLoS One* 2012;7:e52944.

N

- Nagele R, Freeman T, McMorrow L, Lee H. Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: Evidence for chromosomal order. *Science* 1995;270:1831-1834.
- Navarro J, Vidal F, Benet J, Templado C, Marina S, Egozcue J. XY-trivalent association and synaptic anomalies in a male carrier of a Robertsonian t(13;14) translocation. *Hum Reprod* 1991;6:376-381.

O

- O'Flynn O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertil Steril* 2010;93:1-12.
- Oliver TR, Feingold E, Yu K, Cheung V, Tinker S, Yadav-Shah M, et al. New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes. *PLoS Genet* 2008;4:1-9.
- Oliver TR, Tinker SW, Allen EG, Hollis N, Locke AE, Bean LJH, et al. Altered patterns of multiple recombinant events are associated with nondisjunction of chromosome 21. *Hum Genet* 2012;131:1039-1046.
- Oliver-Bonet M, Benet J, Sun F, Navarro J, Abad C, Liehr T, et al. Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Hum Reprod* 2005;20:683-688.
- Olszewska M, Wiland E, Kurpisz M. Positioning of chromosome 15, 18, X and Y centromeres in sperm cells of fertile individuals and infertile patients with increased level of aneuploidy. *Chromosome Res* 2008;16:875-890.

P

- Page SL, Hawley RS. Chromosome Choreography: The Meiotic Ballet. *Science* 2003;301:785-790.
- Parada LA, McQueen PG, Misteli T. Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol* 2004;5:R44.
- Pawlowski WP, Cande WZ. Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends Cell Biol* 2005;15:674-681.
- Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hédon B, et al. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. *Hum Reprod Update* 2011a;17:476-494.
- Pellestor F, Puechberty J, Weise A, Lefort G, Anahory T, Liehr T, et al. Meiotic segregation of complex reciprocal translocations: direct analysis of the spermatozoa of a t(5;13;14) carrier. *Fertil Steril* 2011b;1-6.
- Perrin A, Caer E, Oliver-Bonet M, Navarro J, Benet J, Amice V, et al. DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertil Steril* 2009;92:583-589.
- Pigozzi MI, Sciarano RB, Solari AJ. Changes in crossover distribution along a quadrivalent in a man carrier of a reciprocal translocation t(11;14). *Biocell* 2005;29:195-203.

Bibliografia

Pujol A, Durban M, Benet J, Boiso I, Calafell JM, Egozcue J, Navarro J. Multiple aneuploidies in the oocytes of balanced translocation carriers: a preimplantation genetic diagnosis study using first polar body. *Reproduction* 2003;126:701-711.

Pujol A, Benet J, Staessen C, Van Assche E, Campillo M, Egozcue J, et al. The importance of aneuploidy screening in reciprocal translocation carriers. *Reproduction* 2006;131:1025-1035.

R

Rius M, Obradors A, Daina G, Ramos L, Pujol A, Martínez-Passarell O, et al. Detection of unbalanced chromosome segregations in preimplantation genetic diagnosis of translocations by short comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 2011;96:134-142.

Roig I, Dowdle JA, Toth A, de Rooij DG, Jasin M, Keeney S. Mouse TRIP13/PCH2 is required for recombination and normal higher-order chromosome structure during meiosis. *PLoS Genet* 2010;6:e1001062.

S

San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* 2008;77:229-257.

Sarrate Z, Anton E. Fluorescent in situ hybridization (FISH) protocol in human sperm. *J Vis Exp* 2009;31.

Sarrate Z, Vidal F, Blanco J. Meiotic abnormalities in metaphase I human spermatocytes from infertile males: frequencies, chromosomes involved, and the relationships with polymorphic karyotype and seminal parameters. *Asian J Androl* 2014;16:838.

Sciurano R, Rahn M, Rey-Valzacchi G, Coco R, Solari J. The role of asynapsis in human spermatocyte failure. *Int J Androl* 2011;35:541-549.

Sciurano R, Rahn M, Rey-Valzacchi G, Solari AJ. The asynaptic chromatin in spermatocytes of translocation carriers contains the histone variant gamma-H2AX and associates with the XY body. *Hum Reprod* 2007;22:142-150.

Sebestova J, Danylevska A, Dobrucka L, Kubelka M, Anger M. Lack of response to unaligned chromosomes in mammalian female gametes. *Cell Cycle* 2012;11:3011-3018.

- Shaltiel IA, Krenning L, Bruinsma W, Medema RH. The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *J Cell Sci* 2015;2:607-620.
- Shi Q, Spriggs E, Field LL, Ko E, Barclay L. Single Sperm Typing Demonstrates That Reduced Recombination Is Associated With the Production of Aneuploid 24,XY Human Sperm. *Am J Med Genet* 2001;38:34-38.
- Solé M, Vergés L, Valero O, Blanco J, Vidal F, Sarrate Z. Efecte de la presència de reorganitzacions cromosòmiques en el posicionament de bivalents a metafase I en espermatòcits humans. *Biologia de la reproducció Vol.14* 2015; Societat Catalana de Biologia, Barcelona.
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker A, et al. Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am J Hum Genet* 2004;74:521-531.
- Sun HB, Shen J, Yokota H. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys J* 2000;79:184-190.
- Sun SC, Kim NH. Spindle assembly checkpoint and its regulators in meiosis. *Hum Reprod Update* 2012;18:60-72.

T

- Tempest HG. Meiotic recombination errors, the origin of sperm aneuploidy and clinical recommendations. *Syst Biol Reprod Med* 2011;57:93-101.
- Tepperberg JH, Moses MJ, Nath J. Colchicine effects on meiosis in the male mouse. II. Inhibition of synapsis and induction of nondisjunction. *Mutat Res* 1999;429:93-105.
- Tres LL. XY chromosomal bivalent: nucleolar attraction. *Mol Reprod Dev* 2005;72:1-6.

V

- Vergés L, Blanco J, Valero O, Vidal F, Sarrate Z. Chromosome size, morphology, and gene density determine bivalent positioning in metaphase I human spermatocytes. *Fertil Steril* 2014;101:818-824
- Vernieri C, Chiroli E, Francia V, Gross F, Ciliberto A. Adaptation to the spindle checkpoint is regulated by the interplay between Cdc28/Clbs and PP2A/Cdc55. *J Cell Biol* 2013;202:765-778.

Bibliografia

Vogt E, Kirsch-Volders M, Parry J, Eichenlaub-Ritter U. Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutat Res* 2008;651:14-29.

Vozdova M, Oracova E, Kasikova K, Prinosilova P, Rybar R, Horinova V, et al. Balanced chromosomal translocations in men: relationships among semen parameters, chromatin integrity, sperm meiotic segregation and aneuploidy. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:391-405.

W

Weaver B, Cleveland DW. Does aneuploidy cause cancer? *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:658-667.

Wiland E, Zegało M, Kurpisz M. Interindividual differences and alterations in the topology of chromosomes in human sperm nuclei of fertile donors and carriers of reciprocal translocations. *Chromosome Res* 2008;16:291-305.

Y

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

Yu WR, Gabriel-Robez O, Croquette MF, Rigot JM, Rumpler Y. XY-quadrivalent association and sterility in a man carrier of a reciprocal autosomal translocation involving the whole arm of an acrocentric chromosome t(2;15)(q21.3;cen). *Andrologia* 1995;27:145-153.

Z

Zalensky A, Zalenskaya I. Organization of chromosomes in spermatozoa: an additional layer of epigenetic information? *Biochem Soc Trans* 2007;35:609-611.

Zeitl MJ, Mukherjee L, Bhattacharya S, Xu J, Berezney R. A probabilistic model for the arrangement of a subset of human chromosome territories in WI38 human fibroblasts. *J Cell Physiol* 2009;221:120-129.

8. Annex



8.1. Patró de segregació en espermatozoides aneuploides segons el cromosoma afectat

8.1.1. Resultats en individus portadors de translocacions recíproques

Taula 8.1. Resultats de segregació en espermatozoides aneuploides (disòmics i nul·lisòmics) pels cromosomes sexuals (X/Y).

Cr. X/Y	Alternant (%)		Adjacent I (%)		Adjacent II (%)		3:1 (%)		4:0 (%)		Altres (%)		Total (n)	
	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.
Rcp 1	10,2	34,3	11,9	25,0	0,0	9,4	32,2	23,4	33,9	3,1	11,9	4,7	59	64
Rcp 2	15,8	42,9	31,6	21,4	5,3	14,3	31,6	21,4	5,3	0,0	10,5	0,0	19	14
Rcp 3	11,4	33,3	8,8	33,3	8,6	13,3	25,7	13,3	40,0	6,7	5,7	0,0	35	15
Rcp 4	15,2	40,0	3,0	40,0	9,1	20,0	21,2	0,0	42,4	0,0	9,1	0,0	33	5
Rcp 5	13,6	23,5	13,6	38,2	0,0	0,0	50,0	35,3	9,1	2,9	13,6	0,0	22	34
Rcp 6	5,6	20,6	5,6	17,5	27,8	36,5	22,2	19,0	0,0	0,0	38,9	6,3	18	63
Rcp 7	35,2	43,0	22,2	35,4	7,4	10,1	24,1	8,9	9,3	0,0	1,9	2,5	54	79
Rcp 8	22,4	38,5	17,9	23,1	0,0	15,4	11,9	15,4	46,3	0,0	1,5	7,7	22	26
Mitjana	18,2	33,3	14,7	28,0	5,2	15,3	25,1	18,3	28,3	1,3	8,5	3,7	-	-

Taula 8.2. Resultats de segregació en espermatozoides aneuploides (disòmics i nul·lisòmics) pel cromosoma 13.

Cr. 13	Alternant (%)		Adjacent I (%)		Adjacent II (%)		3:1 (%)		4:0 (%)		Altres (%)		Total (n)	
	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.
Rcp 1	38,5	33,3	30,8	33,3	3,8	0,0	15,4	28,6	3,8	0,0	7,7	4,8	26	21
Rcp 2	16,7	42,9	13,3	21,4	3,3	14,3	41,7	21,4	3,3	0,0	21,7	0,0	60	6
Rcp 3	28,6	25,0	0,0	50,0	0,0	8,3	42,9	16,7	14,3	0,0	14,3	0,0	7	12
Rcp 4	16,7	0,0	41,7	33,3	8,3	0,0	33,3	66,7	0,0	0,0	0,0	0,0	12	3
Rcp 5	18,2	34,5	40,9	34,5	0,0	0,0	36,4	31,0	4,5	0,0	0,0	0,0	22	58
Rcp 6	0,0	10,3	0,0	8,6	0,0	27,6	100,0	50,0	0,0	0,0	0,0	3,4	1	58
Rcp 7	25,0	40,0	50,0	20,0	0,0	0,0	0,0	40,0	0,0	0,0	25,0	0,0	4	5
Rcp 8	14,3	34,5	28,6	37,9	0,0	0,0	11,9	24,1	46,3	0,0	1,5	3,4	7	29
Mitjana	21,6	26,0	24,5	27,6	2,9	8,9	33,8	35,4	4,3	0,0	12,9	2,1	-	-

Taula 8.3. Resultats de segregació en espermatozoides aneuploides (disòmics i nul·lisòmics) pel cromosoma 18.

Cr. 18	Alternant (%)		Adjacent I (%)		Adjacent II (%)		3:1 (%)		4:0 (%)		Altres (%)		Total (n)	
	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.
Rcp 1	0,0	31,3	6,7	18,8	13,3	3,1	53,3	25,0	20,0	18,8	6,7	3,1	15	32
Rcp 2	10,0	11,1	0,0	11,1	20,0	11,1	40,0	44,4	0,0	0,0	30,0	22,2	10	9
Rcp 3	10,3	9,1	6,9	18,2	3,4	18,2	27,6	36,4	27,6	0,0	24,1	18,2	29	11
Rcp 4	0,0	66,7	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	33,3	67,6	0,0	0,0	0,0	3	3
Rcp 5	7,7	20,0	7,7	20,0	23,1	0,0	38,5	60,0	7,7	0,0	15,4	0,0	13	5
Rcp 6	8,0	0,0	8,0	27,3	32,0	45,5	24,0	18,2	4,0	0,0	24,0	9,1	25	11
Rcp 7	9,5	20,0	9,5	20,0	0,0	20,0	38,1	20,0	33,3	0,0	9,5	20,0	21	5
Rcp 8	0,0	0,0	7,1	66,7	3,6	0,0	32,1	0,0	53,6	0,0	3,6	33,3	28	3
Mitjana	6,3	20,3	6,9	20,3	11,8	12,7	34,0	29,1	25,7	7,6	16,3	10,1	-	-

Taula 8.4. Resultats de segregació en espermatozoides aneuploides (disòmics i nul·lisòmics) pel cromosoma 21.

Cr. 18	Alternant (%)		Adjacent I (%)		Adjacent II (%)		3:1 (%)		4:0 (%)		Altres (%)		Total (n)	
	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.
Rcp 1	5,1	40,5	10,3	16,2	0,0	5,4	20,5	35,1	61,5	0,0	2,6	2,7	39	37
Rcp 2	12,2	14,3	7,3	28,6	9,8	28,6	51,2	28,6	2,4	0,0	17,1	0,0	41	7
Rcp 3	0,0	37,5	0,0	0,0	0,0	25,0	11,1	37,5	77,8	0,0	11,1	0,0	9	8
Rcp 4	10,0	0,0	20,0	25,0	20,0	25,0	30,0	25,0	20,0	0,0	0,0	25,0	10	4
Rcp 5	5,0	43,5	30,0	30,4	5,0	0,0	30,0	21,7	30,0	0,0	0,0	4,3	20	23
Rcp 6	0,0	10,5	20,0	5,3	20,0	15,8	40,0	68,4	0,0	0,0	20,0	0,0	5	19
Rcp 7	11,1	27,5	0,0	37,5	22,1	12,5	33,3	12,5	33,3	0,0	0,0	0,0	9	8
Rcp 8	16,7	33,3	38,9	41,7	5,6	8,3	0,0	16,7	33,3	0,0	5,6	0,0	18	12
Mitjana	8,6	32,2	15,2	21,2	7,3	10,2	29,1	33,9	32,5	0,0	7,3	2,5	-	-

8.1.2. Resultats en individus portadors de translocacions Robertsonianes

Taula 8.5. Resultats de segregació en espermatozoides aneuploides (disòmics i nul·lisòmics) pels cromosomes sexuals (X/Y).

Cr. X/Y	Alternant (%)		Adjacent (%)		3:0 (%)		Altres (%)		Total (n)	
	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.
Rob 1	30,4	81,6	30,4	18,4	30,4	0,0	8,7	0,0	23	11
Rob 2	55,6	67,6	29,6	32,4	11,1	0,0	3,7	0,0	27	37
Rob 3	64,0	75,0	24,0	22,5	12,0	0,0	0,0	2,5	25	40
Rob 4	28,6	51,4	42,9	40,0	28,6	8,6	0,0	0,0	14	35
Rob 5	43,2	61,7	44,9	37,6	9,3	0,0	2,5	0,8	118	133
Rob 6	55,8	72,3	37,2	27,7	4,7	0,0	2,3	0,0	43	47
Rob 7	35,0	43,8	52,5	50,0	10,0	6,3	2,5	0,0	40	16
Rob 8	34,1	40,0	36,6	46,7	24,4	13,3	4,9	0,0	41	15
Rob 9	22,2	66,7	57,4	30,2	11,1	1,6	9,3	1,6	54	63
Rob 10	57,8	69,4	31,1	29,0	11,1	1,6	0,0	0,0	45	62
Rob 11	39,0	79,4	41,5	17,6	17,1	0,0	2,4	2,9	41	34
Mitjana	42,3	64,3	41,2	31,8	13,2	3,0	3,4	0,8	-	-

Taula 8.6. Resultats de segregació en espermatozoides aneuploides (disòmics i nul·lisòmics) pel cromosoma 15.

Cr. 15	Alternant (%)		Adjacent (%)		3:0 (%)		Altres (%)		Total (n)	
	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.
Rob 11	28,6	100,0	33,3	0,0	28,6	0,0	0,0	0,0	14	6

Taula 8.7. Resultats de segregació en espermatozoides aneuploides (disòmics i nul·lisòmics) pel cromosoma 18.

Cr. 18	Alternant (%)		Adjacent (%)		3:0 (%)		Altres (%)		Total (n)	
	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.
Rob 1	23,1	64,3	7,7	35,7	53,8	0,0	15,4	0,0	13	2
Rob 2	0,0	85,7	0,0	14,3	50,0	0,0	50,0	0,0	2	3
Rob 3	45,5	82,6	18,2	13,0	27,3	0,0	9,1	4,3	11	6
Rob 4	10,0	57,6	40,0	42,2	40,0	0,0	10,0	0,0	10	2
Rob 5	29,4	57,4	47,1	38,3	11,8	2,1	11,8	2,1	17	35
Rob 6	33,3	50,0	44,4	50,0	11,1	0,0	11,1	0,0	9	2
Rob 7	9,1	33,3	54,5	66,7	36,4	0,0	0,0	0,0	11	6
Rob 8	16,7	50,0	75,0	50,0	8,3	0,0	0,0	0,0	12	2
Rob 9	12,5	75,0	25,0	25,0	50,0	0,0	12,5	0,0	8	16
Rob 10	12,5	100,0	75,0	0,0	0,0	0,0	12,5	0,0	8	3
Rob 11	7,4	100,0	14,8	0,0	77,8	0,0	0,0	0,0	27	2
Mitjana	18,8	64,6	35,9	31,6	37,5	3,8	7,8	0,0	-	-

Taula 8.8. Resultats de segregació en espermatozoides aneuploides (disòmics i nul·lisòmics) pel cromosoma 21.

Cr. 21	Alternant (%)		Adjacent (%)		3:0 (%)		Altres (%)		Total (n)	
	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.
Rob 1	0,0	50,0	0,0	50,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1	14
Rob 2	42,9	100,0	57,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7	7
Rob 3	33,3	76,9	33,3	23,1	33,3	0,0	0,0	0,0	3	23
Rob 4	0,0	71,4	46,2	28,6	0,0	0,0	0,0	0,0	13	33
Rob 5	0,0	60,0	37,5	40,0	62,5	0,0	0,0	0,0	8	47
Rob 6	40,0	60,0	40,0	33,3	20,0	6,7	0,0	0,0	5	15
Rob 7	21,3	83,3	39,3	16,7	37,7	0,0	1,6	0,0	61	6
Rob 8	33,3	66,7	44,4	33,3	11,1	0,0	11,1	0,0	9	12
Rob 9	28,6	55,0	28,6	40,0	42,9	0,0	0,0	5,0	7	20
Rob 10	42,9	58,3	28,6	33,3	14,3	8,3	14,3	0,0	7	12
Rob 11	28,6	36,4	28,6	63,6	42,9	0,0	0,0	0,0	7	11
Mitjana	22,7	62,0	39,1	35,0	35,9	1,5	2,3	1,5	-	-

Taula 8.9. Resultats de segregació en espermatozoides aneuploides (disòmics i nul·lisòmics) pel cromosoma 22.

Cr. 22	Alternant (%)		Adjacent (%)		3:0 (%)		Altres (%)		Total (n)	
	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.
Rob 1	20,0	0,0	40,0	100,0	40,0	0,0	0,0	0,0	5	2
Rob 2	33,3	33,3	33,3	66,7	33,3	0,0	33,3	0,0	3	1
Rob 3	0,0	50,0	0,0	16,7	100,0	33,3	1,0	0,0	13	13
Rob 4	22,2	50,0	66,7	0,0	0,0	50,0	11,1	0,0	9	14
Rob 5	50,0	71,4	0,0	28,6	0,0	0,0	50,0	0,0	2	15
Rob 6	33,3	50,0	66,7	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6	4
Rob 7	4,5	0,0	50,0	100,0	40,9	0,0	4,5	0,0	22	1
Rob 8	52,0	0,0	40,0	100,0	8,0	0,0	0,0	0,0	25	1
Rob 9	16,7	87,5	50,0	12,5	16,7	0,0	16,7	0,0	6	8
Rob 10	33,3	63,6	33,3	36,4	33,3	0,0	0,0	0,0	3	22
Mitjana	35,1	66,7	43,6	33,3	17,0	0,0	4,3	0,0	-	-

8.1.3. Resultats en l'individu portador d'una triple translocació

Taula 8.10. Resultats de segregació en espermatozoides aneuploides (disòmics i nul·lisòmics) pels cromosomes sexuals (X/Y).

Cr. X/Y	3:3 Alternant (%)		3:3 no alternant (%)		4:2 (%)		5:1 (%)		6:0 (%)		Altres (%)		Total (n)	
	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.
Tt1	10,8	13,0	29,7	45,7	16,2	32,6	2,7	4,3	5,4	0,0	35,1	4,3	37	46

Taula 8.11. Resultats de segregació en espermatozoides aneuploides (disòmics i nul·lisòmics) pel cromosoma 13.

Cr. X/Y	3:3 Alternant (%)		3:3 no alternant (%)		4:2 (%)		5:1 (%)		6:0 (%)		Altres (%)		Total (n)		
	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	
Tt1	100,0	8,3	0,0	50,0	0,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	16,7	2	12

Taula 8.12. Resultats de segregació en espermatozoides aneuploides (disòmics i nul·lisòmics) pel cromosoma 18.

Cr. 18	3:3 Alternant (%)		3:3 no alternant (%)		4:2 (%)		5:1 (%)		6:0 (%)		Altres (%)		Total (n)	
	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.
Tt1	5,6	0,0	11,1	100,0	0,0	0,0	22,1	0,0	0,0	0,0	61,1	0,0	18	1

Taula 8.13. Resultats de segregació en espermatozoides aneuploides (disòmics i nul·lisòmics) pel cromosoma 21.

Cr.21	3:3 Alternant (%)		3:3 no alternant (%)		4:2 (%)		5:1 (%)		6:0 (%)		Altres (%)		Total (n)	
	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.	Dis.	Nul.
Tt1	0,0	0,0	33,3	30,0	33,3	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	40,0	3	10

8.2. Dades de posicionament cromosòmic en nuclis amb diferents genotips

8.2.1. Valors de posicionament de cada cromosoma

Taula 8.14. Valors de posicionament del cromosoma X en l'eix longitudinal (0-2; basal-medial-apical) i l'eix radial (0-1; centre-perifèria), en cadascun dels nuclis analitzats de cada genotip.

Hapl. X		Dis. XY		Dis. 18 (X)		Dipl. XY		Dipl. XX	
L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1,31	0,45	1,37	0,56	0,94	0,54	0,97	0,66	0,23	0,95
0,54	0,51	0,91	0,25	-	-	1,09	0,24	0,28	1,00
1,04	0,37	1,79	0,96	-	-	0,68	0,37	-	-
0,58	0,44	1,17	0,39	-	-	-	-	-	-
1,08	0,58	0,75	0,25	-	-	-	-	-	-
0,6	0,48	1,3	0,53	-	-	-	-	-	-
0,95	0,21	1,09	0,31	-	-	-	-	-	-
1,12	0,89	1,24	0,53	-	-	-	-	-	-
1,03	0,39	0,39	0,64	-	-	-	-	-	-
0,76	0,65	-	-	-	-	-	-	-	-

L, mitjana dels valors en l'eix longitudinal; R, mitjana dels valors en l'eix radial.

Taula 8.15. Valors de posicionament del cromosoma Y en l'eix longitudinal (0-2; basal-medial-apical) i l'eix radial (0-1; centre-perifèria), en cadascun dels nuclis analitzats de cada genotip.

Hapl. X		Dis. XY		Dis. 18 (Y)		Dipl. XY	
L	R	L	R	L	R	L	R
0,74	0,75	1,72	0,75	1,61	0,68	1,47	0,89
0,50	0,59	1,15	0,36	-	-	0,94	0,35
0,46	0,61	1,01	0,46	-	-	0,93	0,23
1,04	0,85	1,24	0,5	-	-	-	-
0,83	0,36	1,11	0,54	-	-	-	-
0,84	0,65	1,36	0,44	-	-	-	-
1,29	0,37	1,40	0,47	-	-	-	-
1,29	0,46	1,08	0,46	-	-	-	-
1,31	0,49	0,71	0,45	-	-	-	-
0,67	0,47	-	-	-	-	-	-

L, mitjana del valor en l'eix longitudinal; R, mitjana del valor en l'eix radial.

Taula 8.16. Valors de posicionament del cromosoma 6 en l'eix longitudinal (0-2; basal-medial-apical) i l'eix radial (0-1; centre-perifèria), en cadascun dels nuclis analitzats de cada genotip.

Hapl. X		Hapl. Y		Dis. XY		Nul. XY		Dis. 18 (X)		Dis. 18 (Y)		Dipl. XY		Dipl. XX	
L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
0,76	1,00	1,54	0,70	0,25	0,82	0,51	0,82	1,45	1,00	1,87	1,00	0,69	0,72	1,18	0,99
0,65	0,84	1,03	0,99	0,01	1,00	1,67	1,00	-	-	-	-	1,84	0,99	1,37	0,72
1,38	0,91	0,85	0,48	1,04	0,72	0,76	0,83	-	-	-	-	0,04	1,00	-	-
1,30	0,34	0,69	0,57	1,05	0,34	1,29	0,8	-	-	-	-	0,60	1,00	-	-
1,23	0,52	1,22	0,60	1,69	0,77	-	-	-	-	-	-	1,77	0,84	-	-
1,82	0,95	0,21	0,80	1,04	0,33	-	-	-	-	-	-	0,85	1,00	-	-
1,57	0,88	0,86	0,34	0,3	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,84	0,55	1,36	0,49	0,74	0,68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,96	0,55	1,38	0,51	0,74	0,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,06	0,59	0,67	0,55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L, mitjana del valor en l'eix longitudinal; R, mitjana del valor en l'eix radial.

Taula 8.17. Valors de posicionament del cromosoma 8 en l'eix longitudinal (0-2; basal-medial-apical) i l'eix radial (0-1; centre-perifèria), en cadascun dels nuclis analitzats de cada genotip.

Hapl. X		Hapl. Y		Dis. XY		Nul. XY		Dis. 18 (X)		Dis. 18 (Y)		Dipl. XY		Dipl. XX	
L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1,18	0,70	0,52	0,54	0,76	0,95	0,45	0,83	1,38	0,82	0,38	0,76	0,48	0,70	1,08	0,46
0,03	0,98	0,73	0,70	1,60	0,61	0,49	0,76	-	-	-	-	1,25	0,75	0,26	0,85
0,62	0,53	0,8	0,79	0,74	0,42	1,41	0,86	-	-	-	-	0,72	0,34	-	-
0,51	0,50	1,22	0,49	1,21	0,68	0,62	0,42	-	-	-	-	1,49	0,90	-	-
0,93	1,00	1,25	0,38	0,57	0,42	-	-	-	-	-	-	1,31	0,84	-	-
1,00	0,78	1,53	0,79	1,17	0,68	-	-	-	-	-	-	0,22	1,00	-	-
1,21	0,24	1,18	0,61	1,22	0,82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,85	1,00	0,77	0,69	1,22	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,11	0,86	0,85	0,68	1,10	0,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,71	0,35	1,24	0,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L, mitjana del valor en l'eix longitudinal; R, mitjana del valor en l'eix radial.

Taula 8.18. Valors de posicionament del cromosoma 9 en l'eix longitudinal (0-2; basal-medial-apical) i l'eix radial (0-1; centre-perifèria), en cadascun dels nuclis analitzats de cada genotip.

Hapl. X		Hapl. Y		Dis. XY		Nul. XY		Dis. 18 (X)		Dis. 18 (Y)		Dipl. XY		Dipl. XX	
L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
1,53	0,61	0,86	0,58	1,24	0,44	0,51	0,65	1,00	0,48	1,13	0,23	1,34	0,68	0,82	0,30
0,93	0,59	1,38	0,64	0,07	0,33	1,67	0,83	-	-	-	-	0,35	0,97	0,79	0,38
1,26	0,55	0,52	0,59	1,39	0,6	0,76	0,51	-	-	-	-	0,67	0,34	-	-
0,59	0,45	0,81	0,64	1,43	0,76	1,29	0,45	-	-	-	-	1,3	0,65	-	-
1,66	1,00	1,4	0,53	1,39	0,87	-	-	-	-	-	-	1,05	0,45	-	-
1,59	1,00	1,12	0,17	0,95	0,08	-	-	-	-	-	-	1,21	0,64	-	-
0,97	0,55	1,35	0,36	0,66	0,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,18	0,22	0,61	0,42	0,59	0,85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,51	1,18	0,63	0,44	1,03	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,22	0,48	1,07	0,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L, mitjana del valor en l'eix longitudinal; R, mitjana del valor en l'eix radial.

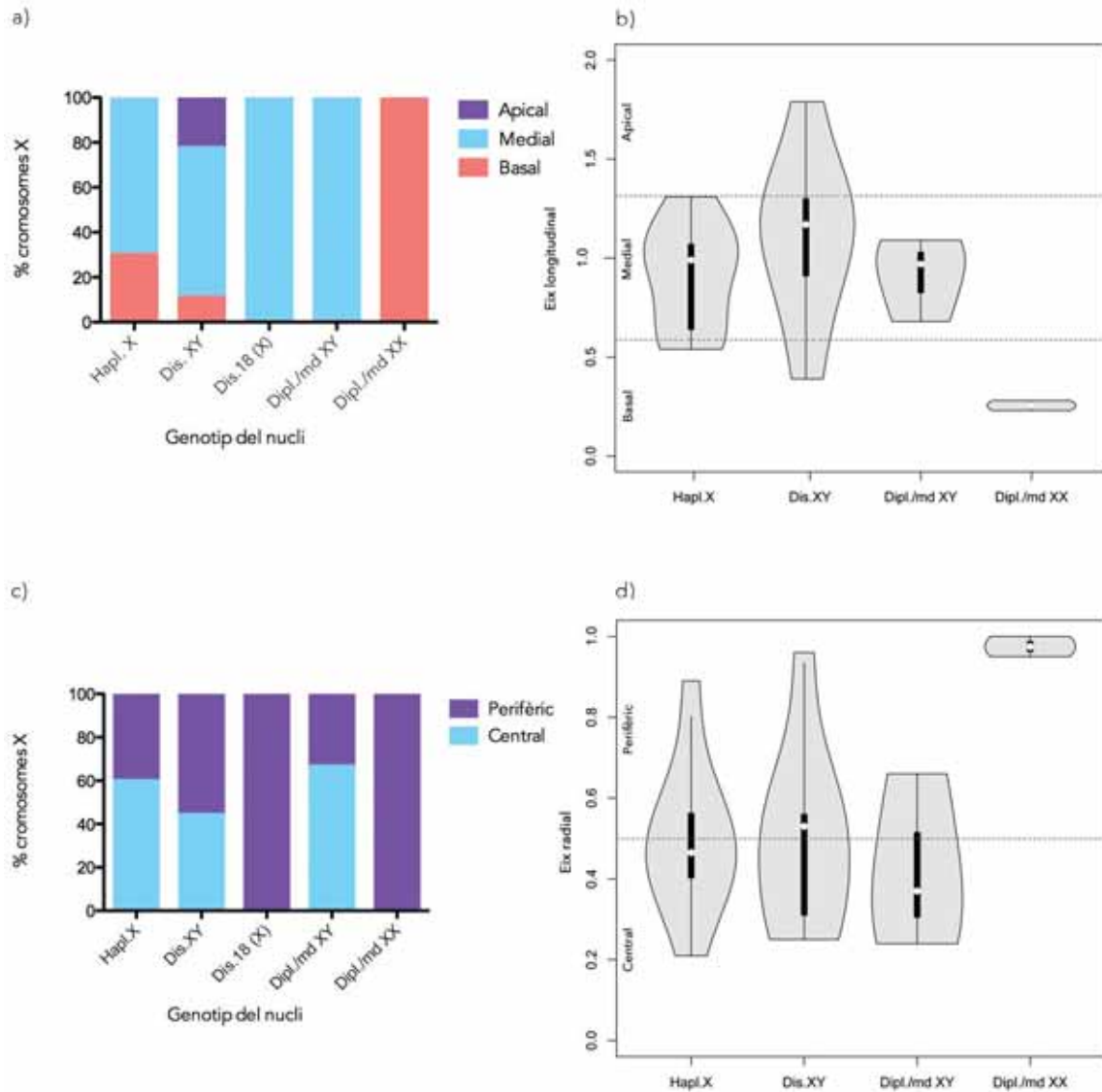
Taula 8.19. Valors de posicionament del cromosoma 18 en l'eix longitudinal i l'eix radial, en cadascun dels nuclis analitzats de cada genotip.

Hapl. X		Hapl. Y		Dis. XY		Nul. XY		Dis. 18 (X)		Dis. 18 (Y)		Dipl. XY		Dipl. XX	
L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
0,62	0,03	0,91	0,70	0,47	0,6	1,52	0,63	1,20	0,33	0,65	0,52	1,14	0,44	1,08	0,36
0,52	0,49	0,62	0,45	0,47	1,02	0,47	0,75	1,31	0,85	1,11	0,57	0,62	0,61	0,26	0,44
1,41	0,48	1,05	0,65	0,81	0,67	1,46	0,78	-	-	-	-	0,56	0,48	-	-
0,51	0,87	1,08	0,76	1,26	0,83	1,23	0,30	-	-	-	-	1,11	1,00	-	-
0,62	0,38	0,95	0,51	0,47	0,62	-	-	-	-	-	-	1,32	0,51	-	-
0,88	0,42	1,69	0,67	0,88	0,22	-	-	-	-	-	-	1,27	0,79	-	-
1,74	0,94	1,07	0,35	1,32	0,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,20	0,25	0,50	0,51	0,71	0,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,90	0,67	0,50	0,53	1,12	0,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,36	0,55	1,27	0,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L, mitjana del valor en l'eix longitudinal; R, mitjana del valor en l'eix radial.

8.2.2. Representacions gràfiques del posicionament de cada cromosoma en els diferents genotips

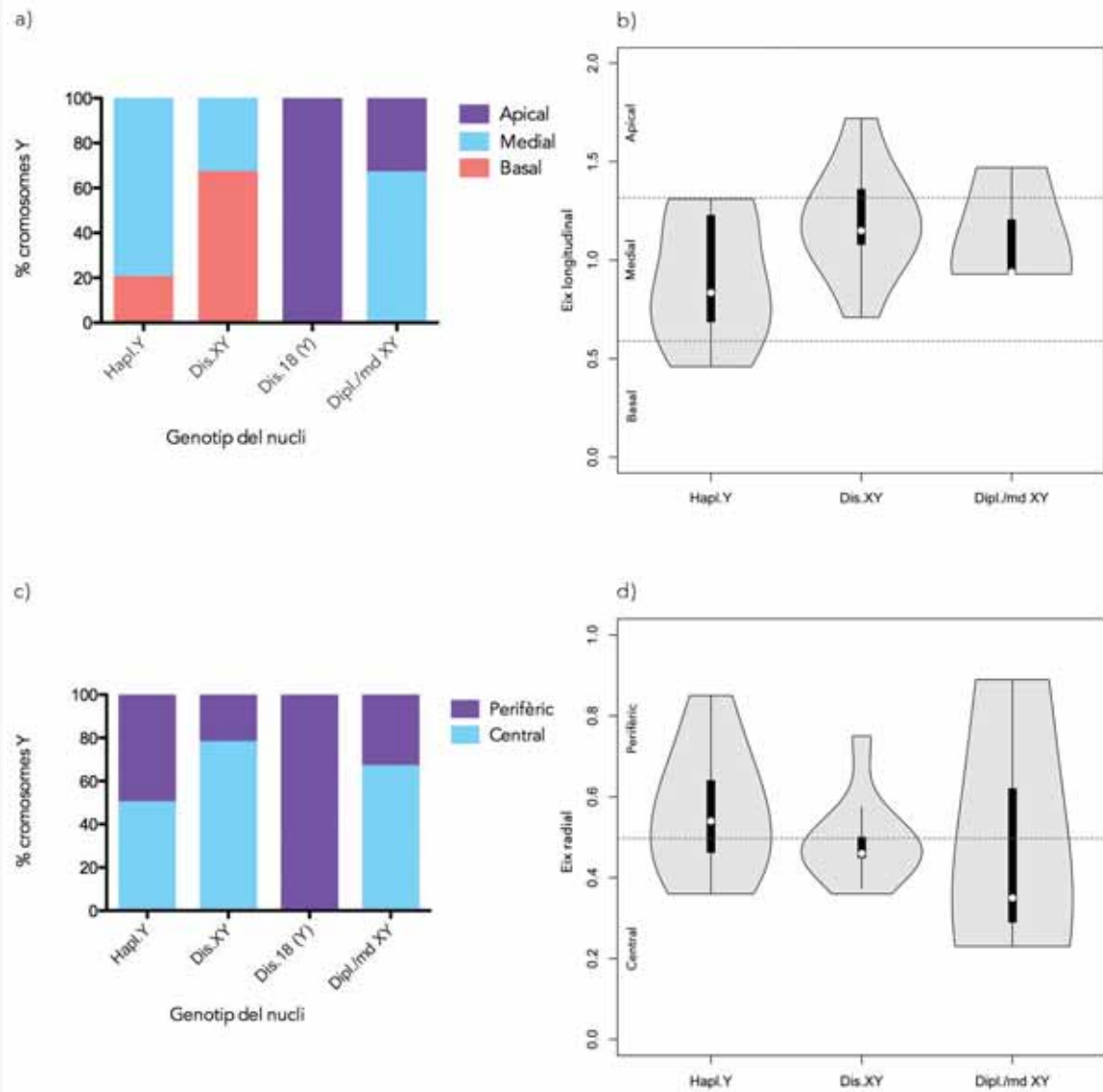
Figura 8.1. Dades de posicionament del cromosoma X.



a) Histograma amb la classificació dels senyals en les categories de l'eix longitudinal. b) Gràfic de violí amb la distribució dels senyals en l'eix longitudinal. b). c) Histograma amb la classificació dels senyals en les categories de l'eix radial. d) Gràfic de violí amb la distribució dels senyals en l'eix radial.

El nucli Dis. 18 (X) no s'ha pogut incorporar en els gràfics de violí perquè aquest tipus de representació de les dades necessita un mínim de dos valors.

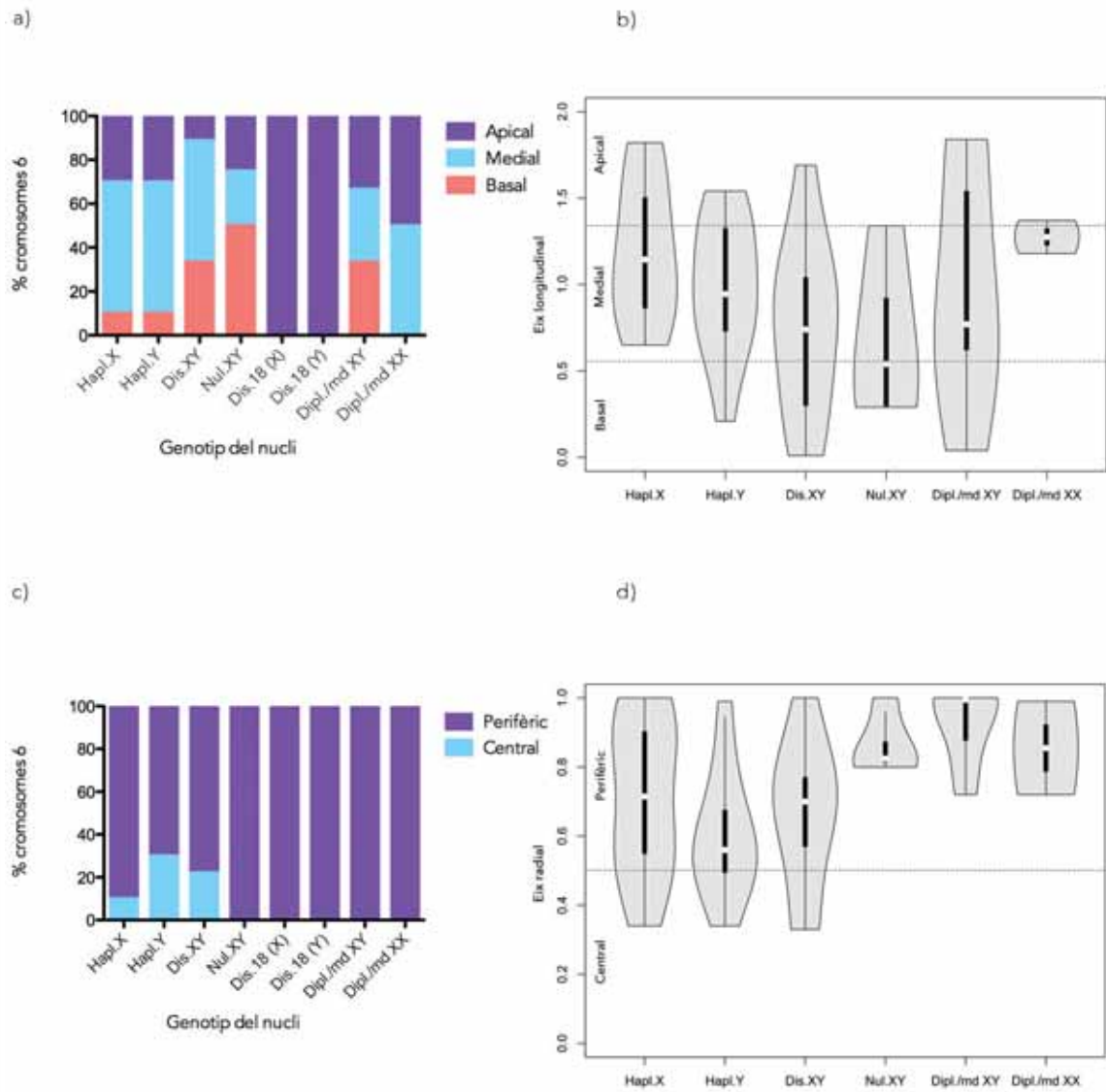
Figura 8.2. Dades de posicionament del cromosoma Y.



a) Histograma amb la classificació dels senyals en les categories de l'eix longitudinal. b) Gràfic de violí amb la distribució dels senyals en l'eix longitudinal. b). c) Histograma amb la classificació dels senyals en les categories de l'eix radial. d) Gràfic de violí amb la distribució dels senyals en l'eix radial.

El nucli Dis. 18 (Y) no s'ha pogut incorporar en els gràfics de violí perquè aquest tipus de representació de les dades necessita un mínim de dos valors.

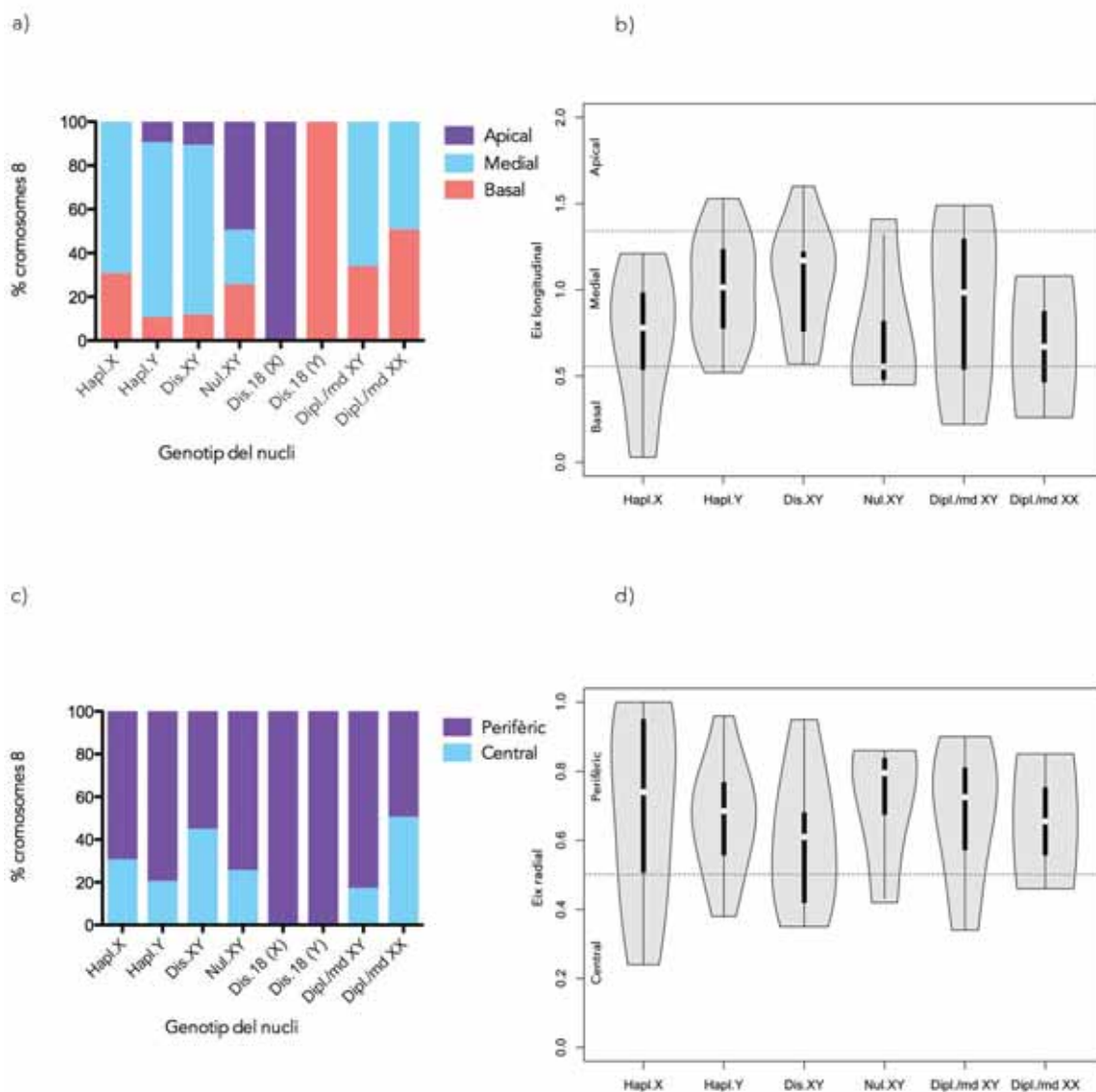
Figura 8.3. Dades de posicionament del cromosoma 6.



a) Histograma amb la classificació dels senyals en les categories de l'eix longitudinal. b) Gràfic de violí amb la distribució dels senyals en l'eix longitudinal. b). c) Histograma amb la classificació dels senyals en les categories de l'eix radial. d) Gràfic de violí amb la distribució dels senyals en l'eix radial.

Els nuclis Dis. 18 (X) i Dis. 18 (Y) no s'ha pogut incorporar en els gràfics de violí perquè aquest tipus de representació de les dades necessita un mínim de dos valors.

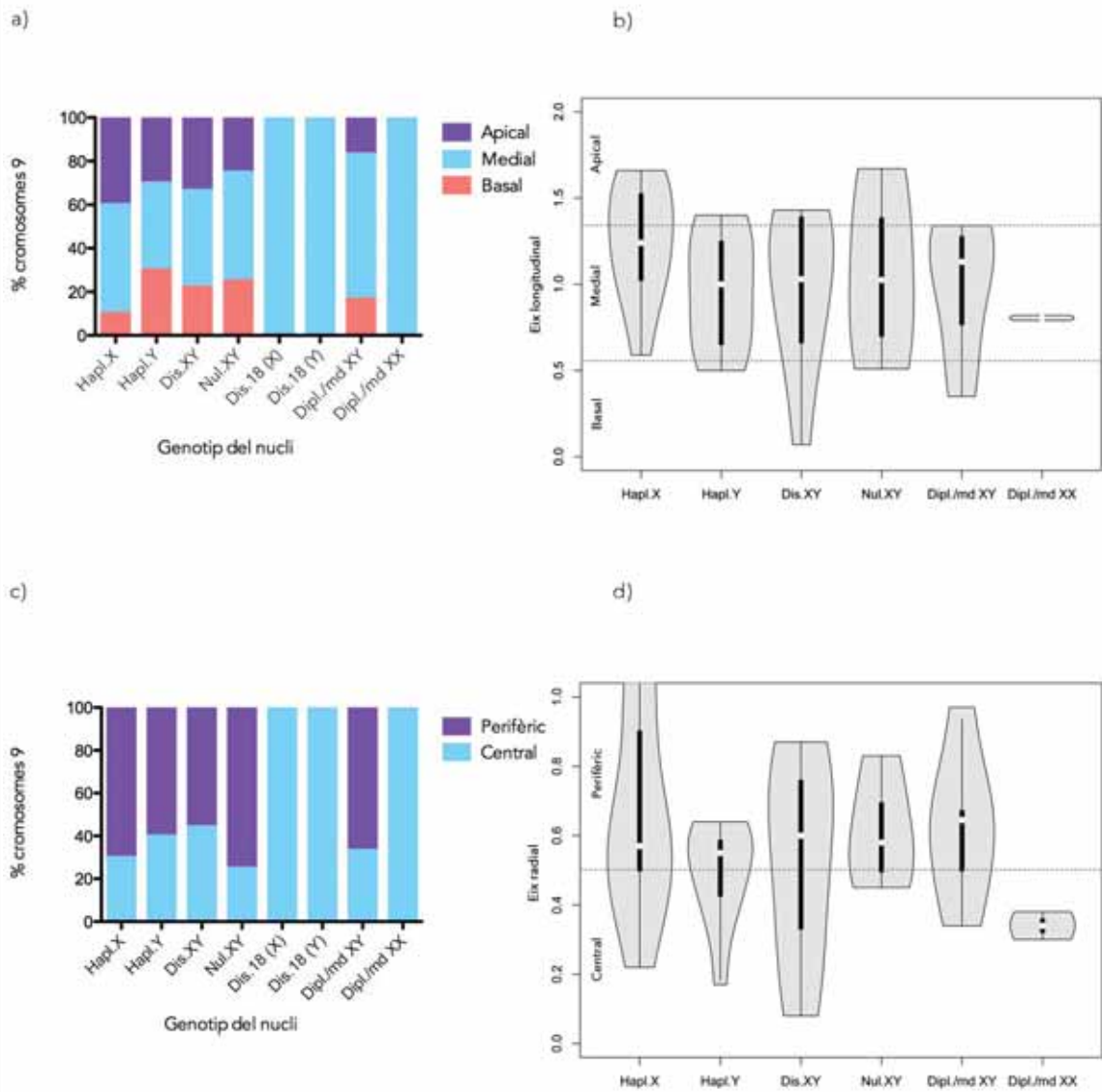
Figura 8.4. Dades de posicionament del cromosoma 8.



a) Histograma amb la classificació dels senyals en les categories de l'eix longitudinal. b) Gràfic de violí amb la distribució dels senyals en l'eix longitudinal. c) Histograma amb la classificació dels senyals en les categories de l'eix radial. d) Gràfic de violí amb la distribució dels senyals en l'eix radial.

Els nuclis Dis. 18 (X) i Dis. 18 (Y) no s'ha pogut incorporar en els gràfics de violí perquè aquest tipus de representació de les dades necessita un mínim de dos valors.

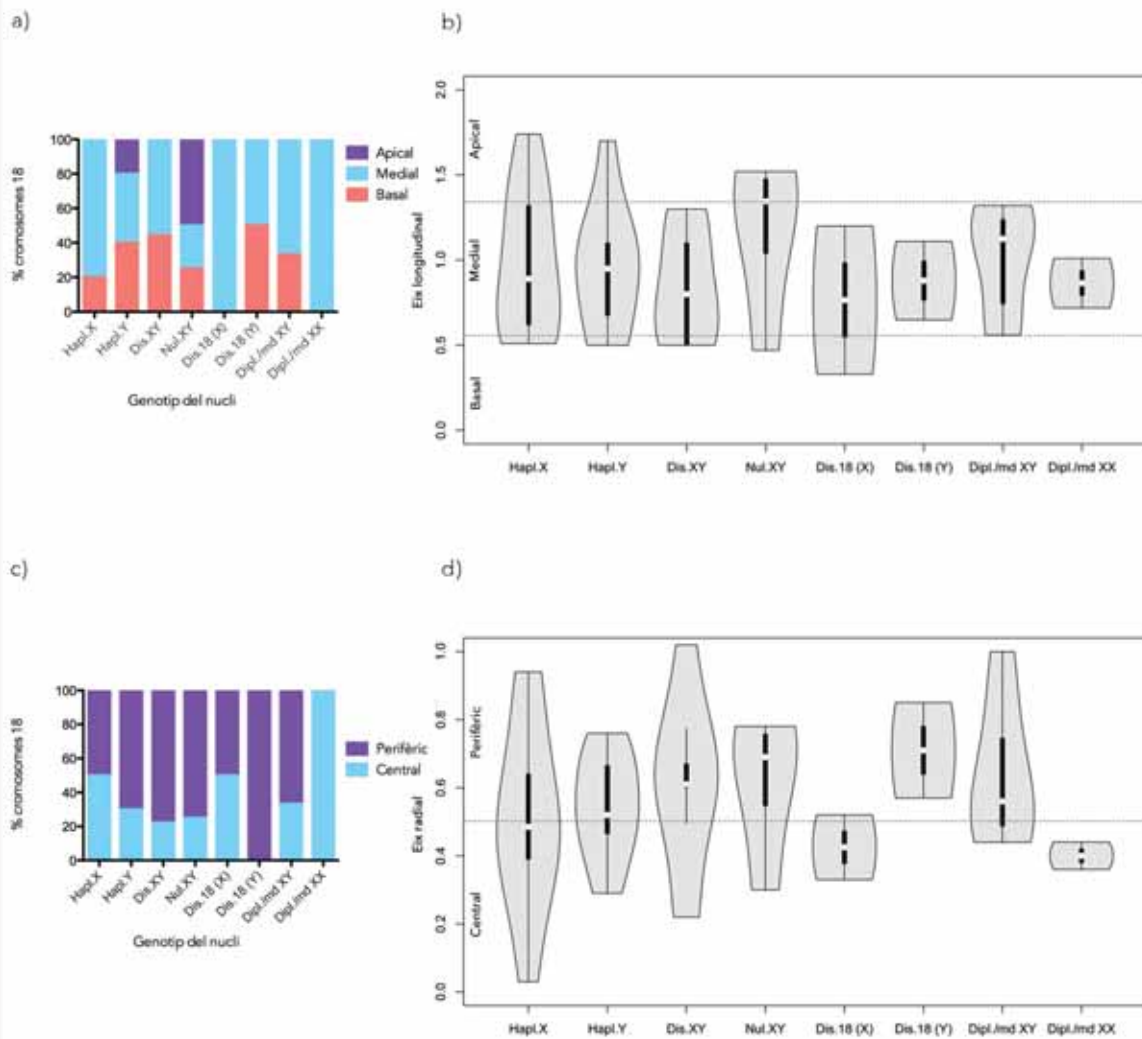
Figura 8.5. Dades de posicionament del cromosoma 9.



a) Histograma amb la classificació dels senyals en les categories de l'eix longitudinal. b) Gràfic de violí amb la distribució dels senyals en l'eix longitudinal. b. c) Histograma amb la classificació dels senyals en les categories de l'eix radial. d) Gràfic de violí amb la distribució dels senyals en l'eix radial.

Els nuclis Dis. 18 (X) i Dis. 18 (Y) no s'ha pogut incorporar en els gràfics de violí perquè aquest tipus de representació de les dades necessita un mínim de dos valors.

Figura 8.6. Dades de posicionament del cromosoma 18.



a) Histograma amb la classificació dels senyals en les categories de l'eix longitudinal. b) Gràfic de violí amb la distribució dels senyals en l'eix longitudinal. b). c) Histograma amb la classificació dels senyals en les categories de l'eix radial. d) Gràfic de violí amb la distribució dels senyals en l'eix radial.

Agraïments

En primer lloc voldria agrair als meus directors de tesi Ester Anton, Joan Blanco i Fanny Vidal haver-me donat l'oportunitat d'iniciar un projecte de recerca amb vosaltres, per l'atenció constant al llarg de la tesi i els bons consells que m'heu donat. He après moltes coses, però sobretot el rigor i constància en el treball. També que en tot, sempre hi ha marge de millora, i que cal saber transmetre exactament el que es vol dir en cada situació.

També voldria agrair a la resta d'integrants del grup: Zaida, Laia, Mireia i Albert amb qui he compartit molts moments, ja sigui treballant junts al laboratori o aportant idees a les reunions de grup. També vull mencionar als ex-membres del grup com l'Òscar i la Lydia, qui em van ensenyar el funcionament del laboratori i em responien qualsevol pregunta, per irrellevant que fos. En especial, vull destacar el suport de la Lydia i la Laia, que m'han ofert una gran amistat i confiança en elles, a més de les confidències compartides en les llargues hores a la sala de microscopis.

Als companys doctorants de la Unitat de Biologia Cel·lular, amb els que hem compartit molts moments de diversió tant a la Unitat com fóra d'ella, ja sigui en sopars o festes múltiples: Joan, Andreu, Laia V, Mireia B, Marta, Anna M, Laia P, Mireia S, Teresa, Inma, Albert, Dani, Toni, Tània i Aina. Vull destacar els dinars i cafès al solet compartits amb la Laia V, Anna M, Mireia B, Mireia S i Marta. És una pausa molt agradable en les quals sempre em feu riure en algun moment, i molts dies és necessària per desestressar-nos una mica abans de tornar a la feina.

A les meves companyes de despatx Teresa, Mireia S i Inma pel suport moral, especialment durant la redacció de la tesi, però també vull recordar als ex-companys de despatx amb qui també he compartit moltíssimes hores: Nuno, Sergi i Laia H.

La resta de la persones de la Unitat, que a part de compartir espais de treball també hem compartit esdeveniments lúdics com esquíades, bicicletades o jornades de tasts: Carme, Leo, Elena, Josep, Anna, Montse, Laura, Mariona, Marta, Nerea, Jorge, Jonatan, David, Maria Jesús i Sílvia.

També vull agrair a la meva família, Mercè, Lluís i Lluís, que sempre estan pendents de mi, però m'han permès fer el que creia més adient en cada situació. Als meus avis Narcís i Rosa que sempre es preocupen per mi, i sobretot perquè mengi bé, i em preparen el dinar del

dilluns des de fa més de 10 anys. A la iaia Goya que fem el que fem, sempre està orgullosa dels seus néts i quan té la oportunitat, ens cuida tot el que pot.

No hi ha prou paraules per agrair a l'Arnau. Amb la seva enorme generositat sempre ha fet el possible per ajudar-me en tot, ha fet el que calgui donar-me ànims sempre que ho he necessitat, i tot perquè no se m'esborri el somriure, encara que sigui anteposant les meves necessitats a les seves. És el millor company de vida que podia haver trobat. En tot això segur que hi tenen a veure la Lurdes, l'Eduard i l'Agnès, que em tracten i cuiden com si fos de la família.

També vull mencionar a la Noelia i l'Erika, amb qui vaig compartir pis quasi tots els anys d'universitat, que em van transmetre les seves ganes de saber i vam compartir moltes hores de pràctiques, estudi, esforç i dedicació a la Biologia Humana; a més de construir una amistat que tot i la llunyania no es perd.

Tot i haver passat uns quants anys, sembla que fos ahir que vaig arribar la Unitat de Biologia Cel·lular. Ha estat una experiència molt completa amb etapes ben diferents que de segur m'han enriquit com a persona: des d'iniciar experiments al laboratori, posar a punt protocols, barallar-te amb l'estadística, preparar presentacions o anar a congressos. Durant aquestes etapes també he viscut sentiments molt diferents: impaciència a l'espera un resultat, il·lusió de veure una hibridació que ha sortit bé, decepció quan al cap de molts intents encara no ha sortit bé, desesperació quan després de molts mesos no surt el que esperaves, els nervis de fer una presentació en un congrés, la por de les preguntes que et poden fer o l'alegria de veure el primer article publicat, i finalment, la satisfacció d'haver acabat la tesi.

Moltes gràcies a tots.

Anna.

Universitat Autònoma de Barcelona

Genetics
of Male
Fertility

