

**DETECCIÓ I INCIDÈNCIA D'ANOMALIES  
CROMOSÒMIQUES EN ESPERMATOZOIDES  
HUMANS**

**Tesi Doctoral**

**Joan Blanco Rodríguez**

# ÍNDEX

---

<b>Pròleg</b> .....	ix
<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Reproducció i anomalies cromosòmiques</b> .....	3
<b>1.2. Origen parental dels cromosomes afectats</b> .....	5
<b>1.3. Etiologia de la no disjunció</b> .....	6
<b>1.4. Anàlisi citogenètica de les gàmetes</b> .....	8
<b>1.4.1. L'oòcit</b> .....	8
<b>1.4.2. L'espermatozoide</b> .....	9
<b>1.4.2.1. Tinció cromosòmica diferencial</b> .....	10
<b>1.4.2.2. Cromosomes d'espermatozoide</b> .....	11
<b>1.4.2.3. Hibridació <i>in situ</i></b> .....	11
<b>1.5. FISH en espermatozoides: estat de la qüestió 1990-1994</b> .....	13
<b>1.6. Aplicacions actuals de la FISH en espermatozoides i perspectives de futur</b> .....	16
<b>1.6.1. Determinació del nivell basal d'anomalies cromosòmiques numèriques</b> .....	17
<b>1.6.2. Estudis d'incidència en individus de risc</b> .....	17
<b>1.6.2.1. Poblacions d'elevada prevalència per a una anomalia cromosòmica</b> .....	17
<b>1.6.2.2. L'efecte intercromosòmic en portadors de reorganitzacions estructurals</b> .....	18
<b>1.6.2.3. Individus amb problemes de fertilitat</b> .....	19

1.6.3. Segregació meiòtica dels cromosomes reorganitzats	20
1.6.3.1. Individus portadors d'anomalies cromosòmiques estructurals	20
1.6.3.2. Individus amb anomalies numèriques dels cromosomes sexuals	21
<b>2. OBJECTIUS</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>27</b>
3.1. Mostres biològiques	29
3.1.1. Mostres de semen	29
3.1.2. Biòpsies testiculars	30
3.2. Fixació i emmagatzematge del material	30
3.2.1. Material utilitzat	30
3.2.2. Mètode aplicat	30
3.2.2.1. Mostres de semen	30
3.2.2.2. Biòpsies testiculars	31
3.3. Descondensació de la cromatina dels espermatozoides	32
3.3.1. Material utilitzat	32
3.3.2. Mètode aplicat	33
3.4. Protocol d'hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH)	34
3.4.1. Material utilitzat	34
3.4.2. Mètode aplicat	34
3.5. Valoració microscòpica	36
3.5.1. Material utilitzat	36

3.5.2. Mètode aplicat.....	36
3.5.2.1. Mostres de semen.....	36
3.5.2.2. Biòpsies testiculars.....	38
3.6. Recopilació i anàlisi estadística dels resultats.....	43
<b>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....</b>	<b>45</b>
4.1. Objectius assolits.....	47
4.2. Articles.....	48
4.2.1. Article 1.....	48
<i>Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization</i>	
4.2.2. Article 2.....	55
<i>Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XYY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH)</i>	
4.2.3. Article 3.....	61
<i>Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in a population with a high prevalence of Down syndrome: increased incidence in cases of paternal origin</i>	
4.2.4. Article 4.....	69
<i>FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and inter-chromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carriers, t(5;8)(q33;q13)</i>	
4.2.5. Article 5.....	77
<i>Interchromosomal effects in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei</i>	

4.2.6. Article 6.....	99
<i>Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (XXY, mosaic XY/XXY and XYY) assessed by FISH</i>	
4.2.7. Article 7.....	119
<i>Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH)</i>	
<b>5. DISCUSSIÓ GENERAL.....</b>	<b>133</b>
5.1. Avantatges, limitacions i aspectes tècnics de la FISH en l'estudi citogenètic de l'espermatozoide humà.....	135
5.1.1. Avantatges de la tècnica.....	135
5.1.2. Limitacions de la tècnica.....	135
5.1.3. Aspectes tècnics.....	136
5.2. Freqüència basal d'aneuploïdies en espermatozoides humans.....	141
5.2.1. Diferències entre cromosomes.....	141
5.2.2. Relació entre disomies en espermatozoides i trisomies d'origen patern.....	143
5.2.3. Freqüència total d'aneuploïdies en espermatozoides humans.....	145
5.3. Incidència de disomies 21 en pares d'individus amb la Síndrome de Down d'origen patern.....	147
5.4. Segregació dels cromosomes reorganitzats en individus portadors d'anomalies estructurals.....	148
5.5. L'efecte intercromosòmic.....	153

---

<b>5.6. Segregació dels cromosomes sexuals en individus portadors de gonosomopaties</b> .....	155
<b>5.6.1. Individus amb la síndrome de Klinefelter</b> .....	156
<b>5.6.2. Individus amb cariotip 47,XY</b> .....	157
<b>5.7. Aplicacions clíniques</b> .....	158
<b>6. CONCLUSIONS</b> .....	<b>161</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>165</b>

## Pròleg

Atès que la normativa de presentació de treballs de Tesi Doctoral ho permet i, després de l'avaluació favorable per part de la comissió de doctorat de la UAB, hem optat per a la presentació d'aquesta tesi en forma de compendi de publicacions, sobretot tenint en compte que el model clàssic moltes vegades implica reescriure els continguts d'aquests mateixos treballs.

Tot i això, els requeriments necessaris per publicar un treball en una revista científica (estructura i contingut), de vegades són diferents als requeriments necessaris per escriure una tesi doctoral. Aquestes diferències poden portar a dues situacions conflictives: la dificultat d'estructurar un treball de tesi amb entitat pròpia i la repetició d'informació. En aquest sentit, l'estructura general d'aquesta tesi pretén vertebrar les publicacions realitzades al voltant d'un eix en comú; l'estudi citogenètic dels espermatozoides humans.

La **introducció general** revisa els tipus, l'origen i la incidència d'anomalies cromosòmiques en humans, així com les possibilitats d'estudi que van aparèixer arran la consolidació de la hibridació *in situ* fluorescent, aplicada sobre nuclis d'espermatozoides descondensats. El capítol de **material i mètodes** recull els materials utilitzats, els mètodes aplicats i els protocols generals seguits en aquest treball de recerca. El capítol de **resultats i discussió** es divideix en dos apartats diferents. El primer, on es detallen els treballs publicats que fan referència a cadascun dels objectius assolits (en alguns casos un mateix article pot resultar en l'acompliment d'objectius diferents), i el segon, que especifica els treballs publicats. La **discussió general** pretén relacionar els nostres resultats amb altres publicats per altres investigadors, per intentar arribar a una conclusió per a cadascuna de les línies de recerca estudiades.

Respecte la repetició d'informació, hem intentat reduir-la al mínim, tot i que de vegades ha estat inevitable a fi efecte de donar continuïtat i entitat a les diferents parts d'aquest treball.



# **1. INTRODUCCIÓ**

## 1.1. Reproducció i anomalies cromosòmiques

Qualsevol modificació en el nombre o en l'estructura dels cromosomes constitueix el que coneixem amb el nom de variant o anomalia cromosòmica. Les anomalies numèriques s'originen principalment *de novo*, com a resultat d'errors de segregació dels cromosomes durant el procés de gametogènesi dels progenitors. En humans, parlem d'euploïdia en aquells casos on l'anàlisi revela un nombre de cromosomes múltiple de quaranta-sis (hipoploïdies i poliploïdies), i parlem d'aneuploïdies quan el nombre de cromosomes no és múltiple exacte del nombre cromosòmic haploide (trisomies i monosomies).

Per contra, les anomalies estructurals són majoritàriament heretades d'un dels progenitors, portador d'una variant cromosòmica en equilibri, és a dir, en que no hi ha ni pèrdua ni guany de DNA, i que no solen tenir cap efecte fenotípic sobre l'individu portador, si bé de vegades causen diferents graus d'infertilitat. No obstant això, en molts casos afecten la seva descendència, com a resultat de la producció de gàmetes amb desequilibris cromosòmics. Les variants estructurals inclouen les translocacions Robertsonianes i recíproques, les inversions paracèntriques i pericèntriques i les insercions; són anomalies les duplicacions i les deficiències.

La reproducció en l'espècie humana dona lloc a una incidència molt elevada d'embrions cromosòmicament anormals. Jacobs (1992) estimà que el 8% de tots els embarassos clínicament reconeguts presenten algun tipus d'anomalia cromosòmica (Taula 1, pàgina 4). L'autora realitzà aquesta estimació tenint en compte un 15% d'avortaments espontanis i un 1% de morts perinatals. Ara bé, diversos investigadors defensen que aquest percentatge ha de ser superior si es tenen en compte les primeres etapes del desenvolupament embrionari. En aquest sentit, Edwards (1986) estimà que el percentatge d'avortaments espontanis durant aquest període s'incrementa fins el 60% (quatre vegades més). A més, en l'etapa peri-implantacional, la freqüència estimada d'anomalies cromosòmiques és aproximadament dues vegades superior (85%, Bulletti *et al.* 1996) a la freqüència observada en avortaments espontanis (48%, Jacobs 1992).

Tot plegat suggereix que, si tenim en compte l'etapa peri-implantacional, la incidència d'anomalies cromosòmiques en l'espècie humana és molt superior al 8%. De fet, el percentatge d'anomalies numèriques detectat en embrions humans provinents de cicles de diagnòstic genètic preimplantacional, assoleix valors mínims aproximats del 20% (Munné *et al.* 1994; Pellicer *et al.* 1999).

La taula 1 presenta la distribució de les anomalies cromosòmiques més freqüents en diferents tipus de poblacions. Es pot observar clarament com en tots els casos hi ha una davallada considerable a mesura que la població analitzada s'apropa al moment del naixement. Així, mentre que en avortaments espontanis les anomalies cromosòmiques hi són presents en un 48% dels casos, només afecten a un 5,65% de les morts perinatals i a un 0,93% dels nounats, posant de manifest la forta selecció contra els embrions cromosòmicament desequilibrats que té lloc durant el desenvolupament embrionari.

	Avortaments espontanis	Mort perinatal	Nascuts vius	Embarassos reconeguts*
<b>Trisomies</b>	26,8	3,8	0,30	4,31
<b>Monosomies</b>	8,6	0,25	<0,01	1,30
<b>Poliploidies</b>	9,9	0,6	-	1,48
<b>Estructurals</b>	2	0,4	0,6	0,81
<b>Altres</b>	0,7	0,6	0,02	0,15
<b>Total</b>	48	5,65	0,93	8

\*Considerant un 15% d'avortaments espontanis i un 1% de morts perinatals

**Taula 1:** Anomalies cromosòmiques (%) en diferents tipus de poblacions (Adaptat de Jacobs 1992).

D'altra banda, les trisomies i les poliploidies són en qualsevol cas, les anomalies més freqüents (Taula 1). Tenint en compte el seu origen meiòtic, això vol dir que la gametogènesi origina una gran quantitat de gàmetes portadores d'anomalies cromosòmiques numèriques.

Les greus conseqüències que provoquen la presència d'anomalies cromosòmiques en humans: avortaments, mortalitat, malformacions congènites, discapacitat psíquica, infertilitat, entre d'altres, posa de manifest la importància de realitzar estudis per tal d'aprofundir en el coneixement de l'origen, incidència i mecanismes implicats en aquesta problemàtica.

## **1.2. Origen parental dels cromosomes afectats**

Les anomalies estructurals són heretades en un 80% dels casos (Jacobs 1992), la resta s'originen *de novo*, ja sigui per trencament i reparació del DNA en l'etapa d'espermatogoni (Templado *et al.* 1984), o bé per trencament del DNA en l'etapa d'espermàtide o espermatozoide i posterior reparació parcial a l'oòcit (Genescà *et al.* 1992).

Exceptuant les translocacions Robertsonianes, les quals són majoritàriament d'origen matern (65%), les anomalies estructurals *de novo* s'originen per errors durant l'espermatogènesi. Olson i Magenis (1988) analitzant heteromorfismes cromosòmics xifren aquest percentatge en un 84%.

Pel que fa a les anomalies numèriques, el desenvolupament de tècniques d'anàlisi molecular ha permès identificar marcadors de DNA altament polimòrfics i, en conseqüència, determinar l'origen parental i meiòtic dels cromosomes implicats. La taula 2 (pàgina 6) presenta un recull dels darrers resultats publicats. Podem observar que les trisomies presenten una marcada variabilitat pel que fa a l'origen parental del cromosoma extra. En general, les que afecten els autosomes són d'origen matern, majoritàriament per errors que es donen durant la primera divisió meiòtica (revisat per Nicolaidis i Petersen 1998). En canvi, aquelles que impliquen els cromosomes sexuals són majoritàriament d'origen patern (May *et al.* 1990; MacDonald *et al.* 1994).

	% en ER*	Origen meiótic matern	Origen meiótic patern	Origen mitòtic
<b>Trisomia 13</b>	0,18	88	12	-
<b>Trisomia 16</b>	1,13	100	-	-
<b>Trisomia 18</b>	0,18	85	2	13
<b>Trisomia 21</b>	0,45	90	5	5
<b>47,XXY</b>	0,08	50	50	-
<b>47,XXX</b>	0,05	91	9	-
<b>47,XYY</b>	0,04	-	100	-

\*ER=Embarassos reconeguts. Adaptat de Hassold i Jacobs (1984)

**Taula 2:** Origen parental (%) de les anomalies cromosòmiques més freqüents (autosomes: Revisat per Nicolaidis i Petersen 1998, gonosomes: May *et al.* 1990; Mac Donald *et al.* 1994).

Aquestes diferències entre sexes i entre cromosomes suggereixen que els mecanismes que originen les gàmetes portadores d'anomalies cromosòmiques podrien ser diferents o específics per a cada tipus de cromosoma. En conseqüència, la determinació de l'origen parental pot ajudar a elucidar els mecanismes que hi ha darrera de l'aparició del fenomen de la no disjunció.

### 1.3. Etiologia de la no disjunció

Les anomalies cromosòmiques numèriques s'originen per un fenomen conegut amb el nom de no disjunció. D'acord amb la interpretació clàssica (Ford, 1973), consisteix en errades de segregació dels cromosomes homòlegs (meiosi I) o de les cromàtides homòlogues (meiosi II), i dona com a resultat cèl·lules aneuploides: hiperhaploides o disòmiques quan presenten un cromosoma de més i, hipohaploides o nul·lisòmiques quan presenten un cromosoma de menys. Actualment es proposa la segregació anfitèlica d'un univalent a meiosi I, després de la divisió precoç del seu centròmer, com el mecanisme implicat en la formació de gàmetes portadores d'aneuploïdies (Angell, 1991). D'altra banda, si totes les cromàtides o cromosomes homòlegs segreguen incorrectament es formen cèl·lules diploides.

Malgrat els avanços dels darrers anys, encara coneixem poc sobre la base biològica de la no disjunció. L'edat materna avançada és l'únic factor de risc clarament associat amb

aquest fenomen (Penrose, 1933), però la seva relació amb els processos de no disjunció encara no ha estat del tot establerta.

Un factor clarament relacionat amb l'increment d'aneuploïdies és una recombinació meiótica aberrant. Warren *et al.* (1987) analitzant individus amb trisomia 21, on el cromosoma extra s'originava per un error de segregació durant la primera divisió meiótica materna, van observar que el cromosoma extra presentava una reducció en el nombre de quiasmes. Estudis similars també han detectat davallades significatives en el nombre de quiasmes pel cromosoma 21 (Sherman *et al.* 1991), pel cromosoma 16 (Hassold *et al.* 1991a), pel cromosoma 18 (Fisher *et al.* 1995) i pels cromosomes sexuals (Hassold *et al.* 1991b).

Així mateix, alguns investigadors han posat de manifest que a la meiosi femenina, no només el nombre d'intercanvis sinó també la seva localització, està implicada en l'aparició de gàmetes aneuploides. Aquest resultat s'ha obtingut a partir de l'anàlisi dels cromosomes sexuals (Mc Donald *et al.* 1994), del cromosoma 21 (Lorber *et al.* 1992; Petersen *et al.* 1992) i del cromosoma 16 (Hassold *et al.* 1995).

La relació entre les anomalies en la recombinació i la no disjunció s'estén fins a la segona divisió meiótica. Així Lamb *et al.* (1996) analitzant 133 casos de trisomia 21 amb errors materns de segona divisió, demostren que hi ha una associació entre una recombinació meiótica alterada a meiosi I i els fenòmens de no disjunció que es donen a meiosi II, suggerint que els esdeveniments que tenen lloc a la primera divisió poden ser l'origen de tots els casos de no disjunció.

En resum, una recombinació aberrant sembla que és uns dels factors que més contribueixen a la no disjunció. De fet, s'accepta que els quiasmes són necessaris pel manteniment dels bivalents durant la transició diplotè-diacinesi i per assegurar la segregació correcta dels cromosomes homòlegs a anafase (Ferguson *et al.* 1996). En conseqüència no és difícil imaginar que errades en la recombinació puguin provocar un increment d'anomalies numèriques.

Òbviamment poden haver altres factors implicats. Per exemple, alguns investigadors relacionen les associacions de les regions satèl·lits dels cromosomes acrocèntrics amb un increment d'aneuploïdies (Henderson *et al.* 1973). Altres estudis intenten relacionar disfuncions de les proteïnes motores implicades en la segregació dels cromosomes (Preston 1996), o la presència de determinats agents ambientals externs (Bishop *et al.* 1996) o interns a l'individu (Mroz *et al.* 1999) amb l'aparició d'anomalies cromosòmiques.

#### **1.4. Anàlisi citogenètica de les gàmetes**

La freqüència observada d'una determinada anomalia cromosòmica a la població depèn de dos factors. En primer lloc de la incidència després de la concepció, en segon lloc de la seva viabilitat al llarg del desenvolupament embrionari. Alhora, la freqüència després de la concepció depèn directament del percentatge de gàmetes cromosòmicament desequilibrats.

Així doncs, el coneixement de la freqüència d'anomalies en espermatozoides i oòcits i, la seva relació amb els processos que els originen, pot ajudar a comprendre els esdeveniments meiòtics implicats en l'aparició de gàmetes cromosòmicament desequilibrats.

##### **1.4.1. L'oòcit**

Per raons inherents al procés de gametogènesi en les femelles de mamífer, l'estudi de les gàmetes femenines ha estat possible arran el desenvolupament de tècniques de reproducció assistida. L'aplicació de tècniques d'anàlisi citogenètica clàssica sobre aquest material ha donat com a resultat una incidència total d'anomalies cromosòmiques superior al 20%, essent les aneuploïdies les anomalies majoritàries (Pellestor 1991; Gras *et al.* 1992; Benkhalifa *et al.* 1996). Ara bé, aquesta metodologia només permet l'anàlisi dels errors que tenen lloc durant la primera divisió meiòtica, en conseqüència, el percentatge total d'anomalies en oòcits ha de ser més elevat (errades de primera i de segona divisió meiòtica).

Un resultat destacat en alguns d'aquests treballs és l'increment significatiu, respecte els altres cromosomes analitzats, d'oòcits amb aneuploïdies pels cromosomes del grup G (Pellestor 1991; Wall *et al.* 1996). Els cromosomes 21 i 22 són els més petits del cariotip i els que presenten la taxa més baixa de recombinació meiòtica (Laurie i Hultén 1985), suggerint, novament, una relació entre la no disjunció i la recombinació meiòtica, en el sentit que qualsevol alteració de la recombinació afectarà preferentment a aquells cromosomes que presenten un nivell basal d'intercanvis més baix.

D'altra banda, diferents laboratoris han desenvolupat metodologies per a l'obtenció de cromosomes a partir dels corpuscles polars i la seva anàlisi posterior mitjançant hibridació *in situ* fluorescent (Munné *et al.* 1995; Durban *et al.* 1998; Verlinsky i Evsikov 1999). Els corpuscles polars contenen una dotació cromosòmica complementària de la dotació de l'oòcit. Per tant, coneixent el seu contingut cromosòmic és possible deduir quina serà la dotació de l'oòcit.

Estudis preliminars utilitzant aquesta metodologia posen de manifest una incidència d'anomalies cromosòmiques superior al 20% (Verlinsky *et al.* 1995a; 1996), un percentatge similar a l'obtingut per tècniques d'anàlisi citogenètica clàssica.

#### **1.4.2. L'espermatozoide**

L'estudi dels espermatozoides planteja problemes totalment diferents a l'estudi cromosòmic dels oòcits. Els espermatozoides són cèl·lules altament diferenciades i especialitzades, la seva funció és portar el complement cromosòmic del mascle fins a l'oòcit i, una vegada s'ha fusionat amb aquest, activar-ho per tal que s'iniciï el programa de desenvolupament de l'embrió.

Per realitzar aquesta funció, les espermàtides presenten una sèrie de modificacions citoplasmàtiques i nuclears que condueixen a la formació d'espermatozoides madurs. Els canvis que afecten al nucli condueixen a la diferenciació d'una cromatina espermàtica amb un grau de condensació molt elevat, degut principalment, a la substitució de l'estructura nucleohistònica de les espermàtides per un complex format per DNA i protamines. Aquestes són petites proteïnes bàsiques riques en grups tiol



(SH). Durant el trànsit epididimari dels espermatozoides es produeix l'oxidació dels grups tiol mitjançant l'establiment d'enllaços disulfur (SS). El resultat final és la formació d'un nucli espermàtic altament condensat.

Aquesta estructura tan particular del nucli de l'espermatozoide ha condicionat l'aplicació de tècniques d'anàlisi citogenètica sobre aquest tipus cel·lular. A continuació revisem les tècniques més significatives desenvolupades per al seu estudi.

#### **1.4.2.1. Tinció cromosòmica diferencial**

Barlow i Vosa (1970) van ser els primers investigadors en diferenciar els espermatozoides en funció del seu contingut cromosòmic. Utilitzant quinacrina o mostassa de quinacrina, dos colorants que s'uneixen a la regió heterocromàtica del cromosoma Y, van ser capaços d'observar, mitjançant microscòpia de fluorescència, espermatozoides portadors d'aquest cromosoma. En el seu treball xifren entre un 40% i un 45% el percentatge d'espermatozoides amb senyal, un resultat proper al 50% esperat.

Dos anys més tard, Bobrow *et al.* (1972) utilitzant el colorant Giemsa van determinar la presència del cromosoma 9 en nuclis interfàsics d'espermatozoides. Per últim, Geraedts i Pearson (1973) detecten la constricció secundària del cromosoma 1 fent servir el colorant Leishman.

El desenvolupament d'aquestes tècniques va possibilitar l'aparició a la literatura dels primers treballs on es valorava el percentatge d'espermatozoides amb anomalies cromosòmiques. En relació al cromosoma Y, el percentatge d'espermatozoides amb dues senyals variava des d'un valor mínim de 0,18% (Schwinger *et al.* 1976) fins a un valor màxim del 5% (Klasen i Schmid 1981). Tanmateix, els estudis dels cromosomes 1 i 9 xifraven al voltant del 2% el percentatge d'espermatozoides amb dues senyals (Pawlowitzki i Pearson 1972; Geraedts i Pearson 1973). Aquests treballs suggerien que si la incidència era equivalent per a tots els cromosomes, entre un 30% i un 40% dels espermatozoides presentarien desequilibris cromosòmics (Pawlowitzki i Pearson 1972).

Malgrat que la precisió de les dades publicades utilitzant aquestes tècniques va ser qüestionada quan es va comprovar l'elevat nombre de falsos positius i errors de tinció

que presentaven (Sumner i Robinson 1976; Roberts i Goodall 1976; Beatty 1977), aquests treballs van posar de manifest la implicació paterna en l'aparició d'anomalies cromosòmiques.

#### **1.4.2.2. Cromosomes d'espermatozoide**

Rudak *et al.* (1978), van ser els primers investigadors en observar cromosomes metafàsics d'espermatozoide. Aprofitant la capacitat dels espermatozoides humans capacitats *in vitro*, de fusionar-se amb els oòcits d'hàmmster sense zona pel·lúcida i assolir l'estadi de pronucli (Yanagimachi *et al.* 1976), els autors varen demostrar que, en condicions de cultiu adequades, el pronucli masculí era capaç d'assolir l'estadi de metafase.

Aquesta metodologia va ser estandarditzada més endavant per Martin *et al.* (1982), suposant l'inici de tot una sèrie de treballs de recerca que van permetre realitzar diferents tipus d'estudis cromosòmics en espermatozoides humans: des de la determinació del nivell basal d'anomalies cromosòmiques en individus controls (Martin i Rademaker 1990; Templado *et al.* 1996), fins a l'estudi cromosòmic de grups d'individus considerats de risc: individus portadors de reorganitzacions cromosòmiques estructurals (Pellestor *et al.* 1989; Templado *et al.* 1996), individus exposats a agents genotòxics (Álvarez 1998) i individus afectats per diferents tipus de càncer (Genescà *et al.* 1990; Martin *et al.* 1997).

Sens dubte, el principal avantatge d'aquesta metodologia és la possibilitat d'estudiar tots els cromosomes i els diferents tipus d'anomalies cromosòmiques que presenta un espermatozoide. Ara bé, al mateix temps el protocol a aplicar és extremadament complex, requereix mans expertes i, en conseqüència, impossibilita l'anàlisi d'un nombre suficient d'espermatozoides (des d'un punt de vista estadístic). Tot plegat ha fet que només alguns laboratoris hagin estat capaços d'aplicar-la.

#### **1.4.2.3. Hibridació *in situ***

Les tècniques d'hibridació *in situ* (Pardue i Gall 1969; John *et al.* 1969) permeten la detecció i visualització específica de seqüències d'àcids nucleics. La tècnica es basa en

la capacitat d'aquestes molècules de realitzar cicles de desnaturalització-renaturalització quan s'exposen a condicions de temperatura i/o de pH adequades.

Consisteix en posar en contacte dos fragments o molècules d'àcid nucleic: una molècula diana present a la cèl·lula que es vol analitzar i una sonda (fragment de nucleòtids complementari de la molècula diana). Per tal que es doni la hibridació, és necessari desnaturalitzar ambdues molècules obrint els ponts d'hidrogen que mantenen la doble hèlix. Posteriorment es posen en contacte esperant que, durant el temps de renaturalització, es produeixi la hibridació de la sonda amb la seqüència de DNA diana complementària.

L'observació de la hibridació depèn de la incorporació a la sonda de molècules marcadores que permetin la seva detecció posterior. Inicialment es van utilitzar com a marcadors isòtops radioactius i la hibridació es detectava per autoradiografia. El primer treball publicat que va aplicar aquesta metodologia sobre nuclis d'espermatozoides no va donar resultats prou satisfactoris, degut, principalment, a la manca d'un mètode eficient de descondensació de la cromatina espermàtica (Joseph *et al.* 1984). A més, els autors es varen trobar amb les mateixes dificultats que ja havia plantejat la tècnica sobre altres tipus cel·lulars: la necessitat d'establir grans mesures de seguretat al laboratori, l'elevat temps d'espera per obtenir els resultats i, per últim, la poca resolució espacial dels senyals obtinguts.

Més endavant van començar a aparèixer mètodes de detecció no radioactius, d'entre els quals va destacar el de fluorescència, és a dir, aquell que utilitzava com a marcadors fluorocroms: molècules que emeten llum quan s'exciten amb la llum ultraviolada. Aquestes tècniques, conegudes amb el nom de FISH (hibridació *in situ* fluorescent), van ser emprades satisfactòriament en diferents tipus cel·lulars: limfòcits (Eastmond i Pinkel 1990) amniòcits (Kuo *et al.* 1991), cèl·lules tumorals (Cremer *et al.* 1988) embrions preimplantacionals (Grifo *et al.* 1990) entre d'altres.

El salt de l'aplicació d'aquesta metodologia a l'espermatozoide estava, directament condicionat, al desenvolupament de protocols de descondensació de la cromatina

espermàtica que possibilitessin l'encontre entre la sonda de DNA i la seva seqüència complementària. Gràcies als estudis realitzats sobre el procés de la descondensació dins l'oòcit (Perrault i Zirkin 1982), es coneixia que la presència d'agents que eliminaven els ponts disulfur permetien els espermatozoides descondensar *in vitro*.

Així, tots els protocols de descondensació el que intenten és revertir el procés de condensació que s'ha donat durant l'espermioogènesi; per això, la majoria inclouen en la solució de descondensació ditiotreitòl (DTT), un agent reductor dels enllaços disulfur. En la majoria dels casos el DTT es combina amb altres molècules que complementen la seva acció: tripsina (Pieters *et al.* 1990; Goldman *et al.* 1993; Bischoff *et al.* 1994), salicilat de liti (LIS) (Wyrobek *et al.* 1990), bromur de cetiltrimetilamoni (CTAB) (Holmes i Martin 1993), àcid etilendiaminictetracètic (EDTA) (West *et al.* 1989), i triton X-100 (Zirkin *et al.* 1985).

### **1.5. FISH en espermatozoides: estat de la qüestió 1990-1994**

El nostre projecte de recerca es va iniciar al setembre de l'any 1994. La següent secció d'aquesta introducció pretén il·lustrar la situació de l'aplicació de la hibridació *in situ* fluorescent sobre nuclis d'espermatozoides en aquell moment.

Probablement si aquest període s'hagués de resumir amb una sola paraula, aquesta seria consolidació. Un dels avenços més significatius va ser la descripció de protocols de descondensació de la cromatina del nucli dels espermatozoides amb eficiències d'hibridacions properes al 99% (Wyrobek *et al.* 1990; Goldman *et al.* 1993; Holmes i Martin 1993; Bischoff *et al.* 1994). Així doncs, el grau de condensació de la cromatina ja no era una barrera insuperable en l'estudi cromosòmic dels espermatozoides.

Paral·lelament es van desenvolupar protocols de FISH que permetien la combinació de sondes de DNA marcades amb diferents fluorocroms. Els primers treballs publicats utilitzaven una sola sonda de DNA (Taules 3 i 4, pàgines 14 i 15 respectivament), aquesta aproximació experimental no permetia la discriminació objectiva entre els espermatozoides disòmics i els diploides.



L'aparició de metodologies de FISH bicolor quan s'estaven analitzant els autosomes (Williams *et al.* 1993) o de FISH tricolor quan s'analitzaven els cromosomes sexuals (Bischoff *et al.* 1994) superaven l'inconvenient de diferenciar els espermatozoides disòmics i diploides en funció del diàmetre nuclear.

D'altra banda, durant aquest període es van descriure criteris de valoració dels espermatozoides per tal d'eliminar la subjectivitat de l'investigador. Hem de tenir en compte que en aquesta metodologia la presència del cromosoma s'infereix a partir de l'observació d'un senyal d'hibridació al nucli cel·lular. Així doncs, es donen determinades situacions que poden originar valoracions contradictòries: desdoblament de senyals, senyals propers, senyals de diferent intensitat, entre d'altres.

	XY	XX	YY
Guttenbach i Schmid (1990) <sup>a</sup>			0,27
Han <i>et al.</i> (1992) <sup>a</sup>		0,29	
Knights <i>et al.</i> (1992) <sup>b</sup>	0,17	0,06	0,09
Wyrobek <i>et al.</i> (1992) <sup>c</sup>	0,06	0,04	0,05
Goldman <i>et al.</i> (1993) <sup>b</sup>	0,23	0,08	0,10
Han <i>et al.</i> (1993) <sup>b</sup>	0,21	0,28	0,21
Holmes i Martin (1993) <sup>a</sup>		0,03	
Martin <i>et al.</i> (1993) <sup>a</sup>			0,11
Robbins <i>et al.</i> (1993) <sup>a</sup>			0,06
Williams <i>et al.</i> (1993) <sup>c</sup>	0,09	0,08	0,11
Bischoff <i>et al.</i> (1994) <sup>c</sup>	0,12	0,37	0,08
Chevret <i>et al.</i> (1994) <sup>b</sup>	0,42	0,05	0,05
Guttenbach <i>et al.</i> (1994a) <sup>a</sup>		0,34	
Miharu <i>et al.</i> (1994) <sup>a</sup>		0,13	0,08
Wyrobek <i>et al.</i> (1994) <sup>b</sup>	0,06	0,04	0,04

a- FISH monocolor

b- FISH bicolor

c- FISH tricolor

**Taula 4:** Incidència (%) de disomies pels cromosomes sexuals segons diferents autors.

Els primers treballs publicats no tenien en compte l'aplicació de criteris de valoració (Pieters *et al.* 1990; Coonen *et al.* 1991), naturalment en aquell moment es desconeixia

la majoria dels factors que afecten la valoració d'aneuploïdies per FISH. La importància de l'aplicació de criteris de valoració va ser posada de manifest per primera vegada l'any 1993 (Williams *et al.* 1993; Goldman *et al.* 1993; Robbins *et al.* 1993). Des d'aleshores, la majoria dels grups de recerca els han incorporat en els seus protocols de treball com a eina indispensable en la valoració d'aneuploïdies en espermatozoides.

Un aspecte d'aquesta etapa que pot estar lligat amb la manca de criteris de valoració és l'elevada variabilitat dels resultats publicats (Taules 3 i 4, pàgines 14 i 15 respectivament). Per exemple, el percentatge de disomies pel cromosoma 1 variava des d'un valor mínim del 0,06% (Holmes i Martin 1993) fins a un valor màxim del 0,80% (Coonen *et al.* 1991) (Taula 3, pàgina 14). Tot i que en alguns casos, aquesta variabilitat podia reflectir diferències interindividuais, és molt probable que majoritàriament estigués condicionada per diferències metodològiques.

Dels resultats publicats en individus controls (Taules 3 i 4, pàgines 14 i 15 respectivament) destaquen aquells que demostraven l'especial tendència d'alguns cromosomes al fenomen de la no disjunció (cromosoma 16, Williams *et al.* 1993), suggerint que els mecanismes que originen gàmetes aneuploides afecten preferentment alguns cromosomes.

Finalment, alguns investigadors comencen a exposar les potencialitats de la tècnica, no només en l'estudi cromosòmic d'individus control, també en individus considerats de risc. Així, Han *et al.* (1992) proposen la utilitat clínica de la tècnica: "*In particular the methodology will allow questions relating to the chromosomal complement of pathological semen samples to be addressed*". Tanmateix, Guttenbach i Schmid (1991) afirmen: "*Because of the constant improvements of this technique and the growing availability of chromosome specific probes, the nonisotopic demonstration of structural aberration in interphase nuclei as well will soon become feasible*".

## **1.6. Aplicacions actuals de la FISH en espermatozoides i perspectives de futur**

La consolidació de la tècnica de FISH en l'estudi citogenètic dels espermatozoides i, el desenvolupament de diferents tipus de sondes de DNA i fluorocroms, ha permès

l'aparició de tot un ventall de possibilitats d'estudi sobre aquest tipus cel·lular. Així, moltes de les qüestions que es plantejaven els investigadors comencen a tenir una resposta. Algunes de les aplicacions més clares de la hibridació *in situ* fluorescent són les següents:

### **1.6.1. Determinació del nivell basal d'anomalies cromosòmiques numèriques**

El coneixement dels mecanismes implicats en l'origen de la no disjunció ha de tenir en compte l'estudi directe de la constitució cromosòmica de les gàmetes, atès que, la gran majoria dels errors de segregació tenen lloc durant la meiosi.

La consolidació d'una metodologia de FISH estandarditzada entre els diferents laboratoris, permetrà calcular la contribució paterna en l'aparició d'anomalies cromosòmiques en humans i, al mateix temps, relacionar les diferències intercromosòmiques i l'etiologia de la no disjunció.

### **1.6.2. Estudis d'incidència en individus de risc**

Un individu de risc és aquell que, per diversos motius, és candidat a presentar un increment d'anomalies cromosòmiques. Òbviament aquest grup és molt ampli, i per tant, les possibilitats d'estudi són pràcticament il·limitades. Anem a revisar alguns dels més significatius.

#### **1.6.2.1. Poblacions d'elevada prevalença per a una anomalia cromosòmica**

És possible que en poblacions d'elevada prevalença puguin haver-hi factors ambientals que incrementin el nivell constitucional d'anomalies cromosòmiques en gàmetes. De fet, alguns investigadors han suggerit que una possible explicació de la major incidència d'anomalies cromosòmiques en humans, en comparació amb la que presenten altres mamífers (Lowe *et al.* 1995; Wyrobek *et al.* 1995a), pugui ser l'exposició a diferents tipus d'agents ambientals.

No obstant això, actualment no hi ha cap estudi que correlacioni la presència d'un factor ambiental amb un increment d'anomalies cromosòmiques en gàmetes i, que al final, es tradueixi en un increment d'anomalies cromosòmiques a la descendència.



Lògicament estem parlant d'estudis interdisciplinaris, que han d'incloure la determinació dels factors ambientals hipotèticament implicats en l'increment de la taxa constitucional d'aneuploïdies, així com la determinació de l'origen parental dels cromosomes afectats. Ara bé, en qualsevol cas, precisen la comprovació del percentatge d'anomalies cromosòmiques en gàmetes. És aquí on la hibridació *in situ* fluorescent és revela com la tècnica més adient per a la realització d'aquests tipus d'anàlisi en el cas d'estudis d'espermatozoides.

De fet, estudis preliminars aplicant aquesta metodologia (Robbins *et al.* 1994; Wyrobek *et al.* 1995b), demostren que alguns individus exposats a determinats agents genotòxics presenten un increment significatiu d'anomalies cromosòmiques.

#### **1.6.2.2. L'efecte intercromosòmic en portadors de reorganitzacions estructurals**

Lejeune (1963) va observar un increment d'anomalies cromosòmiques estructurals en pares d'individus amb la síndrome de Down. L'autor va proposar que la presència de la reorganització cromosòmica podia interferir la segregació d'altres bivalents durant la meiosi (especialment la del cromosoma 21). Va denominar aquest hipotètic fenomen com efecte intercromosòmic.

Des d'aleshores fins ara han aparegut a la literatura diferents tipus de treballs que confirmen aquest fenomen: estudis epidemiològics poblacionals en poblacions de pares d'individus amb la síndrome de Down (Mikkelsen 1971; Aurias *et al.* 1978; Lindenbaum *et al.* 1985; Couzin *et al.* 1987; Serra *et al.* 1990), estudis meiòtics en portadors de reorganitzacions cromosòmiques estructurals (Vidal *et al.* 1982; Luciani *et al.* 1984; Gabriel-Robez *et al.* 1986; Saadallah i Hultén 1986; Batanian i Hultén 1987; Vidal *et al.* 1987; Guiachaoua *et al.* 1990; Navarro *et al.* 1991) i fins i tot, alguns treballs analitzant cromosomes d'espermatozoide d'individus portadors (Balkan i Martin 1983; Burns *et al.* 1986; Templado *et al.* 1988).

No obstant això, cap d'aquestes aproximacions experimentals permet determinar amb fiabilitat la seva existència. Els estudis epidemiològics estan clarament condicionats al baix nombre de parelles que s'estudien i a què, en la majoria dels casos, les parelles

estudiades són d'edat avançada, on les dones presenten un risc elevat de no disjunció. D'altra banda, els resultats dels estudis meiòtics són indirectes, i no permeten tenir la certesa de si l'anomalia meiòtica es traduirà en un increment d'anomalies cromosòmiques als espermatozoides. Per últim, els resultats dels estudis de cromosomes d'espermatozoide estan condicionats al baix nombre de cèl·lules analitzades que impossibilita l'aplicació de mètodes d'anàlisi estadística.

La consolidació de la hibridació *in situ* fluorescent en l'anàlisi cromosòmica dels espermatozoides permetrà realitzar una valoració molt acurada (elevada especificitat de les sondes de DNA) i alhora molt extensa, possibilitant l'aplicació de mètodes d'anàlisi estadística.

### **1.6.2.3. Individus amb problemes de fertilitat**

Els darrers anys, el desenvolupament de noves tecnologies en l'àmbit de la reproducció assistida ha incrementat notòriament les possibilitats de reproducció d'individus infèrtils. De forma particular, l'ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) ha permès la reproducció d'individus amb factors severos d'esterilitat masculina.

No obstant, paral·lelament a la seva aplicació, han sorgit nombroses qüestions en relació amb la seva seguretat genètica, en el sentit que la tècnica s'aplica a individus on la infertilitat pot tenir un origen genètic i per tant, el risc de transmissió d'anomalies cromosòmiques a la descendència es pot veure incrementat.

Per exemple, la incidència d'individus portadors d'anomalies cromosòmiques en poblacions d'homes infèrtils és superior a la incidència descrita a la població control (Zuffardi i Tiepolo 1982). Algunes d'aquestes anomalies poden generar, després de les dues divisions meiòtiques, gàmetes cromosòmicament desequilibrades.

D'altra banda, estudis meiòtics en individus infèrtils demostren un increment significatiu d'anomalies sinàptiques (Egozcue *et al.* 1983; de Braekelaer i Dao 1991). Aquestes anomalies d'aparellament poden derivar a un bloqueig meiòtic, provocant azoospermia o oligozoospermia en l'individu portador. Ara bé, en cas que algunes

d'aquestes cèl·lules completin la meiosi, es pot donar un increment d'anomalies cromosòmiques en gàmetes.

De fet, aquestes observacions poden estar relacionades amb l'increment d'anomalies dels cromosomes sexuals, detectat en gestacions resultants de l'aplicació de cicles d'ICSI (Liebaers *et al.* 1995; In't Veld *et al.* 1995).

La utilització de la FISH en aquests individus permetrà determinar el percentatge d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides, oferint als individus portadors un consell reproductiu molt més acurat.

### **1.6.3. Segregació meiótica dels cromosomes reorganitzats**

#### **1.6.3.1. Individus portadors d'anomalies cromosòmiques estructurals**

L'aplicació de la hibridació *in situ* fluorescent en l'estudi de la segregació dels cromosomes reorganitzats, depèn de la disponibilitat de sondes de DNA específiques dels segments reorganitzats. D'aquesta manera es poden valorar en el nucli interfàsic de l'espermatozoide, els diferents tipus de segregacions cromosòmiques, d'acord amb el nombre de senyals d'hibridació de les sondes de DNA utilitzades.

Inicialment l'aplicació de la FISH en aquest tipus de valoracions només possibilitava l'anàlisi d'anomalies cromosòmiques numèriques (Lu *et al.* 1994; Spriggs i Martin 1994; Rousseaux *et al.* 1995), donat que les sondes de DNA centromèriques disponibles en aquell moment no permetien diferenciar els diferents tipus de segregacions durant la primera divisió meiótica.

Actualment, el desenvolupament de sondes de DNA específiques de locus i de regions subtelomèriques permet analitzar adequadament les segregacions dels cromosomes reorganitzats i, alhora, combinar aquests estudis amb la valoració de l'efecte intercromosòmic. Tot plegat ens possibilitarà determinar el percentatge d'espermatozoides cromosòmicament anormals oferint als individus portadors un consell reproductiu acurat.

### 1.6.3.2. Individus amb anomalies numèriques dels cromosomes sexuals

El comportament meiòtic dels cromosomes sexuals en individus portadors d'anomalies numèriques per aquests cromosomes: síndrome de Klinefelter (47,XXY) i individus 47,XYY ha estat motiu d'interès ateses les possibles conseqüències cromosòmiques per a la seva la descendència.

La majoria dels estudis meiòtics en individus 47,XXY (Kejssler 1966; Luciani *et al.* 1970; Dutrillaux *et al.* 1971; Laurent *et al.* 1973) mostren la incapacitat de la línia cel·lular aneuploide d'iniciar la meiosi, degut principalment a un fort bloqueig a nivell d'espermatogoni. D'altra banda, els estudis en individus 47,XYY suggerien la pèrdua del cromosoma Y extra en els primers estadis de l'espermatogènesi (Thompson *et al.* 1967; Melnyk *et al.* 1969; Evans *et al.* 1970; Hsu *et al.* 1970; Tettenborn *et al.* 1970; Hultén i Pearson 1971; Luciani *et al.* 1973; Chandley *et al.* 1976; Faed *et al.* 1976).

No obstant això, altres estudis meiòtics varen posar de manifest la capacitat de les cèl·lules aneuploides d'iniciar la meiosi (Skakkebaek *et al.* 1969; Vidal *et al.* 1984; Speed *et al.* 1991).

Els estudis cromosòmics en espermatozoides d'aquests individus són força escassos. En individus 47,XYY, Benet i Martin (1988) analitzant cromosomes d'espermatozoides no troben cap increment significatiu d'espermatozoides anormals respecte la població control. D'altra banda Han *et al.* (1994) analitzant un individu XYY mitjançant FISH, descriu un increment significatiu d'espermatozoides diploides, tot i que discrimina els disòmics dels diploides d'acord amb el diàmetre nuclear. Respecte els individus 47,XXY els resultats mostren un increment d'espermatozoides amb anomalies pels cromosomes sexuals (Cozzi *et al.* 1994) suggerint que, a part del bloqueig meiòtic de la línia XXY, es produeixen no-disjuncions de cèl·lules XY a meiosi I.

L'aplicació més extensa de la FISH sobre mostres provinents d'aquests individus permetrà determinar el comportament meiòtic dels cromosomes sexuals i alhora calcular el risc de transmissió d'una anomalia cromosòmica a la descendència.

## **2. OBJECTIUS**

Ateses les potencialitats de la hibridació *in situ* fluorescent en l'estudi citogenètic de l'espermatozoide humà, els objectius plantejats en el nostre treball de recerca van ser els següents:

1. Establir la freqüència de diploïdies i disomies pels cromosomes 6, 18, 21, X i Y en espermatozoides provinents d'individus control.
2. Determinar la freqüència de disomies pel cromosoma 21 en espermatozoides provinents de parets d'individus amb la Síndrome de Down, a fi d'estimar la seva possible relació amb l'origen parental del cromosoma extra en els fills afectes.
3. Valorar l'efecte intercromosòmic pel cromosoma 21 en individus portadors de reorganitzacions cromosòmiques estructurals.
4. Analitzar la segregació meiòtica dels cromosomes afectats en individus portadors d'anomalies cromosòmiques:
  - 4a. Individus portadors de translocacions cromosòmiques recíproques.
  - 4b. Individus portadors d'anomalies numèriques dels cromosomes sexuals.
5. Realitzar una valoració crítica de la utilització de la hibridació *in situ* fluorescent en l'estudi citogenètic de l'espermatozoide humà.

### **3. MATERIALS I MÈTODES**

### 3.1. Mostres biològiques

Hem analitzat dos tipus de material biològic: espermatozoides provinents de mostres de semen i cèl·lules d'espermatogènesi i espermatozoides provinents de biòpsies testiculars.

#### 3.1.1. Mostres de semen

Les mostres problema varen ser obtingudes en col·laboració amb diferents centres de reproducció assistida i diagnòstic prenatal (Taula 5). D'altra banda, les mostres dels individus control (n=9) provenien de companys del nostre laboratori.

Individus analitzats	Centre de procedència
<b>Pares d'individus amb trisomia 21 (n=15)</b>	Consorci Hospitalari Parc Taulí de Sabadell
<b>Portadors d'anomalies estructurals:</b>	
46,XY,t(3;15)(p25;q15)	Instituto Valenciano de Infertilidad, València
46,XY,t(5;8)(q33;q13)	Institut de Bioquímica Clínica, Barcelona
46,XY,t(7;Y)(p11;q13)	Instituto Valenciano de Infertilidad, València
45,XY,t(13;22)	Instituto Valenciano de Infertilidad, València
46,XY,inv(9qh)(p12;q12)	Prenatal Genetics SL, Barcelona
<b>Portadors d'anomalies numèriques dels gonosomes:</b>	
47,XXY/46XY	Institut Universitari Dexeus, Barcelona
47,XXY	Instituto Valenciano de Infertilidad, València
47,XXY	Instituto Valenciano de Infertilidad, València
47,XXY	Instituto de Reproducción CEFER, Barcelona

**Taula 5:** Individus problema estudiats i centres de procedència.

En qualsevol cas, les mostres s'obtenien per masturbació, directament a l'interior d'un contenidor de plàstic estèril i es guardaven a temperatura ambient fins el moment de la seva fixació.



### **3.1.2. Biòpsies testiculars**

Aquest material va ser subministrat directament pels centres col·laboradors (Taula 5, pàgina 5). Les biòpsies s'obtenien per intervenció quirúrgica amb anestèsia local i eren enviades al nostre laboratori a temperatura ambient submergides en una solució isotònica (NaCl 0,9%).

## **3.2. Fixació i emmagatzematge del material**

### **3.2.1. Material utilitzat:**

- Cambra de Newbauer
- Centrífuga
- Fixador de Carnoy (metanol:àcid acètic, 3:1)
- Incubador
- Medi hipotònic: KCl 0,075M
- Microscopi Olympus BX-60 equipat amb un sistema òptic de contrast de fases
- Pipetes Pasteur
- Portaobjectes desengreixats amb metanol fred
- Tisores de dissecció
- Tubs de centrífuga de vidre de fons cònic
- Vidre de rellotger

### **3.2.2. Mètode aplicat:**

#### **3.2.2.1. Mostres de semen**

Abans de la fixació, realitzàvem un recompte cel·lular amb una cambra de Newbauer mitjançant el microscopi invertit de contrast de fases.

La fixació de les mostres consta dels següents passos:

- Centrifugar la mostra durant 5 minuts a 3.000 rpm per tal de separar el plasma seminal de la fracció cel·lular.
- Eliminar el plasma seminal amb una pipeta Pasteur.

- Resuspendre el sediment cel·lular en la solució hipotònica.
- Incubar la suspensió cel·lular durant 30 min a 37 °C.
- Centrifugar durant 5 minuts a 2.500 rpm.
- Eliminar el sobrenadant per decantació.
- Resuspendre el sediment cel·lular amb fixador de Carnoy
- Centrifugar durant 5 minuts a 2.500 rpm.
- Eliminar el sobrenadant per decantació. Repetir els rentats amb Carnoy tantes vegades com sigui necessari, fins que el sediment cel·lular quedi totalment net (de color blanc).
- Resuspendre el sediment en fixador fresc i realitzar les extensions deixant caure una gota de la suspensió cel·lular a sobre d'un portaobjectes.
- Verificar la concentració i la morfologia cel·lular amb el microscopi de contrast de fases.
- Les preparacions convenientment identificades amb el codi del pacient i la data en què s'havia realitzat la fixació, s'emmagatzemaven a -20°C fins el moment de la seva utilització.

### **3.2.2.2. Biòpsies testiculars**

Per la fixació d'aquest material vam aplicar el següent protocol:

- Col·locar la biòpsia sobre un vidre de rellotger amb solució hipotònica. Amb l'ajut d'unes tisores de dissecció tallar els túbuls fins aconseguir que quedin ben trossets i que s'alliberin del major nombre de cèl·lules.
- Recollir la suspensió cel·lular amb una pipeta Pasteur i posar-la dins un tub de centrífuga.
- Resuspendre durant uns minuts per separar les cèl·lules que encara estan enganxades als túbuls.
- Afegir solució hipotònica fins un volum de 8 ml.

- Durant uns minuts, deixar que sedimentin els fragments de túbuls.
- Recollir el sobrenadant i traspasar-ho a un tub de centrífuga net.
- Incubar la suspensió cel·lular a 37°C durant 10-15 minuts.
- Centrifugar durant 7 minuts a 800 rpm, decantar el sobrenadant i resuspendre el sediment cel·lular amb fixador de Carnoy
- Centrifugar durant 5 minuts 800 rpm.
- Eliminar el sobrenadant per decantació. Repetir els rentats amb Carnoy tantes vegades com sigui necessari, fins que el sediment cel·lular quedi totalment net (de color blanc).
- Resuspendre el sediment en fixador fresc i realitzar les extensions deixant caure una gota de la suspensió cel·lular a sobre d'un portaobjectes.
- Comprovar la concentració i la morfologia cel·lular amb el microscopi de contrast de fases.
- Les preparacions convenientment identificades amb el codi del pacient i la data en què s'havia realitzat la fixació, s'emmagatzemaven a -20°C fins el moment de la seva utilització.

### **3.3. Descondensació de la cromatina dels espermatozoides**

#### **3.3.1. Material utilitzat:**

- 2xSSC (Citrat Sòdic Salí) a pH 7-7,5
- Cubetes de tinció
- Incubador
- Llapis de diamant
- Microscopi Olympus BX-60 equipat amb un sistema òptic de contrast de fases
- Solució de descondensació: 5mM DTT (1,4-Diotreitol) a l'1% de Triton X-100 tamponada amb Tris (2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol) a pH 7,4
- Solucions d'etanol en aigua destil·lada: 70%-85%-100%

### 3.3.2. Mètode aplicat:

- Treure les preparacions del congelador i deixar-les a temperatura ambient fins que es descongelin completament.
- Amb un llapis de diamant, marcar l'àrea del portaobjectes on es localitzen els espermatozoides.
- Rentar les preparacions dues vegades amb 2xSSC durant 3 minuts.
- Deshidratar les cèl·lules incubant-les en una sèrie creixent de solucions d'etanol: 70%-85%-100% durant dos minuts a cadascú dels alcohols.
- Deixar assecar les preparacions a temperatura ambient.
- Incubar-les en la solució de descondensació a 37°C. Per la majoria de les mostres analitzades, el temps de descondensació oscil·lava entre els 8 i els 15 minuts.
- Repetir els rentats amb 2xSSC i la deshidratació amb etanol.

Les preparacions, un cop assecades, ja es poden utilitzar pel protocol de FISH.

És interessant remarcar que no hi ha un temps de descondensació comú per a totes les mostres de semen. En conseqüència, l'establiment del temps de descondensació per a cada individu es va aconseguir a partir del seguiment per contrast de fases del grau de descondensació que presentaven els espermatozoides després del tractament. En tots els casos, aplicàvem un temps inicial de vuit minuts. Si el grau de descondensació era l'adequat, continuàvem endavant. En canvi, si la descondensació era insuficient, repetíem el protocol des del començament augmentant així el tractament.

D'altra banda, el temps necessari per descondensar els espermatozoides testiculars va ser considerablement inferior al necessari per descondensar els espermatozoides ejaculats. Probablement, el fet que el grau de condensació de la cromatina dels primers sigui més baix, provoca que siguin més sensibles a l'acció del DTT i, en conseqüència, amb menys temps d'immersió els resultats són òptims. En tots els casos vàrem aplicar quatre minuts d'immersió en la solució de DTT amb resultats satisfactoris.

### 3.4. Protocol d'hibridació *in situ* fluorescent

#### 3.4.1. Material utilitzat:

- Aigua desionitzada
- Bany termostatitzat
- Cambra humida
- Cobreobjectes de vidre
- Cubetes de tinció
- Esmalt d'ungles
- Goma d'enquadernar
- Incubador
- Pipeta automàtica per volums compresos entre 0,5 i 10 $\mu$ l
- Preparacions d'espermatozoides descondensats
- Puntetes de pipeta per volums compresos entre 0,5 i 10 $\mu$ l
- Solucions de rentats de post-hibridació:
  - Solució 1 = 0,4xSSC/0,3% NP-40 pH=7-7,5
  - Solució 2 = 1xSSC/0,1% NP-40 pH=7-7,5
  - Solució 3 = 2xSSC/0,1% NP-40 pH=7-7,5
- Solució de contratinció: 100ng/ml 4,6-diamidin-2-fenilindol (DAPI II, Vysis Inc.)
- Solució de desnaturalització: 70% formamida/2xSSC pH = 7-7,5
- Solucions d'etanol en aigua destil·lada: 70%-90%-100%
- Sondes de DNA (Vysis Inc. Downers Drove, IL, USA)
- Tampó d'hibridació (Vysis Inc. Downers Drove, IL, USA)
- Tubs Eppendorf

#### 3.4.2. Mètode aplicat:

Al llarg dels treballs que hem realitzat hem utilitzat diferents sondes de DNA (Taula 6, pàgina 36). El protocol general d'hibridació *in situ* aplicat en el nostre treball experimental és el següent:

- Desnaturalitzar la cromatina dels espermatozoides per incubació de les preparacions en la solució de desnaturalització durant 5 minuts a  $73\pm 1^{\circ}\text{C}$  al bany maria.
- Deshidratar-les mitjançant una sèrie creixent de solucions d'etanol (70%-85%-100%) a temperatura ambient durant 1 minut cadascuna.
- Deixar assecar a l'aire a temperatura ambient.
- Barrejar les sondes de DNA amb el tampó d'hibridació a l'interior d'un tub Eppendorf. La proporció emprada ha estat 70% de tampó d'hibridació més un 10% de cadascuna de les sondes utilitzades. La resta, fins el 100% (si escau), és completa amb aigua desionitzada.
- Desnaturalitzar la solució de sondes de DNA a  $73\pm 1^{\circ}\text{C}$  durant 5 minuts i dipositar-la sobre de l'àrea del portaobjectes on són les cèl·lules.
- Col·locar un cobreobjectes a sobre i segellar amb goma d'enquadernar.
- Incubar en una cambra humida durant tota la nit (12-16h) a  $37^{\circ}\text{C}$  (sempre que hi sigui present una sonda específica de locus o una sonda de DNA total) o a  $42^{\circ}\text{C}$  (per sondes de DNA repetitiu).
- Transcorregut aquest temps, rentar les preparacions amb la solució de rentat 1 (sondes de DNA repetitiu i sondes específiques de locus) o amb la solució 2 (sondes de DNA total), durant 2 minuts a  $73^{\circ}\text{C}$ . Immediatament transferir les preparacions a la solució de rentat 3, incubant-les durant 1 minut a temperatura ambient.
- Després que les preparacions estiguin seques, els nuclis dels espermatozoides es contratenyeixen amb DAPI aplicant el volum adequat a sobre l'àrea del portaobjectes on són les cèl·lules.
- Finalment, es col·loca un cobreobjectes a sobre i se segellen cobre i portaobjectes amb esmalt d'ungles.

Les preparacions es poden valorar directament o emmagatzemar-les a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins el moment de la seva anàlisi.

Tipus de sonda	Cromosoma	Regió cromosòmica	Fluorocrom®
$\alpha$ -satèl·lit	6	6p11.1-q11 (D6Z1)	Spectrum green
$\alpha$ -satèl·lit	8	8p11.1-q11.1 (D8Z2)	Spectrum green/orange
$\alpha$ -satèl·lit	18	18p11.1-q11.1 (D18Z1)	Spectrum aqua
$\alpha$ -satèl·lit	X	Xp11.1-q11.1 (DXZ1)	Spectrum green
$\alpha$ -satèl·lit	Y	Yp11.1-q11.1 (DYZ3)	Spectrum orange
satèl·lit III	Y	Yq12 (DYZ1)	Spectrum orange
locus específica	5	5p15.2 (D5S23)	Spectrum green
locus específica	8	8q24.2-q24.3 (c-myc)	Spectrum orange
locus específica	21	21q22.13-q22.2 (D21S259, D21S341, D21S342)	Spectrum orange
DNA total	X	Braç p/q+centròmer	Spectrum green

**Taula 6:** Sondes de DNA utilitzades (Vysis Inc.) en el nostre treball experimental.

### 3.5. Valoració microscòpica

#### 3.5.1. Material utilitzat:

- Càmera de vídeo en color Sony 3CCD
- Comptador manual de cèl·lules
- Microscopi de fluorescència Olympus BX-60
- Ordinador PC dotat amb una placa de vídeo Matrox Comet (versió 1.21)
- Sistema de fotografia Olympus PM-20

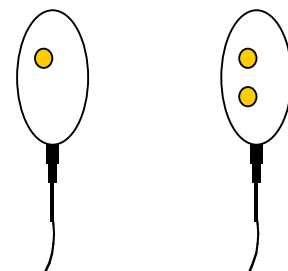
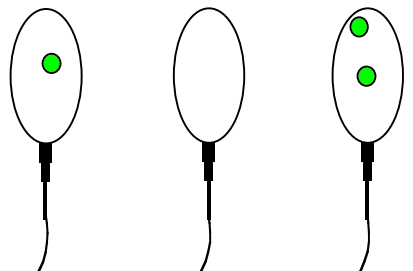
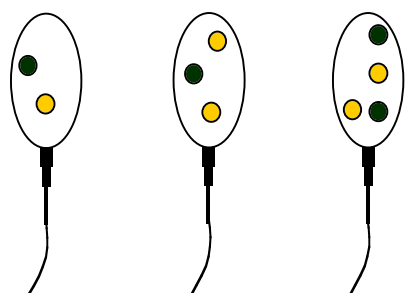
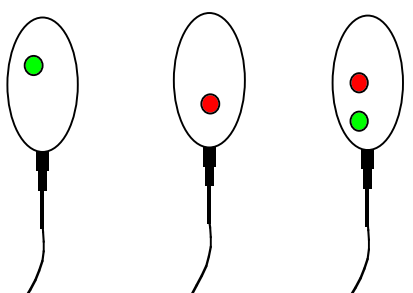
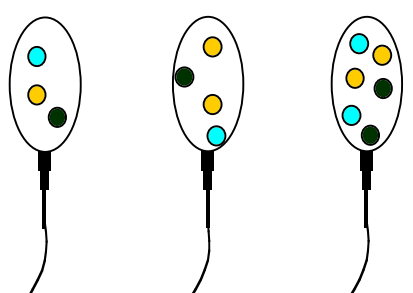
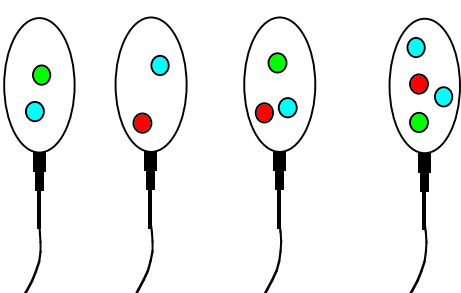
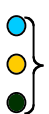


#### 3.5.2. Mètode aplicat:

La valoració la vàrem realitzar mitjançant un microscopi de fluorescència equipat amb filtres específics per cadascú dels fluorocroms utilitzats, així com un filtre triple que ens permetia la visualització conjunta de la contraincisió nuclear i els diferents tipus de senyals d'hibridació. El microscopi estava dotat d'un sistema de fotografia i d'una càmera de vídeo que ens permetia la captació d'imatges per ordinador.

A continuació descriurem les particularitats que presenta cadascuna de les valoracions.

##### 3.5.2.1 Mostres de semen

La ploïdia dels espermatozoides es determinava tenint en compte la distribució dels senyals d'hibridació (Figura 1, pàgina 37). Mentre que una anàlisi objectiva dels autosomes

	AUTOSOMES	GONOSOMES
FISH MONOCOLOR	 <p>Haploide      Disòmic/ Diploide</p>	 <p>Portador X      ?      Disòmic XX/ Diploide</p>
FISH BICOLOR	 <p>Haploide      Disòmic      Diploide</p>	 <p>Portador X      Portador Y      Disòmic XY/ Diploide</p>
FISH TRICOLOR	 <p>Haploide      Disòmic      Diploide</p>	 <p>Portador X      Portador Y      Disòmic XY      Diploide</p>
<p>          Senyals d'hibridació específiques de tres autosomes diferents           Senyal d'hibridació específic del cromosoma X           Senyal d'hibridació específic del cromosoma Y       </p>		

**Figura 1:** Determinació de la ploïdia dels espermatozoides en funció del nombre de senyals d'hibridació i del nombre de sondes de DNA utilitzades.



implicava la participació de com a mínim dues sondes de DNA, la valoració dels cromosomes sexuals es realitzava combinant com a mínim tres sondes, atès que els espermatozoides poden ser portadors del cromosoma X o del cromosoma Y.

D'altra banda, ja hem remarcat a la introducció la importància d'establir uns criteris de valoració clars en aquests tipus d'estudis. En aquest sentit, els espermatozoides es van analitzar d'acord amb els següents criteris:

- Aquells espermatozoides superposats els uns amb els altres o sense una clara delimitació cel·lular van ser exclosos de l'estudi.
- En el cas d'espermatozoides disòmics o diploides, tots els senyals d'hibridació havien de tenir la mateixa intensitat i estar separats entre ells per una distància superior al diàmetre de cada senyal.
- Les nul·lisomies no es varen analitzar directament, considerant la seva incidència equivalent a la de disomies.

### **3.5.2.2. Biòpsies testiculars**

En aquest tipus de material hem analitzat tres tipus cel·lulars: espermatozoides, cèl·lules germinals interfàsiques i cèl·lules germinals en l'estadi de profase I.

#### *Espermatozoides*

Òbviament, la determinació del contingut cromosòmic dels espermatozoides testiculars s'ha realitzat de la mateixa manera que els espermatozoides provinents de mostres de semen (Figura 1, pàgina 37). Ara bé, en aquest cas la valoració presenta algunes singularitats. En aquest sentit, un dels inconvenients d'analitzar espermatozoides per FISH és que de vegades no s'observa la cua després de la contratació amb DAPI (vegeu l'apartat 3.4., pàgina 34). Aquest problema no afecta excessivament la valoració d'espermatozoides provinents de mostres de semen, atès que són el tipus cel·lular majoritari en aquest material. Ara bé, en el cas de l'anàlisi d'espermatozoides testiculars, no veure la cua pot fer que es valorin erròniament com a espermatozoides altres cèl·lules haploides presents a les biòpsies testiculars. Per evitar això, abans

d'aplicar la tècnica de FISH, realitzàvem una recerca dels espermatozoides per contrast de fases anotant les coordenades de cada cèl·lula que observàvem. Al mateix temps, les imatges amb espermatozoides eren captades amb una càmera de vídeo i digitalitzades mitjançant un ordinador PC dotat amb una placa de vídeo Matrox Comet (versió 1.21). Aquestes imatges eren emmagatzemades amb un codi d'identificació i s'utilitzaven després de realitzar la hibridació per facilitar-nos la identificació i valoració dels espermatozoides.

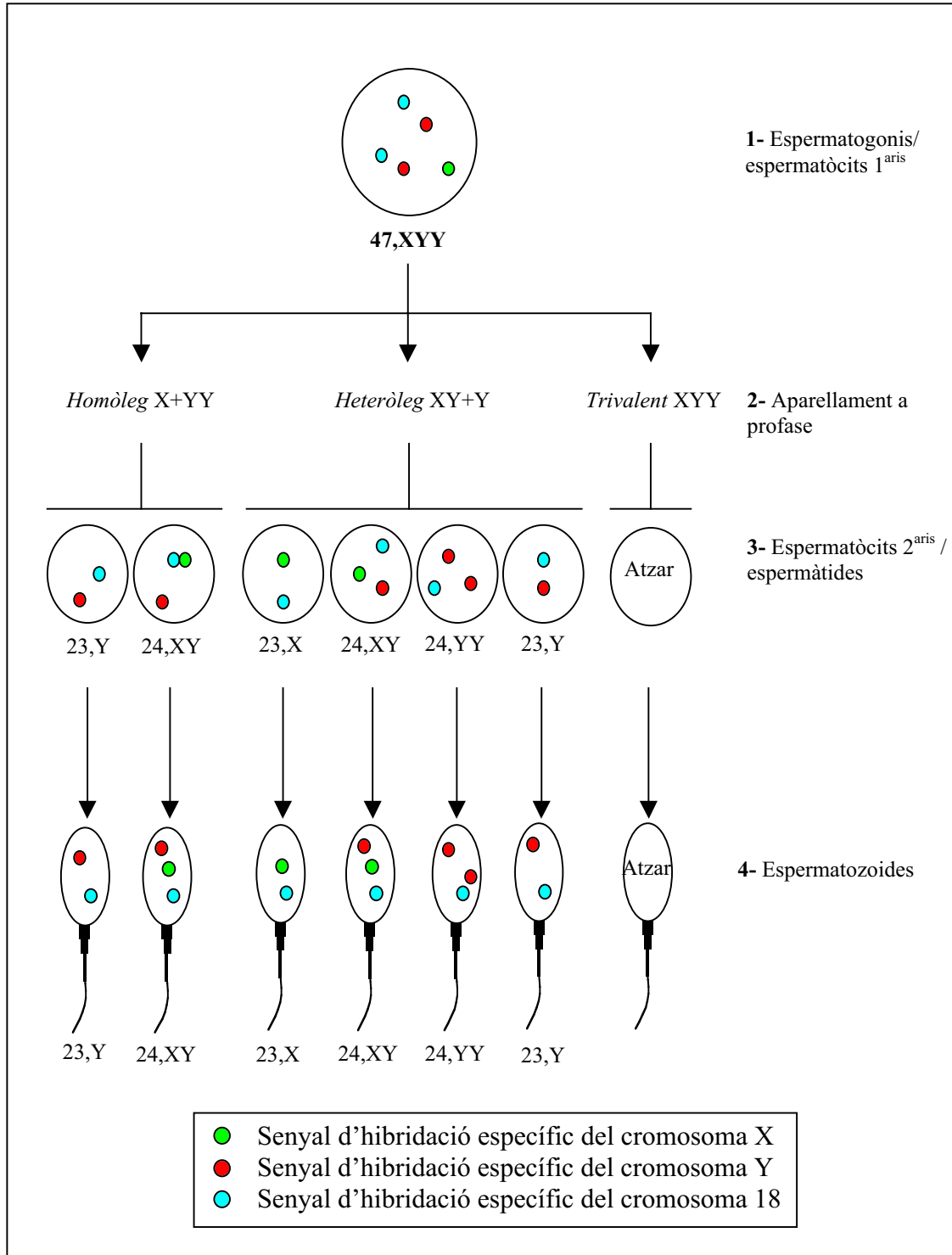
#### *Cèl·lules d'espermatogènesi interfàsiques*

Aquestes cèl·lules provenien en tots els casos de les biòpsies testiculars dels individus amb anomalies numèriques pels cromosomes sexuals. En aquests casos l'objectiu era realitzar un seguiment d'aquests cromosomes durant les dues divisions meiotiques de la línia cel·lular aneuploide: XXY o XYY.

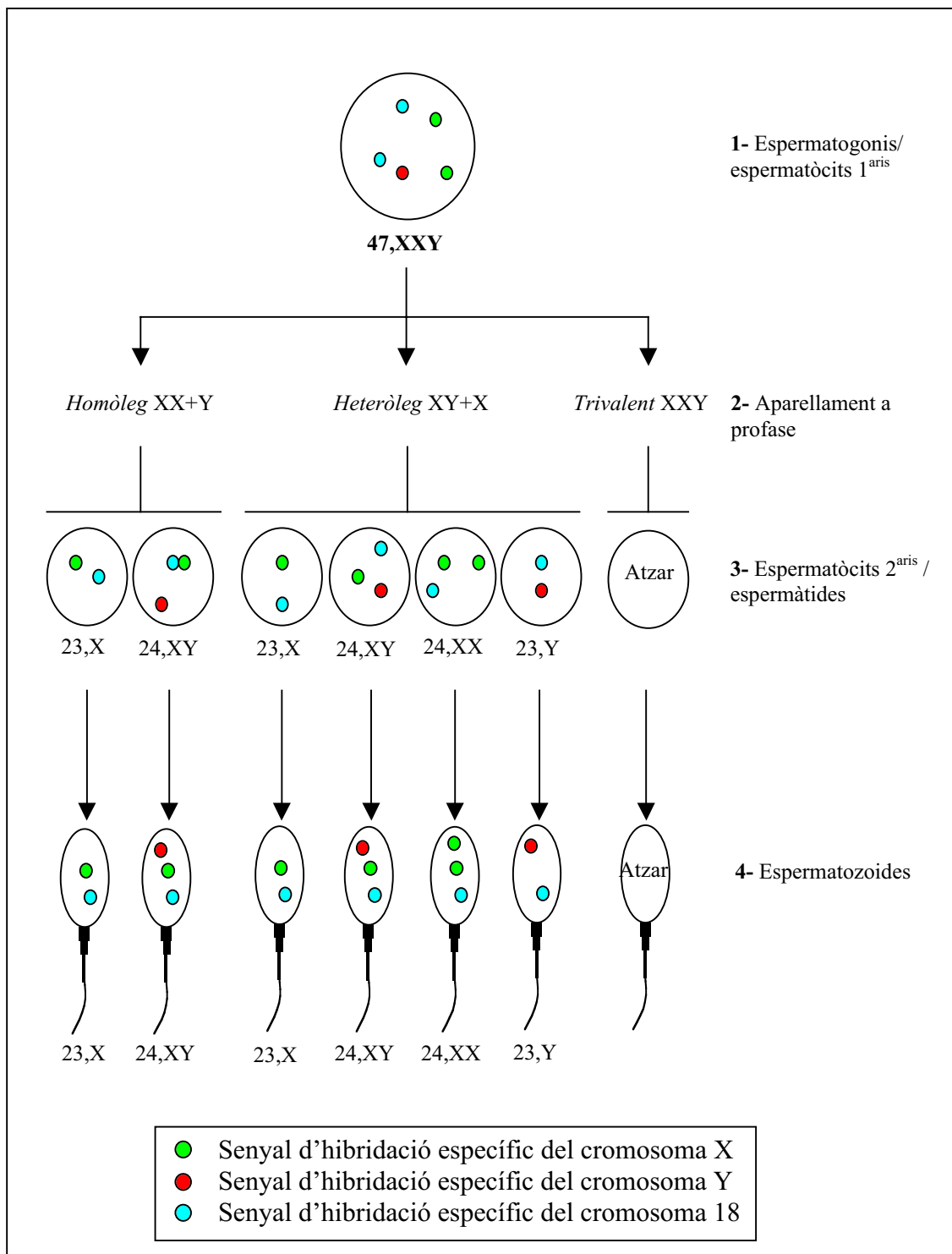
En conseqüència realitzàvem una FISH amb dues sondes específiques dels cromosomes X i Y, però a més era necessari incorporar una sonda per un autosoma (cromosoma 18) que permetés diferenciar les cèl·lules espermatogèniques diploides de les haploides. Així, un nucli amb dues senyals d'hibridació per l'autosoma era catalogat com a cèl·lula espermatogènica diploide: espermatogoni o espermatòcit primari. En canvi, els nuclis amb un sol senyal d'hibridació per l'autosoma eren valorats com a espermatòcits secundaris o espermàtides. Aquesta informació, juntament amb el nombre i tipus de senyals d'hibridació pels cromosomes sexuals possibilitava realitzar un seguiment dels gonosomes durant les dues divisions meiotiques d'acord amb els models teòrics proposats a les figures 2 i 3 (pàgines 40 i 41 respectivament).

#### *Aparellament dels cromosomes sexuals a paquitè*

L'anàlisi de l'aparellament dels cromosomes sexuals a paquitè ens ha ajudat a completar l'estudi del comportament d'aquests cromosomes a meiosi (Figures 2 i 3, pàgines 40 i 41 respectivament).



**Figura 2:** Models teòrics de segregació dels cromosomes sexuals de la línia cel·lular aneuploide 47,XYY.



**Figura 3:** Models teòrics de segregació dels cromosomes sexuals de la línia cel·lular aneuploide 47,XXY.

Aquests tipus de valoració s'ha realitzat de la següent manera:

- 1- Recerca de les figures meiòtiques en l'estadi de paquitè mitjançant un microscopi de contrast de fases.
- 2- Anotació de les coordenades i emmagatzematge de les imatges a l'ordinador.
- 3- Hibridació *in situ* fluorescent de tres colors amb sondes centromèriques pels cromosomes 18, X i Y.
- 4- Valoració de la disposició dels senyals d'hibridació i emmagatzematge de les imatges a l'ordinador.
- 5- Realitzar una segona ronda d'hibridació, aplicant la metodologia de FISH seqüencial, combinant les sondes de DNA total del cromosoma X amb la sonda específica de la regió heterocromàtica del cromosoma Y (DYZI).
- 7- Valoració de la disposició dels senyals d'hibridació i emmagatzematge de les imatges a l'ordinador.
- 8- Per últim, els paquitens eren classificats en funció de la disposició dels senyals d'hibridació dels cromosomes sexuals a les dues rondes de FISH d'acord amb els següents criteris:
  - Aparellament XY normal: Ambdues rondes de FISH presenten un senyal pel cromosoma X i un senyal pel cromosoma Y en contacte l'un amb l'altre.
  - Bivalent més univalent: Ambdues rondes de FISH presenten dos senyals d'hibridació en contacte més un senyal completament separat.
  - Configuració en trivalent: Ambdues rondes d'hibridació presenten tres senyals en contacte.

### 3.6. Recopilació i anàlisi estadística dels resultats

Donat que el percentatge d'aneuploïdies en gàmetes és relativament baix, aquests tipus d'estudis obliguen a l'anàlisi d'un nombre molt elevat d'espermatozoides si volem que els resultats obtinguts siguin extrapolables a la resta de la població.

Així, vam analitzar al voltant de 10.000 espermatozoides per cromosoma i per individu sempre i quan les particularitats de la mostra ens ho permetien (són excepció a aquesta norma els individus oligozoospermics amb recomptes cel·lulars inferiors a 20 milions d'espermatozoides per mil·lilitre).

L'anàlisi estadística dels resultats es va realitzar mitjançant el programa d'ordinador InStat 2.01 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) amb un nivell de significació del 0,05. Vam aplicar per a cadascuna de les qüestions plantejades els següents tests estadístics:

- Per determinar si els cromosomes analitzats presentaven la mateixa freqüència basal de disomies a cadascuna de les poblacions estudiades vam aplicar una t-Student no aparellada de dues cues.
- Per determinar si la incidència d'anomalies per un determinat cromosoma era la mateixa entre els diferents individus o poblacions analitzades vam aplicar el test de la Chi-quadrat.
- Per determinar si la relació d'espermatozoides portadors del cromosoma X o Y s'ajusta a la proporció 1:1 esperada vam aplicar el test de la chi-quadrat o el test de la F de Fisher.

## **4. RESULTATS I DISCUSSIÓ**

#### **4.1. Objectius assolits**

**Objectiu 1:** Establir la freqüència de disomies pels cromosomes 6, 18, 21, X i Y en espermatozoides provinents d'individus controls. Articles 1 i 2.

**Objectiu 2:** Determinar la freqüència de disomies pel cromosoma 21 en espermatozoides provinents de pares d'individus amb la Síndrome de Down, a fi d'estimar la seva possible relació amb l'origen parental del cromosoma extra en els fills afectes. Article 3.

**Objectiu 3:** Valorar l'efecte intercromosòmic pel cromosoma 21 en individus portadors de reorganitzacions cromosòmiques estructurals. Articles 4 i 5.

**Objectiu 4:** Analitzar la segregació meiótica dels cromosomes afectats en individus portadors d'anomalies cromosòmiques.

**4a.** Individus portadors de translocacions cromosòmiques recíproques. Article 4.

**4b.** Individus portadors d'anomalies numèriques dels cromosomes sexuals. Articles 2 i 6.



## **4.2. Articles**

### **4.2.1. Article 1**

Títol: Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization

Autors: Joan Blanco, Josep Egozcue, Francesca Vidal

Revista científica: Human Reproduction

Cita bibliogràfica: Any 1996, volum 11, pàgines 722-726

Índex d'impacte: 3.650

#### **4.2.2. Article 2**

Títol: Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XYY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH)

Autors: Joan Blanco, Carmen Rubio, Carlos Simon, Josep Egozcue i Francesca Vidal

Revista científica: Human Genetics

Cita bibliogràfica: Any 1997, volum 99, pàgines 413-416

Índex d'impacte: 2.455

### **4.2.3. Article 3**

Títol: Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in a population with a high prevalence of Down Syndrome: Increased incidence in cases of paternal origin

Autors: Joan Blanco, Elisabeth Gabau, David Gómez, Neus Baena, Miriam Guitart i Francesca Vidal

Revista científica: American Journal of Human Genetics

Cita bibliogràfica: Any 1998, volum 63, pàgines 1067-1072

Índex d'impacte: 10.244

#### **4.2.4. Article 4**

Títol: FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and inter-chromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13)

Autors: Joan Blanco, Josep Egozcue, Núria Clusellas i Francesca Vidal

Revista científica: Cytogenetics and Cell Genetics

Cita bibliogràfica: Any 1998, volum 83, pàgines 275-280

Índex d'impacte: 2.466

#### **4.2.5. Article 5**

Títol: Interchromosomal effects in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei

Autors: Joan Blanco, Josep Egozcue i Francesca Vidal

Revista científica: Human Genetics

Cita bibliogràfica: En premsa

Índex d'impacte: 2.455

# **INTERCHROMOSOMAL EFFECTS FOR CHROMOSOME 21 IN CARRIERS OF STRUCTURAL CHROMOSOME REORGANIZATIONS DETERMINED BY FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION ON SPERM NUCLEI**

Joan Blanco, Josep Egozcue and Francesca Vidal

## **Abstract**

Using dual color fluorescence in situ hybridization (FISH) on decondensed sperm heads from four carriers of structural chromosome reorganizations: t(3;15), t(7;Y), t(13;22) and inv(9), we have assessed the possible existence of an interchromosomal effect (ICE) on the segregation of chromosome 21.

In the carriers of t(7;Y), t(13;22) and inv(9) all results were within the limits described in controls. A highly significant increase ( $p < 0.0001$ ) of disomy 21 (1.90% v. 0.37%) that could be considered as a positive ICE was observed in the t(3;15) carrier. Furthermore, significantly higher percentages ( $p < 0.0001$ ) of diploid sperm (5.71% v. 0.27%) were also observed in this patient.

Our results suggests that the occurrence of an ICE may depend on the reorganization and on the chromosome and chromosome regions involved, resulting in a particular meiotic behaviour (presence of unsynapsed regions, preferential meiotic configurations) that could lead to the observed increase in chromosome 21 disomies.

Further studies using this technical approach in a wide range of structural reorganizations could help to elucidate the real occurrence of interchromosomal effects.

## **Introduction**

In 1963, Lejeune detected an excess of carriers of balanced reciprocal translocations among the fathers of children with trisomy 21, and suggested that the presence of

structural reorganizations could have an effect on the segregation of other chromosome pairs during meiosis.

Since then, several authors have carried out epidemiological studies to detect the possible existence of an interchromosomal effect (ICE), between different types of chromosomal reorganization such, as reciprocal translocations (Aurias et al. 1978; Lindenbaum et al. 1985; Couzin et al 1987), Robertsonian translocations (Mikkelsen 1971) or inversions of the heterochromatic region of chromosome 9 (Serra et al. 1990), and the existence of Down syndrome in the offspring of the carriers.

Although in some cases the results seemed to indicate a possible relationship between the presence of a balanced reorganization and trisomy 21, other epidemiological studies (Uchida and Freeman 1986; Schinzel et al. 1992) failed to confirm it, and pointed out that the design of the studies and/or the fertility problems of the couples involved led to the inclusion of older women who, by definition, have an increased risk of non disjunction.

Synaptonemal complex studies have shown that the presence of a structural reorganization can give rise to interchromosomal effects resulting in pairing anomalies and/or a reduction in the number of chiasmata at pachytene (Vidal et al. 1982; Saadallah and Hultén 1986; Batanian and Hultén 1987), and to the production of heterosynapses between the chromosomes involved in the reorganization and the sex vesicle (Luciani et al. 1984; Gabriel-Robez et al. 1986; Guichaoua et al. 1990; Navarro et al. 1991) or with other partially unpaired autosomal bivalents (Vidal et al. 1987) resulting in a meiotic arrest or in the production of chromosomally unbalanced spermatozoa (Balkan and Martin 1983; Burns et al. 1986; Templado et al. 1988). Unfortunately, the final result of any type of interchromosomal effect was difficult to study in humans, because, even using the heterologous fertilization of hamster oocytes with human spermatozoa (Rudak et al. 1978), the number of cells that could be analysed was very limited.

In recent years, the use of fluorescent in situ hybridization (FISH) on decondensed sperm heads (reviewed in Downie et al. 1997; Egozcue et al. 1997) has allowed to

analyse high numbers of spermatozoa, thus providing a statistically valid method to study the results of a given interchromosomal effect. So far, however, only a limited number of studies have been carried out with positive (Rousseaux et al. 1995) and negative results (Colls et al. 1997; Van Hummelen et al. 1997; Martini et al. 1997; Blanco et al. 1998a; Cifuentes et al. 1999).

In this work, using FISH on decondensed sperm heads, we have evaluated the possible existence of an ICE on the segregation pattern of chromosome 21 in four carriers of balanced reorganizations: t(3;15), t(7;Y), t(13;22) and inv (9).

## **Material and Methods**

### *Donors*

- A 47 year-old reciprocal translocation carrier t(3;15)(p25;q15), ascertained after three years of infertility. Seminal parameters (WHO, 1992) showed severe oligoasthenozoospermia ( $<10^5$  sperm/ml).
- A 41 year-old reciprocal translocation carrier t(7;Y)(p11;q13), ascertained after 15 years of infertility and after his wife had experienced two spontaneous abortions. Seminal parameters revealed severe oligoasthenozoospermia ( $1 \times 10^6$  sperm/ml).
- A 28 year-old carrier of a t(13;22) Robertsonian translocation, ascertained for infertility. Seminal parameters showed severe oligoasthenozoospermia ( $9 \times 10^5$  sperm/ml).
- A 37 year-old fertile male carrier of an inv(9)(p12;q12), ascertained after a routine cytogenetic analysis. Semen parameters were normal.

Our institutional ethics committee approved the protocol of study, and written informed consent was obtained from all individuals involved.

### *Sample preparation and FISH processing*



Semen samples were obtained by masturbation. Samples were fixed in methanol: acetic acid (3:1) and processed for FISH analysis. Sperm nuclei were decondensed by slide incubation in 5 mM dithiothreitol (DTT) and 1% Triton X-100. Details of sperm fixation, nuclear decondensation and FISH processing have been previously described (Vidal et al. 1993).

In all patients, a locus-specific probe for chromosome 21, spanning the 21q22.14-q22.3. region, directly labelled with Spectrum Orange (LSI 21, Spectrum Orange, Vysis Inc. Downers Grove, IL 60515, USA) and a centromeric probe for chromosome 6, directly labelled with Spectrum Green (CEP 6, Spectrum Green, Vysis Inc. Downers Grove, IL 60515, USA) were used for the FISH study. The protocol of denaturation, incubation and detection followed manufacturer's instructions (Vysis Inc., Downers Grove, IL).

#### *Microscope evaluation and statistical analysis*

Analyses were done using an Olympus BX60 epifluorescence microscope equipped with specific filter sets for FITC, Texas Red, Aqua and DAPI/Texas Red/FITC/Aqua following the strict assessment criteria previously described by us (Blanco et al. 1996), briefly: (i) overlapped spermatozoa or sperm heads without a well defined boundary were not evaluated; (ii) in cases of disomy or diploidy, all signals should have the same intensity, and be separated from each other by a distance longer than the diameter of each signal; and (iii) nullisomies were not directly scored and were conservatively considered as equivalent to the incidence of disomies. The efficiency of hybridization was calculated as the number of haploid spermatozoa plus twice the percentage of disomic spermatozoa plus the percentage of diploid sperm.

For each individual, the percentage of haploid sperm, sperm disomic for chromosome 21, sperm disomic for chromosome 6 and finally the percentage of diploid spermatozoa was assessed.

Data obtained from structural abnormalities carriers were statistically compared using the Chi-square test (InStat 2.01 program Graph Pad, USA) to data from our control population, already published (Blanco et al. 1996).

## Results

Overall, we analysed 20853 sperm nuclei from the four carriers studied. The number of spermatozoa scored per individual was variable, and directly related to the characteristics of their semenograms. Mean hybridization efficiency was 94.8% (range 90.70%-99.19%).

In the carriers of t(13;22) and inv(9) we analysed about 10000 spermatozoa per case (Table 1). In the carriers of t(3;15) and t(7;Y) the number of sperm cells in their ejaculate was extremely low thus reducing considerably the number of scored sperm (Table 1).

The results obtained in the carriers of balanced reorganizations compared to our control series are shown in Table 1. In the carriers of t(7;Y), t(13;22) and inv(9) all results were within normal limits. However, a highly significant increase ( $p < 0.0001$ ) of disomy 21 (1.90% v. 0.37%) and of diploid sperm (5.71% v. 0.27%) was observed in the t(3;15) carrier. The percentage of disomy for chromosome 6, although increased in this patient (0.48% v. 0.13%), did not reach significance levels.

## Discussion

The possible occurrence of interchromosomal effects, relating the presence of a structural reorganization to the abnormal segregation of other chromosome pairs resulting in an increase of aneuploidy in the gametes and, finally, to an increased incidence of a given chromosome aneuploidy in the offspring is still controversial more than thirty-five years after its proposal (Lejeune 1963).

Looking for an increase of aneuploidy in spermatozoa using sperm karyotyping, positive ICE has only been reported in three of the 33 reciprocal translocation carriers studied (Balkan and Martin 1983; Burns et al 1986; Templado et al. 1988) but not in Robertsonian translocation



carriers (Martin 1988; Pellestor et al. 1987; Pellestor 1990; Syme and Martin 1992) or in pericentric inversion carriers (Balkan et al. 1983; Martin 1991; Jenderny 1992; Martin 1993; Navarro et al. 1993; Martin et al. 1994). However, it has been postulated that the small number of sperm karyotypes analyzed using this technique could prevent the detection of the expected moderate increases in disomy resulting from ICE. Furthermore, structural reorganization carriers with an associated severe impairment of spermatogenesis are very difficult to analyze.

The use of FISH in decondensed sperm nuclei overcomes these limitations and has proven to be a reliable approach for the analysis of sperm disomies even when low, although significant increases are evaluated (Downie et al. 1997; Egozcue et al. 1997).

The inversion of the heterochromatic region of chromosome 9 is nowadays considered as a polymorphism; however epidemiological studies suggested (Wang and Hamerton, 1979; Neri et al. 1981; Serra et al. 1990) the possible implication of this reorganization in the production of trisomy 21. Furthermore, based on the classical observation that 9q heterochromatin interacts with the acrocentric chromosomes during meiosis (Stahl et al. 1975) it has been postulated that this association could lead to an increased incidence of disomies for the acrocentric chromosomes in some cases of pericentric inversion carriers.

So far, FISH analysis on sperm nuclei to investigate this hypothesis have only been performed in a single male heterozygous for the pericentric inversion 9 (p11;q13), and no increase in the incidence of disomies for chromosome 21 was reported (Colls et al. 1997). The disomy rate found in the present paper is equivalent to the frequencies reported in the control population (Blanco et al. 1996) and no evidence for an ICE was either found in our inv(9) carrier. In conclusion, data obtained so far are consistent with data arising from sperm chromosome studies in inversion carriers, and do not support the existence of ICE for chromosome 21 in these individuals.

To our knowledge, the only previous published study in Robertsonian translocation carriers using FISH in decondensed sperm nuclei was undertaken by Rousseaux et al

(1995) in a t(14;22) carrier. Although these authors did not address the study to chromosome 21 disomies, they reported an increased incidence of chromosome 1 disomies (considered as a positive ICE) and of diploid sperm in their patient. In our study, the level of chromosome 21 disomies and diploidy observed in the t(13;22) patient were equivalent to those obtained in the control population. The fact that a Robertsonian translocation carrier could show an increased frequency of disomy in spermatozoa, while others did not, should be related to the type and the characteristics of the reorganized segments. In fact, results from the human-hamster system have revealed that the frequency of unbalanced sperm is quite variable in carriers of Robertsonian translocations (from 3.4% Syme and Martin 1992 to 27% Martin 1988). In the same way, the existence of an ICE may also depend on the chromosomes involved. Further FISH studies assessing disomy rates in Robertsonian translocation carriers for the same reorganization, may shed more light on the real occurrence of ICE in these individuals.

In our study, the only increase in the disomy rate for chromosome 21 that could be considered as a positive ICE was observed in the case of the t(3;15) reciprocal translocation carrier. Previous to our report, only four reciprocal translocation carriers (Van Hummelen et al. 1997; Blanco et al. 1998; Martini et al. 1998; Cifuentes et al. 1999) have been studied by FISH after sperm nuclear decondensation specifically assessing for a possible ICE involving chromosome 21, and none of them detected any increase in the baseline frequency of disomy for chromosome 21. Reports from sperm chromosome karyotyping have shown that the main factors related to the highly variable frequency of unbalanced sperm (18.5% to 77%; Pellestor et al. 1997) observed in reciprocal translocation carriers are the characteristics of the chromosome segments involved in the reorganization, thus resulting in a particular meiotic behaviour that could also explain the presence or absence of an ICE in a given reciprocal translocation carrier.

It has to be noted that the length of the translocated segments of chromosome 3 in the t(3;15) carrier is the shortest of all chromosome segments found in the patients analysed so far, including a t(5;8) carrier previously published (Blanco et al. 1998a). Shorts

segments give rise to the formation of asymmetrical quadrivalents at pachytene. Meiotic studies have shown that asymmetrical quadrivalents, with at least one short segment, lead to the production of chain configurations at metaphase I (Speed 1989) and, in consequence, to the presence of unpaired regions. Furthermore, it has been reported that the unsynapsed segments of the reorganized chromosomes may associate to other bivalents thus leading to synaptic anomalies (Vidal et al. 1987; Batanian and Hultén 1987; Goldman and Hultén 1993) and increasing the rate of non disjunction of other chromosome pairs; this could be the case in the t(3;15) carrier.

Nevertheless, it could be argued that the increase of aneuploidy observed could be due to the severe oligoasthenozoospermia of this patient, and not to the presence of the reorganization. In fact, several reports have described increases of aneuploidy in men showing severe seminal impairment (Rubio et al. 1999; Pang et al. 1999; Aran et al. in press). Furthermore, the other positive case reported by Rousseaux et al. (1995) was also an oligoasthenoteratozoospermic man. It is well known that many translocation carriers are infertile, showing moderate to severe impairment of their spermatogenesis (de Braekeleer and Dao 1991).

Classical meiotic studies have shown that the different degrees of meiotic arrest, that could explain the oligozoospermia observed in these cases, are due to the meiotic disruption associated to the presence of the reorganized chromosomes. So, it has been assumed for years that the chromosomal reorganization is the main cause of the infertility in these individuals. Therefore, the disomy level increase for chromosome 21 in the t(3;15) could be considered as due to the presence of the translocation. In fact, it could even be postulated that the positive ICE observed might contribute to the infertility of the patient.

Another interesting observation is the increase in diploid sperm detected in the carrier of t(3;15). So far, increases in the frequency of diploid sperm have been detected in infertile males (Egozcue et al. 1997; Pang et al. 1995; In't Veld et al. 1997; Pieters et al. 1998), in carriers of balanced reorganizations (Rousseaux et al. 1995; Van Hummelen et al. 1997;

Blanco et al. 1998a), and in older men (Bosch et al. 1998; Rousseaux et al. 1998). These conditions are known to be related to synaptic anomalies (Egozcue et al. 1983; Templado et al. 1984). According to Saadallah and Hultén (1986), severe synaptic failures would result in a meiotic arrest that could only be rescued through heterosynapsis; if heterosynapses are established, meiosis is resumed. But the available evidence suggests that, for some unknown reason, after overcoming the arrest at the anaphase checkpoint (Nicklas 1998) chiasmata are resolved, and the cell skips cytokinesis to enter a diploid meiosis II, with amphitelic orientation of the centromeres, to produce diploid sperm. This might be a partial explanation for the extremely high (11-12%) incidence of triploidy in human abortions (reviewed in Bulletti et al. 1996).

As discussed, our results support the occurrence of interchromosomal effects in some cases of structural reorganizations. But, how this moderate increase, even if significant, could result in an increase of a given type of aneuploidy in the offspring, as postulated in Lejeune's hypothesis? Unfortunately we do not have any arguments to answer this question with numerical figures. However, several sets of data indicate that in different situations in which meiosis is disturbed, moderate increases of a given type of disomy in spermatozoa are related to an increase of aneuploidy in the offspring, which is much higher than expected taking into account the increase observed in spermatozoa at its face value. For instance, the detection of a moderate increase of sex chromosome disomy in spermatozoa from infertile patients (Egozcue et al. 1997; Finkelstein et al. 1998; Pang et al. 1999; Aran et al. in press) has been related to an increase in sex chromosome aneuploidy in children conceived by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) (In't Veld et al. 1995; Liebaers et al. 1995; ESHRE Task force on ICSI, 1998; Moosani et al. 1999). Furthermore, some fathers of Down syndrome children of paternal origin have been shown to have increased frequencies of disomy 21 in their spermatozoa (Blanco et al. 1998b) and one father of Turner syndrome monozygotic twins of paternal origin has been shown to have an increased frequency of sex chromosome nullisomy in his sperm (Martínez-Pasarell et al. 1999).



Finally, the development of new assisted reproduction techniques in the last years, in particular ICSI, has allowed a good number of previously sterile men to reproduce. Infertility is often associated with chromosome abnormalities (Egozcue et al. 1983; de Braekeleer and Dao, 1991). Taking into account our results, these abnormalities could have two genetic consequences in the offspring: first, the production of recombination aneusomies through the abnormal segregation of the affected chromosomes during meiosis I, and second an increased incidence of numerical abnormalities for some chromosomes not implicated in the reorganization.

At present, the use of preimplantational genetic diagnosis techniques (PGD) in these cases allows to select normal embryos if a proper combination of DNA probes is used (Coonen et al. 1998; Scriven et al. 1998; Vidal et al. 1998). Furthermore, when the carrier is the male partner, FISH on decondensed sperm heads to analyse meiotic segregation prior to PGD is suggested (Van Assche et al. 1999; Vidal et al. 1999) in order to evaluate the percentage of abnormal sperm. These patients are excellent candidates to be screened for ICE both to offer the patients a more accurate genetic counsel and to contribute to accept or reject the existence of ICE.

In conclusion, our results support the occurrence of ICE in particular cases of structural chromosome reorganizations, depending on the reorganization and on the chromosome and chromosome regions involved. Although, the number of studies using FISH on decondensed sperm nuclei to assess the occurrence of ICE in reorganization carriers is still scarce, the technique has proven to be reliable to investigate this phenomenon. Using this feasible technical approach, further studies of additional donors with a wide range of structural reorganizations could help to elucidate the real occurrence of interchromosomal effects. Finally, if we assume the risk of ICE, extensive FISH studies on decondensed sperm heads should be taken into consideration to offer the patients a more accurate genetic counsel prior to PGD.

## **Acknowledgments**

This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria (project nº 96/1992-01) and by Fundación Salud-2000.

We thank Instituto Valenciano de Infertilidad (València-Spain) and Prenatal Genetics SL (Barcelona-Spain) for providing the semen samples of structural reorganization carriers.

## **References**

- Arán B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, Egozcue J, Veiga A (in press) Screening for abnormalities of chromosomes X, Y and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men included in a IVF-ICSI programme. *Fertil Steril*.
- Aurias A, Prieur M, Dutrillaux B, Lejeune J (1978) Systematic analysis of 95 reciprocal translocations of autosomes. *Hum Genet* 45:259-282.
- Balkan W, Martin RH (1983) Chromosome segregation into the spermatozoa of two men heterozygous for different reciprocal translocation. *Hum Genet* 63:345-348.
- Balkan W, Burns K, Martin RH (1983) Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 3. *Cytogenet Cell Genet* 35:295-297.
- Batanian J, Hultén MA (1987) Electron microscopic investigations of synaptonemal complexes in an infertile human male carrier of a pericentric inversion *inv(1)(q32;q42)*: regular loop formation but defective synapsis including a possible interchromosomal effect. *Hum Genet* 76:81-86.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F (1996) Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 11:722-726.

- Blanco J, Egozcue J, Clusellas N, Vidal F (1998a) FISH in sperm heads allow the analysis of the chromosome segregation and interchromosomal effects in carriers of structural reorganizations. Results in a translocation carrier t(5;8)(q33;q13). *Cytogenet Cell Genet* 83:275-280.
- Blanco J, Gabau E, Gómez D, Baena N, Guitart M, Egozcue J, Vidal F (1998b) Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 in a population with a high prevalence of Down's syndrome. Increased incidence in cases of paternal origin. *Am J Hum Genet* 63:1067-1072.
- Bosch M, Egozcue J, Templado C (1998) Numerical abnormalities in spermatozoa of aged men by multicolor FISH. *Cytogenet Cell Genet* 81:148 (suppl).
- Bulletti C, Flamigni C, Giacomucci E (1996) Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 2:118-136.
- Burns J, Koduru P, Alonso M, Chaganti R (1986) Analysis of meiotic segregation in a man heterozygous for two reciprocal translocation using the hamster in vitro penetration system. *Am J Hum Genet* 38:954-964.
- Cifuentes P, Navarro J, Blanco J, Vidal F, Mínguez L, Egozcue J, Benet J (1999) Cytogenetic analysis of sperm chromosomes and sperm nuclei in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) by in situ hybridisation. *Eur J Hum Genet* 7:231-238.
- Colls P, Blanco J, Martínez-Pasarell O, Vidal F, Egozcue J, Márquez C, Guitart M, Templado C (1997) Chromosome segregation in a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(9)(p11q13), analyzed by using sperm karyotyping and two-color fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 99:761-765.
- Coonen E, Hopman A, Geraedts J, Ramaekers F (1998) Application of in-situ hybridization techniques to study human preimplantation embryos: a review. *Hum Reprod Update* 4:135-152.

- Couzin DA, Watt JL, Stephen GS (1987) Structural rearrangements in the parents of children with primary trisomy 21. *J Med Genet* 24:280-282.
- de Braekeleer M and Dao T-N (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6:245-250.
- Downie S, Flaherty S, Matthews C (1997) Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 3:585-598.
- Egozcue J, Templado C, Vidal F, Navarro J, Morer-Fargas F, Marina S (1983) Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum Genet* 65:185-188.
- Egozcue J, Blanco J, Vidal F (1997) Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 3:441-452.
- ESHRE task force on intracytoplasmic sperm injection (1998) Assisted reproduction by intracytoplasmic sperm injection: a survey on the clinical experience in 1994 and the children born after ICSI, carried out until 31 December 1993. *Hum Reprod* 13:1737-1746.
- Finkelstein S, Mukamel E, Yavetz H, Paz G, Avivi L (1998) Increased rate of nondisjunction in sex cells derived from low-quality semen. *Hum Genet* 102:129-137.
- Gabriel-Robez O, Ratomponirina C, Dutrillaux B, Carré-Pigeon F, Rumpler Y (1986) Meiotic association between the XY chromosomes and the autosomal quadrivalent of a reciprocal translocation in two infertile men, 46,XY,t(19;22) and 46,XY,t(17;21). *Cytogenet Cell Genet* 43:154-160.
- Goldman A and Hultén MA (1993) Analysis of chiasma frequency and first meiotic segregation in a male reciprocal translocation heterozygote, t(1;11)(p36.3;q13.1), using fluorescence in situ hybridisation. *Cytogenet Cell Genet* 63:16-23.
- Guichaoua MR, Quack B, Speed RM, Noel B, Chandley AC, Luciani JM (1990) Infertility in human males with autosomal translocations: meiotic study of a 14;22 robertsonian translocation. *Hum Genet* 86:162-166.

- In't Veld PA, Brandenburg H, Verhoeff A, Dnont M, Los F (1995) Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 346:773.
- In't Veld PA, Broekmans F, de France H, Pearson P, Pieters MH, van Kooij (1997) Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. *Hum Reprod* 12:752-754.
- Jerdenmy J (1992) Sperm chromosome analysis of two males heterozygous for a t(2;17)(q35;p13) and t(3;8)(p13;q21) reciprocal translocation. *Hum Genet* 90:171-173.
- Lejeune J (1963) Autosomal disorders. *Pediatrics* 32:326-337.
- Liebaers I, Bonduelle M, Legein J, Wilikens A, Van Assche E, Buysse A, Wisanto A, Devroey P, Steirteghem AC (1995) Follow-up of children born after intracytoplasmic sperm injection. In: Hedon B, Bringer J, Mares P (eds) *Fertility and Sterility. Proceedings of the 15th World Congress on Fertility and Sterility*. Parthenon, London, pp 409-412.
- Lindenbaum RH, Hultén M, McDermott A, Seabright M (1985) The prevalence of translocations in parents of children with regular trisomy 21: a possible interchromosomal effect?. *J Med Genet* 22:24-28.
- Luciani JM, Guichaoua MR, Mattei A, Morazzani MR (1984) Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. Behavior of the trivalent and nonrandom association with the sex vesicle. *Cytogenet Cell Genet* 38:14-22.
- Martin RH (1988) Cytogenetic analysis of sperm from a male heterozygous for a 13;14 Robertsonian translocation. *Hum Genet* 80:357-361.
- Martin RH (1991) Cytogenetic analysis of sperm from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv (3)(p25q21). *Am J Hum Genet* 48:856-861.
- Martin RH (1993) Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(8)(p23q22). *Cytogenet Cell Genet* 62:199-202.

- Martin RH, Chernos JE, Lowry RB, Pattinson HA, Barclay L, Ko E (1994) Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 1. *Hum Genet* 93:135-138.
- Martínez-Pasarell O, Nogués C, Bosh M, Egozcue J, Templado C, (1999) Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 104:345-349.
- Martini E, von Bergh A, Coonen E, de Die-Smulders C, Hopman A, Ramaekers F and Geraedts J (1997) Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3;11)(q27.3;q24.3) by triple FISH. *Hum Genet* 102:157-165.
- Mikkelsen M (1971) Down's syndrome. Current stage of cytogenetic research. *Humangenetik* 12:1-28.
- Moosani N, Chernos J, Brian Lowry R, Martin RH (1999) A 47,XXY fetus resulting from ICSI in a man with an elevated frequency of 24,XY spermatozoa. *Hum Reprod* 14:1137-1139.
- Navarro J, Vidal F, Benet J, Templado C, Marina S, Egozcue J (1991) XY-trivalent association and synaptic anomalies in a male carrier of a Robertsonian t(13;14) translocation. *Hum Reprod* 6:376-381.
- Navarro J, Benet J, Martorell MR, Templado C, Egozcue J (1993) Segregation analysis in a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 7 (p13;q36) by sperm chromosome studies. *Am J Hum Genet* 53:214-219.
- Neri G, Tedeschi B, Serra A, Sanfilippo S (1981) Pericentric inversion of chromosome 9 and Down's syndrome: a retrospective and prospective family survey. *Clin Genet* 19:526-527.
- Nicklas RB (1998) Chance and checkpoint: accurate chromosome distribution in mitosis and meiosis. *Cytogenet Cell Genet* 81:100.

- Pang MG, Zackowski JL, Hoegerman SF, Moon SY, Cuticchia AJ, Acosta AA, Kearns WS (1995) Detection by fluorescence in situ hybridization of chromosome 7, 11, 12, 18, X and Y abnormalities from oligoasthenoteratozoospermic patients of an in vitro fertilization program. *J Assist Reprod Genet* 12: 53S (Suppl).
- Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, Kearns WG (1999) Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 14:1266-1273.
- Pellestor F, Sélé B, Jalbert H (1987) Chromosome analysis of spermatozoa from a male heterozygous for a 13;14 Robertsonian translocation. *Hum Genet* 76:116-120.
- Pellestor F (1990) Analysis of meiotic segregation in a man heterozygous for a 13;15 Robertsonian translocation and a review of the literature. *Hum Genet* 85:49-54.
- Pellestor F, Girardet A, Coignet L, Andréo B, Lefort G, Charlieu JP (1997) Cytogenetics analysis of meiotic segregation in sperm from two males heterozygous for reciprocal translocations using PRINS and humster techniques. *Cytogenet Cell Genet* 78:202-208.
- Pieters MH, Speed RM, de Boer P, Vreeburg JT, Dohle G, In't Veld PA (1998) Evidence of disturbed meiosis in a man referred for intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 351:957.
- Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Delafontaine D, Sélé B (1995) Sperm nuclei analysis of a Robertsonian t(14q21q) carrier, by FISH, using three plasmids and two YAC probes. *Hum Genet* 96:655-660.
- Rousseaux S, Hazzouri M, Pelletier R, Monteil M, Usson Y, Sélé B (1998) Disomy rates for chromosomes 14 and 21 studied by fluorescent in-situ hybridization in spermatozoa from three men over 60 years of age. *Mol Hum Reprod* 4:695-699.

- Rubio C, Simón C, Blanco J, Vidal F, Mínguez Y, Egozcue J, Crespo J, Remohí J, Pellicer A (1999) Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet* 16:253-258.
- Rudak E, Jacobs P, Yanagimachi R (1978) Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 247:911-913.
- Saadallah N, Hultén MA (1986) EM investigations of surface spread synaptonemal complexes in a human male carrier of a pericentric inversion inv(13)(p12q14): the role of heterosynapsis for spermatocyte survival. *Ann Hum Genet* 50:369-383.
- Schinzel AA, Adelsberger PA, Binker F, Basaran S, Antonarakis SE (1992) No evidence for a paternal interchromosomal effect from analysis of the origin of nondisjunction in Down syndrome patients with concomitant familial chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet* 50:288-293.
- Scriven PN, Handyside AH, Ogilvie M (1998) Chromosome translocations: segregation modes and strategies for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 18: 1437-1449.
- Serra A, Brahe C, Millington-Ward A, Neri B, Tedeschi F, Tassone F, Bova R (1990) Pericentric inversion of chromosome 9: prevalence in 300 Down syndrome families and molecular studies of nondisjunction. *Am J Med Genet* 7:162-168 (suppl).
- Speed RM (1989) Heterologous pairing and fertility in humans. In: Gillies GB (ed). *Fertility and chromosome pairing: recent studies in plant and animals*. Sydney, CRC Press Inc, pp 2-30.
- Stahl A, Luciani JM, Devictor M, Capodano AM, Gagné R (1975) Constitutive heterochromatin and micronucleoli in the human oocytes at the diplotene stage. *Humangenetik* 26:315-327.
- Syme RM, Martin RH (1992) Meiotic segregation of a 21;22 Robertsonian translocation. *Hum Reprod* 7:825-829.



- Templado C, Vidal F, Navarro J, Marina S, Egozcue J (1984) Meiotic studies and synaptonemal complex analysis in two infertile males with a 13/14 balanced translocation. *Hum Genet* 67:162-165.
- Templado C, Navarro J, Benet J, Genescà A, Pérez M, Egozcue J (1988) Human sperm chromosome studies in a reciprocal translocation t(2;5). *Hum Genet* 79:24-28.
- Uchida I, Freeman V (1986) Trisomy 21 Down syndrome. II. Structural chromosome rearrangements in the parents. *Hum Genet* 72:118-122.
- Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, Bonduelle M, Vandervorst M, Van Steirteghem A, Liebaers I (1999) Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in-situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;12). *Mol Hum Reprod* 5:682-690.
- Van Hummelen P, Manchester D, Lowe X, Wyrobek AJ (1997) Meiotic segregation, recombination, and gamete aneuploidy assessed in a t(1;10)(p22.1;q22.3) reciprocal translocation carrier by three- and four probe multicolor FISH in sperm. *Am J Hum Genet* 61:651-659.
- Vidal F, Templado C, Navarro J, Marina S, Egozcue J (1982) Meiotic and synaptonemal complex studies in a 14/21 translocation carrier. *Int J Androl* 5:21-26.
- Vidal F, Navarro J, Templado C, Egozcue J (1987) Synaptonemal complex studies in the male. *Hum Reprod* 2:577-581.
- Vidal F, Moragas M, Català V, Torelló MJ, Santaló J, Calderón G, Giménez C, Barri PN, Egozcue J, Veiga A (1993) Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. *Hum Reprod* 8:1740-1743.
- Vidal F, Giménez C, Rubio C, Simón C, Pellicer A, Santaló J, Egozcue J (1998) FISH Preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J Ass Reprod Genet* 15:310-313.

- Vidal F, Blanco J, Rubio C, Giménez C, Simón C, Martínez MC, Mínguez Y, Santaló J, Pellicer A, Remohí J, Egozcue J (1999) Segregation analysis in the spermatozoa and preimplantation genetic diagnosis in the embryos from a patient 46,XY t(7;Y)(p11;q13). *Cytogenet Cell Genet* 85:60.
- Wang HS, Hamerton JL (1979) C-band polymorphism of chromosomes 1,9 and 16 in four subgroups of mentally retarded patients and a normal control population. *Hum Genet* 51:269-275.
- World Health Organization (1992) WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 3<sup>rd</sup> edn. Cambridge University Press, Cambridge.

#### **4.2.6. Article 6**

Títol: Estudi de la segregació meiótica dels cromosomes sexuals en individus portadors de gonosomopaties

Autors: Joan Blanco, Josep Egozcue i Francesca Vidal

Revista científica: Enviat a l'European Journal of Human Genetics

Cita bibliogràfica: -

Índex d'impacte: -

### **4.3. Revisió crítica de l'aplicació de la FISH en l'estudi citogenètic de l'espermatozoide humà**

#### **4.3.1. Article 7**

Títol: Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH)

Autors: Josep Egozcue, Joan Blanco i Francesca Vidal

Revista científica: Human Reproduction Update

Cita bibliogràfica: Any 1997, volum 3, pàgines 441-452

Índex d'impacte: 3.651

## **5. DISCUSSIÓ GENERAL**

## **5.1. Avantatges, limitacions i aspectes tècnics de la FISH en l'estudi citogenètic de l'espermatozoide humà**

### **5.1.1. Avantatges de la tècnica**

La principal avantatge que presenta aquesta aproximació experimental, respecte altres tècniques desenvolupades per a l'estudi cromosòmic de l'espermatozoide humà, és la possibilitat d'estudiar un nombre molt elevat d'espermatozoides en un període de temps relativament curt.

A més, l'especificitat de les sondes de DNA utilitzades és molt elevada i, realitzant diferents tipus de combinacions, és possible avaluar la freqüència d'anomalies cromosòmiques, numèriques i estructurals, per a la majoria de cromosomes del cariotip humà. Anys enrera, quan encara hi havia poques sondes comercialitzades, els estudis per FISH sobre nuclis descondensats es limitaven a la valoració d'aneuploidies per alguns cromosomes. Avui dia, amb el desenvolupament de nous fluorocroms, de noves sondes específiques de tots els cromosomes i de diferents regions cromosòmiques, podem realitzar qualsevol tipus d'estudi sobre el nucli interfàsic de l'espermatozoide. En aquest sentit, el disseny experimental aplicat per a cada cas, precisa de l'elecció i la combinació de sondes de DNA adequades a les necessitats de cada estudi.

Tot plegat ha fet que aquesta tècnica s'estigui aplicant com a eina diagnòstica en l'àmbit de la citogenètica de la reproducció humana (vegeu l'apartat 5.7., pàgina 158).

### **5.1.2. Limitacions de la tècnica**

Des del nostre punt de vista, tres són les principals limitacions que presenta aquesta aproximació experimental en l'estudi citogenètic de l'espermatozoide humà.

En primer lloc, la metodologia de FISH no es pot aplicar directament sobre espermatozoides ja que, com a resultat de l'elevat grau de compactació de la cromatina espermàtica, és necessari un tractament previ de descondensació (vegeu l'apartat 1.4.2.3., pàgina 11). L'eficiència del protocol de descondensació afecta directament la qualitat dels senyals d'hibridació i, per tant, la qualitat de la valoració realitzada.

D'altra banda, la tècnica no permet la discriminació entre els espermatozoides nul·lisòmics i els errors d'hibridació. Realitzant combinacions de dos o més sondes, alguns autors interpreten l'absència de senyal per una de les sondes utilitzades com a una nul·lisomia per aquell cromosoma (Holmes i Martin 1993; Lu *et al.* 1994; Bischoff *et al.* 1994). No obstant això, en la majoria dels casos la freqüència de nul·lisomies és considerablement superior a la freqüència de disomies, quan teòricament ambdós valors haurien de ser equivalents. Encara que les diferències poden ser el resultat situacions especials, com per exemple retardament anafàsic (Nath *et al.* 1995; Zijno *et al.* 1996), la majoria de les dades publicades suggereixen que l'excés de nul·lisomies és artefactual (Márquez *et al.* 1996). Així, nosaltres recomanem el model conservatiu per estimar la freqüència d'aneuploïdies, multiplicant per dos el percentatge de disomies (Blanco *et al.* 1996), tal i com es realitza en estudis de cromosomes d'espermatozoide (Egozcue *et al.* 1991).

Per últim, amb aquesta aproximació experimental només es poden avaluar els cromosomes reconeguts per les sondes de DNA utilitzades. Això ens obliga a preveure les anomalies cromosòmiques que potencialment pot presentar un determinat individu. A més, la combinació de sondes realitzada ha de tenir en compte un altre aspecte; l'àrea reduïda del cap de l'espermatozoide limita el nombre de senyals d'hibridació que poden ser avaluats correctament (normalment tres colors diferents). De totes maneres, en estudis d'incidència d'aneuploïdies, aquesta limitació pot ser superada analitzant diferents portaobjectes amb diferents combinacions de sondes, atès que, en general, l'ejaculat conté un nombre molt elevat d'espermatozoides.

### **5.1.3. Aspectes tècnics**

Malgrat que l'anàlisi del contingut cromosòmic dels espermatozoides per FISH és una tècnica que s'aplica actualment en diversos laboratoris arreu del món, les característiques especials del nucli espermàtic condueix a una sèrie de limitacions que només poden ser superades a partir del coneixement d'alguns aspectes de la tècnica i del seguiment de determinats criteris de valoració.

A continuació descriurem alguns factors que poden condicionar el resultat final i analitzarem algunes situacions conflictives que poden ser el resultat d'un ús inadequat de la tècnica.

#### *Descondensació de la cromatina*

L'èxit de la tècnica depèn de la qualitat i de l'eficiència del protocol de descondensació. Si el tractament és insuficient, les sondes de DNA no tenen accés a la seva seqüència complementària, especialment quan estem treballant amb sondes específiques de locus o de regions subtelomèriques. Per contra, un tractament massa llarg provoca un excés de descondensació de la cromatina que origina senyals d'hibridació massa dispersos, fet que dificulta la seva valoració. Per tant, el temps de descondensació aplicat s'ha d'adaptar, no només a les particularitats de cada individu, sinó també al tipus de sondes que s'estan utilitzant en una determinada valoració.

#### *Selecció de les sondes de DNA*

Cada cas en particular precisa de l'elecció de les sondes de DNA, adequades per obtenir la informació que volem extreure. Sens dubte el tipus d'anàlisi que millor reflexa això és la valoració de les anomalies estructurals en espermatozoides d'individus portadors (vegeu l'apartat 5.4., pàgina 148).

La valoració d'aneuploïdies també es pot veure condicionada pel tipus de sondes de DNA utilitzades. Per exemple, per a la valoració de disomies del cromosoma Y, alguns autors fan servir una sonda que reconeix la regió heterocromàtica d'aquest cromosoma. Aquesta sonda origina un senyal d'hibridació que pot arribar a ocupar més d'una tercera part de la superfície del cap de l'espermatozoide (Moosani *et al.* 1995; Martin *et al.* 1996; Chevret *et al.* 1997) limitant el nombre de sondes que es poden valorar alhora i, al mateix temps, dificultant la valoració de disomies per aquest cromosoma, atès que el diàmetre del senyal dificulta l'acompliment del criteri de distància entre senyals. Aquesta limitació pot ser superada si en comptes d'aquesta sonda s'utilitza una que reconeix la regió centromèrica del cromosoma Y, tal i com ho fan altres investigadors (Blanco *et al.* 1997).



### *Especificitat de les sondes de DNA*

Un altre factor que pot condicionar el resultat de la nostra anàlisi és l'especificitat de les sondes de DNA. La sonda ideal és aquella que presenta una elevada especificitat per a la regió cromosòmica que reconeix i que a més dona com a resultat un senyal d'hibridació intens i puntual.

En principi, si una sonda és específica per a un determinat cromosoma en un individu, aquesta sonda es considera específica per a tota la població. Nogensmenys, hi ha nombroses excepcions a aquesta norma general (Verlinsky *et al.* 1995b; Egozcue *et al.* 1997) que indiquen la importància de testar l'especificitat de les sondes abans de començar qualsevol treball experimental.

### *Polimorfismes de DNA $\alpha$ -satèl·lit*

La majoria dels estudis d'incidència d'aneuploidies es realitzen fent servir sondes que reconeixen seqüències centromèriques de DNA  $\alpha$ -satèl·lit. Ara bé, de vegades el nombre de còpies d'aquestes seqüències varia entre individus. La intensitat dels senyals d'hibridació depèn directament del nombre de repeticions. Així, un nombre molt baix pot disminuir o inclús privar la detecció dels senyals (Serés-Santamaria *et al.* 1993; Bossuyt *et al.* 1995) i, en conseqüència, condicionar el resultat del nostre estudi.

### *Control intern de ploïdia*

La valoració d'aneuploidies precisa de la presència d'una sonda utilitzada com a control intern, amb l'objectiu de discriminar els espermatozoides disòmics dels diploides en funció del nombre de senyals d'hibridació (Figura 1, pàgina 37).

Una revisió dels resultats publicats realitzada pel nostre grup (Egozcue *et al.* 1997), posa de manifest que la freqüència de disomies per a la majoria dels cromosomes és més elevada quan no s'utilitza una sonda com a control de ploïdia, probablement perquè els percentatges descrits inclouen els espermatozoides diploides.

Encara que molts d'aquests treballs diferencien els espermatozoides diploides dels disòmics en funció del diàmetre del nucli cel·lular (Guttenbach i Schmid 1990; Coonen

*et al.* 1991), el fet que els espermatozoides presentin una gran variabilitat en el grau de condensació de la cromatina (Seligman *et al.* 1994) qüestiona aquesta possibilitat. Així, el diàmetre del nucli espermàtic, després de la descondensació de la cromatina, depèn del contingut de DNA i del seu grau de compactació.

El seguiment d'aquests principis generals per a la discriminació de la ploïdia dels espermatozoides només seria qüestionable en aquells casos en què les particularitats de la meiosi d'un determinat individu (per exemple la presència d'anomalies sinàptiques) pot conduir a la presència de disomies múltiples (In't Veld *et al.* 1997).

#### *Criteris de valoració*

Al llarg d'aquest treball de tesi doctoral, hem comentat en diverses ocasions que l'anàlisi de la dotació cromosòmica dels espermatozoides per FISH s'infereix a partir del nombre i de les característiques dels senyals d'hibridació presents a l'interior de cada nucli espermàtic. És per aquest motiu, és a dir, pel fet que nosaltres no observem directament els cromosomes, que és necessari l'establiment i el seguiment d'una sèrie de criteris de valoració, amb l'objectiu d'eliminar la subjectivitat de l'investigador.

Òbviament, la valoració dels espermatozoides ha anat evolucionant amb la consolidació de la tècnica i, avui dia, la majoria dels laboratoris que treballen en aquest camp apliquen una sèrie de criteris més o menys estàndards (revisat per Martin i Rademaker 1995). No obstant això, qüestions relacionades amb la valoració de disomies resultants de no disjuncions de segona divisió meiòtica, o de la presència de senyals d'hibridació de diferent intensitat han estat plantejades pel nostre grup i poden qüestionar, en determinades situacions, l'eficàcia de determinats criteris (Egozcue *et al.* 1997). Per exemple, per avaluar un espermatozoide com a disòmic, aquest ha de presentar dos senyals d'hibridació del mateix color i intensitat, separades per una distància superior al diàmetre de cada senyal (Blanco *et al.* 1996). Ara bé, en casos de no disjunció de segona divisió meiòtica, les dues cromàtides que formen part del cromosoma que ha segregat incorrectament poden originar dos senyals d'hibridació massa propers, fent que l'espermatozoide sigui avaluat, erròniament, com a haploide. D'altra banda, ja hem

comentat que la intensitat dels senyals d'hibridació es pot veure condicionada per la presència de polimorfismes de DNA  $\alpha$ -satèl·lit, o altres factors com el grau de descondensació de la cromatina. Com a resultat d'això, un senyal d'hibridació d'una mida i intensitat determinada pot ser considerat com artefactual al costat d'un senyal molt més gran dins d'un espermatozoide, en canvi, un altre senyal de les mateixes característiques pot avaluar-se com a positiu en un altre espermatozoide que només presenta un senyal d'hibridació.

#### *Nombre d'espermatozoides analitzats*

El nombre d'espermatozoides que s'han d'analitzar per individu i per cromosoma depèn del marge d'error que acceptem com a vàlid en el nostre disseny experimental.

Òbviament, quan més elevat és el nombre d'espermatozoides analitzats, els resultats obtinguts s'aproparan més als resultats reals de la població analitzada. Per tant, la grandària de la mostra afecta directament la qualitat dels resultats, sobretot si tenim en compte que la freqüència d'aneuploidies per a un determinat cromosoma és molt baixa.

Actualment, la majoria dels laboratoris analitzen 10.000 espermatozoides per individu i per cromosoma, exceptuant aquells casos on el recompte espermàtic limita aquesta possibilitat.

En resum, des de la primera aplicació d'aquesta tècnica en l'estudi citogenètic dels espermatozoides humans, la seva evolució ha estat constant. Això ha fet que actualment s'hagi desenvolupat una metodologia, més o menys estàndard entre els diferents grups que treballen en aquest camp de la citogenètica humana, i ha permès la valoració d'anomalies cromosòmiques, numèriques i estructurals, d'un nombre molt elevat d'espermatozoides procedents de diferents tipus d'individus. No obstant això, l'optimització de la tècnica ha de continuar fins que la majoria de les limitacions que presenta puguin ser superades.

## 5.2. Freqüència basal d'aneuploïdies en espermatozoides humans

### 5.2.1. Diferències entre cromosomes

En general, dels estudis d'incidència d'aneuploïdies en individus control podem extreure dues consideracions. La primera és que tots els cromosomes són susceptibles a segregat incorrectament i originar espermatozoides portadors d'anomalies cromosòmiques. La segona és que els mecanismes que originen aquestes anomalies afecten preferentment a alguns cromosomes.

Martin *et al.* (1991), en un estudi on es presentava la distribució d'aneuploïdies a partir de l'anàlisi de 11.615 cariotips d'espermatozoide, van descriure un excés d'espermatozoides hiperhaploides pels cromosomes 1, 21 i pels cromosomes sexuals.

De la mateixa manera, estudis mitjançant FISH sobre nuclis descondensats d'espermatozoide han posat de manifest diferències entre cromosomes. Per exemple, un increment significatiu de disomies del cromosoma 3 respecte els cromosomes 7 i 16 (Downie *et al.* 1997), del cromosoma 16 respecte el cromosoma 18 (Williams *et al.* 1993), del cromosoma 21 respecte els autosomes analitzats (Blanco *et al.* 1996; Spriggs *et al.* 1996) i dels cromosomes sexuals respecte la resta d'autosomes analitzats exceptuant el cromosoma 21 (Martin *et al.* 1996).

Malgrat que una visió superficial d'aquests resultats ens portaria a defensar una elevada variabilitat intercromosòmica en el percentatge d'aneuploïdia, una anàlisi més profunda posa de manifest que només el cromosoma 21 i els cromosomes sexuals es veuen preferentment afectats pel fenomen de la no disjunció, donat que aquest és un resultat comú a la majoria dels estudis que analitzen aquests cromosomes.

Els darrers anys, i amb la identificació de marcadors de DNA altament polimòrfics, ha estat possible determinar l'origen parental del cromosoma extra en individus portadors d'anomalies numèriques. Aquests treballs han posat de manifest que la majoria de les gonosomopaties s'originen per errors meiòtics paterns: un 10% de les femelles 47,XXX (MacDonald *et al.* 1994), un 50% dels individus 47,XXY (Lorda-Sánchez *et al.* 1992), el 100% dels individus amb cariotip 47,XYY i el 80% de les femelles 45,X (Jacobs *et*

*al.* 1990; Hassold *et al.* 1992). Òbviament, aquest fet pot estar relacionat amb l'increment d'espermatozoides amb aneuploïdies pels cromosomes sexuals observats mitjançant FISH.

Pel que fa als individus amb trisomia 21, la determinació de l'origen parental del cromosoma extra mitjançant l'anàlisi de polimorfismes de DNA, xifra el percentatge d'origen patern en només un 5% dels casos (Antonarakis 1993). El fet que el cromosoma 21 sigui més sensible a la no disjunció durant l'oogènesi (8%, Benzacken *et al.* 1998) que durant l'espermatogènesi (0,37%, Blanco *et al.* 1996) pot provocar un origen preferentment matern per a la majoria dels cromosomes 21 extra. A més, alguns investigadors han suggerit la possibilitat que la viabilitat dels fetus amb trisomia 21 depengui de l'origen parental del cromosoma extra (Hall *et al.* 1990), tal i com ja s'ha demostrat per les trisomies dels cromosomes 2, 7, 15 i 22 (Zaragoza *et al.* 1998).

Per explicar, perquè el cromosoma 21 i els cromosomes sexuals presenten una freqüència incrementada de no disjunció s'han proposat diferents mecanismes. Alguns intenten relacionar la presència de cromosomes amb regions organitzadores del nuclèol (Henderson *et al.* 1973), la presència de blocs d'heterocromatina (Ford i Lester 1982) o la mida dels cromosomes (Ford i Lester 1982) amb la no disjunció. No obstant, els resultats d'Spriggs *et al.* (1996) comparant la incidència de disomies entre diferents cromosomes i grups de cromosomes no donen suport a cap d'aquestes teories.

Actualment, la teoria més consolidada per explicar l'increment d'aneuploïdia del cromosoma 21 i gonosomes és la que relaciona, la recombinació meiòtica aberrant durant la primera divisió meiòtica, amb la no disjunció. En aquest sentit, el cromosoma 21 i els cromosomes sexuals comparteixen una característica; durant l'aparellament a profase I, el nombre d'intercanvis que es formen entre ells és molt baix. En el cas del bivalent 21, s'observen només un o dos quiasmes entre els homòlegs (Laurie i Hultén 1985). D'altra banda, el bivalent XY presenta una reduïda regió d'homologia que només possibilita l'establiment d'un intercanvi terminal entre els dos cromosomes (Hassold *et al.* 1991b).

Conseqüentment, qualsevol factor que afecti negativament la recombinació dels cromosomes homòlegs, afectarà amb més intensitat a aquells cromosomes que presenten un nombre d'intercanvis més baix. Això pot conduir a la formació d'univalents i, per tant, a un increment d'aneuploidies per aquests cromosomes.

Confirmin aquesta teoria estudis moleculars que analitzen la taxa de recombinació del cromosoma extra en individus portadors de trisomia 21 (Warren *et al.* 1987; Lamb *et al.* 1996) i gonosomopaties (Hassold *et al.* 1991b). En ambdós casos s'ha detectat una reducció significativa del nombre d'intercanvis dels cromosomes extra, en els fills afectes.

### **5.2.2. Relació entre disomies en espermatozoides i trisomies d'origen patern**

Per a tots els cromosomes analitzats, el percentatge d'espermatozoides disòmics, que potencialment poden ser els responsables de l'aparició d'individus trisòmics, sempre és més elevat que la freqüència estimada de disomies deduïda a partir dels resultats dels estudis epidemiològics (Taula 7, pàgina 144).

En els casos de la síndrome de Klinefelter i els individus amb cariotip 47,XYY les diferències no són tan significatives, fet que probablement està relacionat amb la major viabilitat dels embrions amb aquest tipus d'anomalia. En canvi, per les trisomies dels autosomes les diferències són molt més marcades (Taula 7, pàgina 144).

Per explicar aquesta divergència entre els estudis en espermatozoides i els epidemiològics, hem de fer diverses consideracions. En primer lloc, hem de tenir en compte que el percentatge estimat de disomies en espermatozoides, només es pot realitzar a partir de dades obtingudes d'embarassos clínicament reconeguts. Ara bé, aquestes dades no tenen en compte les pèrdues embrionàries que es produeixen en el període periimplantacional. De fet, s'estima que una de les principals causes d'avortaments durant aquest període és la presència de fetus cromosòmicament desequilibrats (Bulletti *et al.* 1996). A més, tal i com ja havíem comentat a l'apartat anterior, alguns investigadors han suggerit la possibilitat que el grau de viabilitat dels embrions trisòmics pugui dependre de l'origen parental del cromosoma extra.



Recentment, Zaragoza *et al.* (1998) van observar que les trisomies d'origen patern dels cromosomes 2, 7, 15 i 22 tendeixen a avortar abans que les trisomies d'origen matern.

Un altre fet a considerar podria estar relacionat amb diferències en el disseny experimental aplicat a cada estudi. És evident que el nombre de casos clínics analitzats en els estudis epidemiològics és molt inferior al nombre d'espermatozoides valorats en un estudi d'incidència d'anomalies cromosòmiques. Mentre que en el primer cas, el nombre de casos analitzats difícilment supera unes quantes centenes, en el segon s'analitzen milers d'espermatozoides. A més, i donat que el percentatge d'aneuploidies en oòcits és significativament més elevat que en espermatozoides (Pellestor 1991; Martini *et al.* 1997), l'origen matern del cromosoma extra és considerablement superior a l'origen patern (Taula 7, pàgina 144). Tot plegat pot provocar que l'origen patern de les trisomies en els estudis epidemiològics quedi parcialment emmascarat.

### **5.2.3. Freqüència total d'aneuploidies en espermatozoides humans**

A partir dels treballs especificats a la taula 8 (pàgina 146) podem realitzar una estimació de la incidència total d'aneuploidies en espermatozoides humans. Així, dels percentatges descrits podem estimar una incidència mitjana de disomies pels autosomes i pels gonosomes del 0,13% i 0,37% respectivament. Assumint que la no disjunció origina el mateix nombre d'espermatozoides disòmics i nul·lisòmics, podem deduir el percentatge total d'aneuploidia multiplicant el percentatge de disomies per dos. Per tant, el percentatge total d'aneuploidia per tots els autosomes seria del 5,72% ( $0,13 \times 2 \times 22$ ), mentre que el percentatge d'aneuploidia pels cromosomes sexuals seria del 0,74% ( $0,37 \times 2$ ). Globalment, el percentatge total estimat d'espermatozoides aneuploides seria del 6,46%, un percentatge lleugerament superior al 3-4% descrit en espermatozoides d'individus control analitzats per cromosomes d'espermatozoide (Martin *et al.* 1991; Templado *et al.* 1996).





### **5.3. Incidència de disomies 21 en pares d'individus amb la síndrome de Down d'origen patern**

En estudis de poblacions de risc, alguns investigadors han intentat determinar si els pares que tenen un fill afecte d'una cromosomopatia d'origen patern, presenten un risc incrementat de tenir un altre fill afecte.

Fins ara s'han realitzat tres estudis diferents. El nostre grup va analitzar la incidència de disomies pel cromosoma 21 en espermatozoides de pares d'individus amb la síndrome de Down. Vam detectar un increment significatiu de disomies per aquest cromosoma en els dos pares d'individus Down d'origen patern (Blanco *et al.* 1998a). De la mateixa manera, Martínez-Pasarell *et al.* (1999), analitzant la incidència d'aneuploïdia dels cromosomes sexuals en pares de pacients amb la síndrome de Turner, detecten un increment significatiu d'aneuploïdia per aquests cromosomes respecte els individus control. En canvi, en un estudi similar realitzat per Hixon *et al.* (1998), en pares de pacients amb la síndrome de Down, no van trobar cap desviació significativa de disomies pel cromosoma 21 respecte la població control.

Nogensmenys, els increments d'aneuploïdies detectats en ambdós treballs són moderats (Blanco *et al.* 1998a; Martínez-Pasarell *et al.* 1999). En conseqüència, difícilment podem establir una relació directa entre el percentatge de disomies o nul·lisomies en espermatozoides i la presència de descendència amb trisomia o monosomia. Una possibilitat apuntada per nosaltres i confirmada en un dels dos individus amb increment de disomies 21 (Blanco *et al.* 1998a), és que, en realitat, aquests individus presentin anomalies meiòtiques generalitzades que derivin en la producció de gàmetes desequilibrats per a altres cromosomes. Com a resultat d'això, el percentatge d'espermatozoides que poden produir descendència viable podria ser molt baixa, ja que la majoria de les anomalies cromosòmiques són incompatibles amb la vida. Al mateix temps, i per la mateixa raó, el risc de tenir descendència viable, cromosòmicament desequilibrada, es pot veure incrementat (per exemple trisomia 21).

Òbviament calen més estudis per confirmar o refutar aquestes observacions. Tot i això, els resultats actuals suggereixen que la presència d'un fill amb la síndrome de Down o la síndrome de Turner d'origen patern, incrementa el risc de tenir més descendència portadora d'anomalies cromosòmiques.

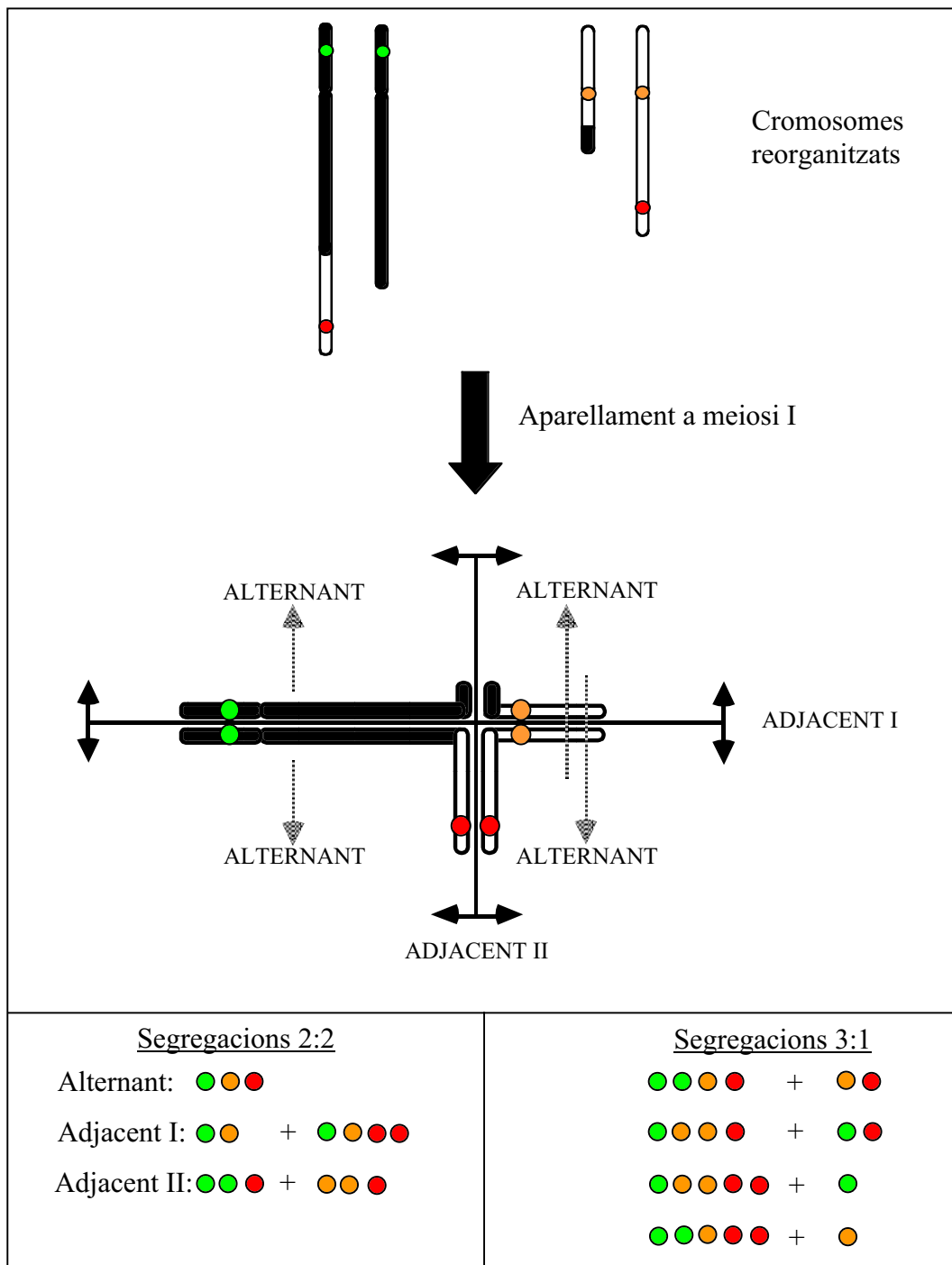
#### **5.4. Segregació dels cromosomes reorganitzats en individus portadors d'anomalies estructurals**

En individus portadors de translocacions recíproques, els productes de segregació dels cromosomes reorganitzats es poden analitzar mitjançant diferents aproximacions experimentals. Molts investigadors ho han fet a partir de l'obtenció de cromosomes d'espermatozoide i la seva anàlisi posterior per tècniques citogenètiques clàssiques (revisat per Blanco *et al.* 1998b), o hibridació *in situ* fluorescent fent servir sondes de DNA total (Cifuentes *et al.* 1999). Actualment, amb el desenvolupament de sondes de DNA específiques locus i de regions subtelomèriques, és possible realitzar aquest tipus d'estudi mitjançant FISH sobre nuclis descondensats d'espermatozoides.

Aquesta darrera aproximació experimental permet diferenciar, en funció del nombre de senyals d'hibridació presents a l'interior de cada espermatozoide, els diferents genotips que s'originen a partir de la segregació dels cromosomes reorganitzats a meiosi I.

L'aplicació d'aquesta metodologia està directament supeditada a la utilització d'una combinació de sondes de DNA, específiques de diferents regions dels cromosomes reorganitzats, que ens permeti avaluar els diferents tipus de segregacions que es poden donar. Així, quan la translocació implica dos autosomes, aquesta combinació precisa d'un mínim de tres sondes per tal que cadascun dels cromosomes, normals i derivatius, presentin un patró de senyals d'hibridació característic. Si en la translocació participa un dels dos cromosomes sexuals, el nombre mínim de sondes és de quatre. Obligatòriament, una de les sondes utilitzades ha de reconèixer un dels dos segments translocats. D'aquesta manera, analitzant el nombre i tipus de senyals d'hibridació presents a l'interior dels espermatozoides poden deduir la seva dotació cromosòmica i,

en conseqüència, el tipus de segregació dels cromosomes reorganitzats a meiosi I que els ha originat (Figura 4).



**Figura 4:** Model d'anàlisi dels genotips resultants de la segregació dels cromosomes reorganitzats en una translocació recíproca per FISH.

Nosaltres vam aplicar aquesta metodologia en l'estudi de la segregació d'un individu portador d'una translocació recíproca  $t(5;8)(q33;q13)$  (Blanco *et al.* 1998b), determinant el percentatge d'espermatozoides amb genotip alternant, adjacent I, adjacent II i els resultants de segregacions 3:1. Al mateix temps, la metodologia ens va possibilitar avaluar els fenòmens de recombinació dels segments intersticials en la segregació adjacent II. La majoria dels espermatozoides es van originar a partir de segregacions 2:2 (90.40%) probablement com a resultat de l'establiment de configuracions tancades o anells a meiosi I (Templado *et al.* 1990). Els genotips alternant (45,12%) i adjacent I (38,31%) predominaven sobre els resultants de segregacions adjacent II (6,97%) i segregacions 3:1 (6,56%). Un resultat esperat tenint en compte que les segregacions adjacent II i 3:1 s'originen a partir d'una segregació anormal dels cromosomes reorganitzats i de fenòmens de no disjunció.

Exceptuant l'estudi realitzat per Estop *et al.* (1999), la majoria dels treballs publicats que han aplicat aquesta metodologia, descriuen percentatges d'espermatozoides equilibrats propers al 50% esperat (Van Hummelen *et al.* 1997; Blanco *et al.* 1998b; Estop *et al.* 1998a; Mercier *et al.* 1998; Giltay *et al.* 1999). Aquestes diferències, habituals en estudis de segregació mitjançant cromosomes d'espermatozoide (revisat per Blanco *et al.* 1998b), reflexen el diferent comportament que adopten certs tipus de translocacions en funció de les característiques dels segments reorganitzats i dels cromosomes implicats en la reorganització (Jalbert i Sèle 1979).

D'altra banda, els percentatges observats dels dos genotips resultants de les segregacions adjacent I, adjacent II i 3:1, divergia significativament de la proporció 1:1 esperada (Blanco *et al.* 1998b). De fet, aquest resultat s'observa en la majoria dels treballs que han aplicat aquesta metodologia en aquests tipus d'individus (Taula 9, pàgina 151). Per justificar aquestes observacions s'han proposat diferents possibilitats. Una d'elles estaria relacionada amb la formació i resolució dels quiasmes i el seu efecte diferencial en funció de la mida dels segments translocats i intersticials (Van Hummelen *et al.* 1997). La segona seria una limitació tècnica, relacionada amb el nombre màxim de senyals d'hibridació que poden ser identificats en un cap d'espermatozoide (Blanco

*et al.* 1998b). Per últim, s'ha proposat que els punts de control que presenta la meiosi poden condicionar la viabilitat dels espermatòcits i de les espermàtides en funció del seu contingut cromosòmic (Blanco *et al.* 1998b).

	<b>Translocació</b>	<b>Adjacent I<sup>a</sup></b>	<b>Adjacent II<sup>b</sup></b>	<b>3:1<sup>c</sup></b>
Van Hummelen <i>et al.</i> (1997)	t(1;10)(p22.1;q22.3)	1,20	1,27	3,23
Blanco <i>et al.</i> (1998b)	t(5;8)(q33;q13)	1,28	2,8	2,77
Estop <i>et al.</i> (1998a)	t(2;18)(p21;q11.2)	1,53	1,52	1,84
	t(8;9)(q24.2;q32)	0,58	1	1,1
Estop <i>et al.</i> (1999)	t(11;12)(q23;q11)	1,28	2,02	7,13

a- Espermatozoides portadors de segments translocats curts respecte els portadors de segments llargs.

b- Espermatozoides portadors de segments intersticials curts respecte els portadors de segments llargs.

c- Espermatozoides portadors de 22 cromosomes respecte els portadors de 24.

**Taula 9:** Relació dels dos tipus d'espermatozoides esperats com a resultat de la segregació adjacent I, adjacent II i segregació 3:1.

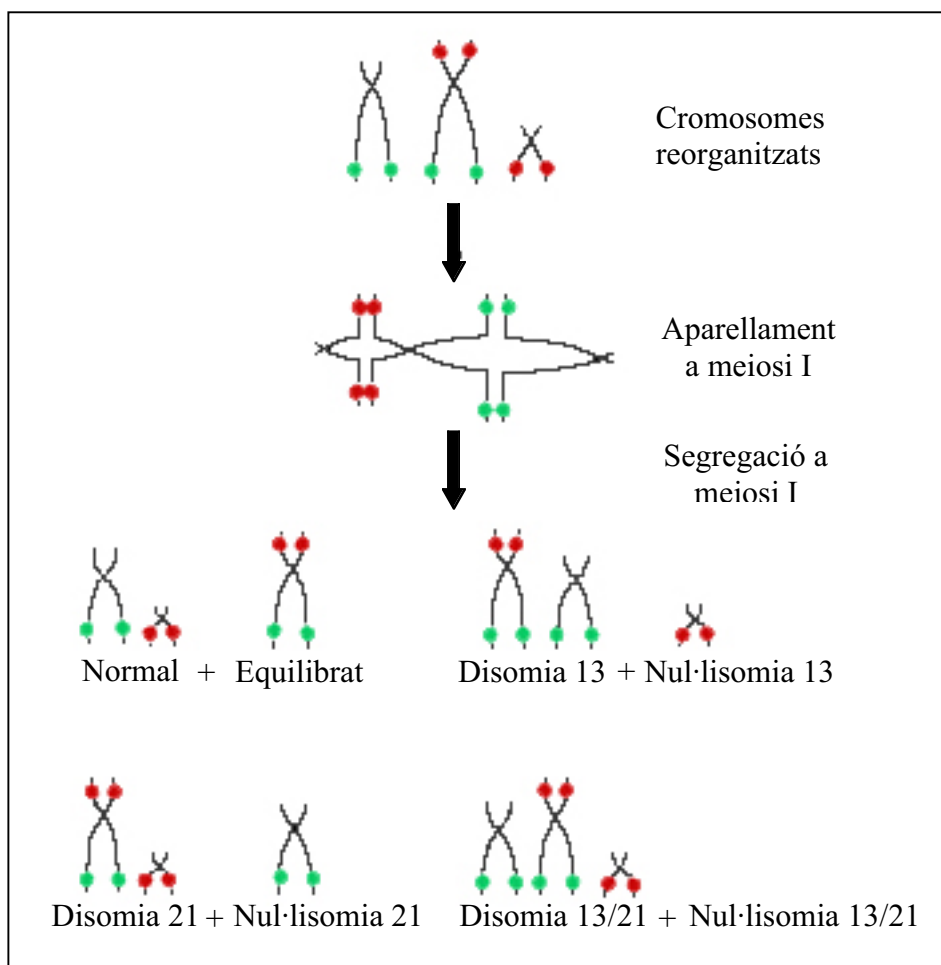
Probablement, només l'estudi de cèl·lules meiòtiques procedents de material testicular, que ens permetin la valoració de la segregació dels cromosomes reorganitzats al llarg de tot el procés meiòtic, ens permetrà concloure si hi ha una tendència real a què els espermatozoides presentin un determinat tipus de productes de segregació.

És important remarcar que aquesta aproximació experimental no permet determinar les freqüències reals dels genotips alternant i adjacent I, donat que aquestes es poden veure afectades per la presència de quiasmes als segments intersticials. És a dir, els genotips resultants d'una segregació alternant es poden originar a partir de la segregació adjacent I, si hi ha hagut recombinació en un segment intersticial. De la mateixa manera, els genotips adjacent I es poden originar a partir d'una segregació alternant, després de què es produeixi recombinació en un segment intersticial. Hem de tenir en compte que la formació de quiasmes als segments intersticials és un fenomen força habitual en individus portadors (Goldman i Hultén 1993a, 1993b).

Fins ara, aquesta metodologia només s'ha aplicat per als estudis de segregació dels individus portadors de translocacions recíproques. Ara bé, arran el desenvolupament de sondes de DNA específiques de locus i de regions subtelomèriques (*Vysis Inc., product*

*catalog 1999-2000*) és molt probable que la seva aplicació s'estengui a altres tipus de reorganitzacions.

Per exemple, durant la primera divisió meiótica, els cromosomes reorganitzats en individus portadors d'una translocació Robertsoniana formen una estructura oberta o en cadena (Figura 5). Potencialment, aquesta configuració pot originar gàmetes amb vuit dotacions cromosòmiques diferents (Egozcue 1976). La figura 5 mostra com amb la utilització de dues sondes de DNA específiques de qualsevol regió del braç llarg dels dos cromosomes reorganitzats es poden identificar tots els genotips resultants.



**Figura 5:** Model d'anàlisi dels genotips resultants de la segregació dels cromosomes implicats en una translocació Robertsoniana t(13;21) per FISH.

D'altra banda, els productes de segregació en individus portadors d'inversions pericèntriques poden originar espermatozoides portadors de duplicacions i deficiències (Egozcue 1976). Tenint en compte que les regions duplicades o eliminades, sempre formen part de la part terminal d'una de les dues cromàtides, en teoria és possible analitzar els diferents genotips originats utilitzant sondes específiques de regions subtelomèriques.

La consolidació d'aquests estudis en individus portadors permetrà determinar el percentatge d'espermatozoides equilibrats generats a partir de la segregació dels cromosomes reorganitzats a meiosi i, en conseqüència, oferir als individus portadors un consell reproductiu acurat. De fet, aquesta possibilitat diagnòstica s'està començant a aplicar en parelles portadores, abans de ser sotmeses a cicles de diagnòstic genètic preimplantacional (Van Assche *et al.* 1999; Vidal *et al.* 1999), amb la finalitat d'orientar als professionals i informar a la parella del risc de transmissió a la descendència.

### **5.5. L'efecte intercromosòmic**

La hibridació *in situ* fluorescent, aplicada sobre nuclis d'espermatozoides prèviament descondensats, permet avaluar eficaçment l'efecte intercromosòmic en individus portadors d'anomalies cromosòmiques estructurals.

El nostre grup ha analitzat la incidència de disomies pel cromosoma 21 en cinc individus portadors: 46XY,t(5;8)(q33;q13), 46,XY,t(3;15)(p25;q15), 46XY,t(7;Y)(p11;q13), 45,XY,t(13;22) i 46,XY, inv(9)(p12;q12) (Blanco *et al.* 1998b; Blanco *et al.* apartat 4.2.5., pàgina 77). Només en el cas de l'individu portador de la translocació t(3;15) es va observar un increment significatiu de disomies per aquest cromosoma.

L'existència d'un efecte intercromosòmic pressuposa que, d'alguna manera, el comportament dels cromosomes reorganitzats a meiosi afecta la segregació d'altres bivalents, conduint a un increment d'aneuploidies de cromosomes no implicats en la reorganització. De fet, les anomalies meiòtiques són un fenomen força habitual en



individus portadors (Vidal *et al.* 1982; Saadallah i Hultén 1986; Batanian i Hultén 1987).

La severitat de les anomalies meiòtiques depèn de diversos factors: del tipus de reorganització, dels cromosomes implicats i de les característiques dels segments reorganitzats (mida, presència d'agregats d'heterocromatina (Jalbert i Sèle, 1979), freqüència d'intercanvis (Laurie i Hultén 1985), presència d'una banda G+ o G- en els punts de trencament (Ashley, 1988)). Potencialment, qualsevol d'aquests factors pot ser el responsable d'interferir amb la segregació d'altres bivalents i provocar un efecte intercromosòmic.

Per exemple, en l'individu portador de la translocació t(3;15) la longitud del segment translocat del cromosoma 3 és molt petita, situació que pot afavorir la formació de tetravalents asimètrics a paquitè. Estudis meiòtics en individus portadors han posat de manifest que els tetravalents asimètrics tendeixen a formar configuracions obertes o cadenes a metafase I (Speed 1989) i, en conseqüència, a presentar regions desaparellades. Aquestes regions desaparellades poden interaccionar amb altres bivalents (Vidal *et al.* 1987; Batanian i Hultén 1987) conduint a anomalies sinàptiques que poden derivar en la no disjunció d'altres parells cromosòmics.

Si aquest raonament és vàlid, determinats tipus d'anomalies meiòtiques, siguin o no la conseqüència d'una reorganització estructural a línia somàtica, poden conduir a un increment d'aneuploïdies en gàmetes. En aquest sentit, l'anàlisi citogenètic mitjançant FISH d'individus oligoastenoterozoospermics (OAT) posa de manifest un increment significatiu d'aneuploïdies per alguns cromosomes (Bernardini *et al.* 1997; Pang *et al.* 1999; Arán *et al.* 1999). A més, Vendrell *et al.* (1999) demostren que la població d'individus OAT presenta un increment significatiu d'anomalies meiòtiques respecte altres tipus de poblacions d'individus infèrtils analitzades.

És a dir, sembla ser que l'efecte intercromosòmic seria un dels diferents camins que portarien a un increment d'anomalies numèriques en gàmetes. Altres camins tindrien un començament diferent (per exemple mutacions de gens implicats en mecanismes de

reparació del DNA, Hassold 1996). En qualsevol cas, tots ells es trobarien en una cruïlla anomenada “anomalies meiòtiques”.

D'altra banda, a més de l'increment d'aneuploidia, els dos casos publicats d'efecte intercromosòmic positiu es veuen acompanyats d'un increment significatiu d'espermatozoides diploides (Rousseaux *et al.* 1995; Blanco *et al.* apartat 4.2.5, pàgina 77). De fet, aquest és un resultat comú en moltes situacions en què hi ha anomalies meiòtiques (revisat per Egozcue *et al.* en premsa). Els autors proposen què aquestes anomalies poden afectar el punt de control de la meiosi que actua a anafase I i provocar un increment d'espermatozoides diploides.

En resum, els resultats actuals indiquen què, almenys per algunes reorganitzacions, el risc de transmissió d'una anomalia cromosòmica a la descendència pot provenir, o de la presència d'aneusomies recombinants resultants de la segregació dels cromosomes reorganitzats a meiosi I, o de l'increment d'anomalies numèriques resultants de la presència d'efectes intercromosòmics.

### **5.6. Segregació dels cromosomes sexuals en individus portadors de gonosomopaties**

Hem estudiat la segregació meiòtica dels cromosomes sexuals de quatre individus portadors de gonosomopaties: dos individus amb cariotip 47,XYY i dos individus amb la síndrome de Klinefelter, un d'ells amb mosaïcisme 47,XXY/46,XY (Blanco *et al.* 1997; Blanco *et al.* apartat 4.2.6., pàgina 99).

Els resultats van posar de manifest l'eficàcia de la hibridació *in situ* fluorescent en l'estudi citogenètic de les diferents cèl·lules germinals presents en una biòpsia testicular.

En la valoració d'aquests individus ens vam plantejar les següents qüestions: tenen les cèl·lules aneuploides la capacitat d'iniciar la meiosi? en cas afirmatiu, com aparellen els tres cromosomes sexuals i quins són els genotips generats després de la primera divisió meiòtica? presenten aquests individus un increment d'espermatozoides amb anomalies numèriques pels cromosomes sexuals?.

### 5.6.1. Individus amb la síndrome de Klinefelter

Els resultats en els dos individus estudiats indiquen que la línia cel·lular aneuploide no és capaç d'iniciar la meiosi. Així, totes les cèl·lules analitzades en l'estadi de profase I presentaven vesícula sexual, suggerint que només les cèl·lules diploides 46,XY inicien la meiosi i són les responsables de la producció d'espermatozoides. De fet, aquest resultat ja s'havia observat prèviament en estudis meiòtics clàssics realitzats per Kjessler (1966), Skakkebaek *et al.* (1969) i Dutrillaux *et al.* (1971).

No obstant, l'observació d'un percentatge significatiu de cèl·lules germinals de segona divisió meiòtica hiperhaploides XY, planteja la qüestió del seu origen si aparentment la línia cel·lular 47,XXY queda bloquejada.

En un model experimental de ratolí, Mroz *et al.* (1999) demostren que el desenvolupament de la meiosi en un ambient testicular anormal, probablement relacionat amb un increment d'hormona FSH, afectaria la segregació meiòtica i provocaria un increment d'anomalies cromosòmiques en cèl·lules geminals de segona divisió. Assumint la validesa del model proposat per Mroz *et al.*, i tenint en compte les característiques testiculars i els nivells hormonals que presenten els individus amb la síndrome de Klinefelter (Sharara 1999), l'increment de cèl·lules aneuploides observada podria tenir el seu origen en la línia cel·lular 46,XY.

Sorprenentment, l'increment de cèl·lules hiperhaploides XY no es va traduir més endavant en un increment d'espermatozoides portadors d'aquesta dotació cromosòmica. És a dir, els resultats suggereixen que podria existir un segon punt de control a meiosi II capaç de reconèixer i eliminar selectivament les cèl·lules aneuploides.

Alguns autors proposen que la viabilitat dels espermatòcits o de les espermatides pot dependre del seu contingut cromosòmic. Així, en individus azoospermics i oligozoospermics, els quals moltes vegades presenten anomalies meiòtiques, s'ha observat un increment significatiu d'apoptosi d'espermàtides (Lin *et al.* 1997). Altres investigadors han posat de manifest que mutacions de gens que s'expressen en l'estadi d'espermàtide elongada provoquen apoptosi (Ross *et al.* 1998). És a dir, sembla ser que

l'apoptosi de cèl·lules germinals de segona divisió meiòtica és un mecanisme capaç de reconèixer i eliminar cèl·lules cromosòmica o genèticament desequilibrades. Aquest mecanisme podria explicar, en part, l'absència d'un increment d'espermatozoides hiperhaploides XY en els dos individus amb la síndrome de Klinefelter estudiats per nosaltres.

### 5.6.2. Individus amb cariotip 47,XYY

En els dos individus XYY estudiats es va observar la presència dels tres cromosomes sexuals en un percentatge significatiu de les profases analitzades (Blanco *et al.* 1997; Blanco *et al.* apartat 4.2.6., pàgina 99). Aquest resultat evidencia la capacitat de la línia cel·lular aneuploide d'iniciar la meiosi i assolir com a mínim l'estadi de profase I. Els aparellaments preferents de la línia aneuploide va ser univalent X més bivalent YY i la configuració en trivalent, un resultat similar al descrit per altres investigadors (Hultén i Pearson 1971; Berthelsen *et al.* 1981).

Com en el cas dels individus amb la síndrome de Klinefelter, en aquests individus també es va observar un percentatge significatiu de cèl·lules germinals de segona divisió hiperhaploides XY. En aquest cas, aquest resultat es pot justificar per la segregació regular del bivalent YY i la segregació a l'atzar del cromosoma X a la primera divisió meiòtica.

No obstant això, i com en el cas dels individus amb la síndrome de Klinefelter, els resultats observats en espermatozoides no es van ajustar als resultats esperats, d'acord amb la dotació cromosòmica pels cromosomes sexuals de les cèl·lules germinals de segona divisió. De fet, només en un dels dos pacients estudiats vam observar un increment significatiu d'espermatozoides hiperhaploides XY, tot i que molt inferior a l'esperat, d'acord amb el resultat observat en cèl·lules germinals haploides (Blanco *et al.* 1997).

És a dir, sembla ser que els punts de control que hem discutit en l'apartat anterior també actuarien en individus amb cariotip 47,XYY.

Nogensmenys, altres estudis realitzats en individus amb la síndrome de Klinefelter (Chevret *et al.* 1996; Martini *et al.* 1996; Guttenbach *et al.* 1997; Foresta *et al.* 1998; Kruse *et al.* 1998; Estop *et al.* 1998b; Lim *et al.* 1999) i en individus amb cariotip 47,XYY (Mercier *et al.* 1996; Martini *et al.* 1996; Chevret *et al.* 1997) detecten increments significatius del percentatge d'espermatozoides amb anomalies pels cromosomes sexuals. Per tant, és obvi que algunes de les cèl·lules aneuploides de segona divisió tenen la capacitat de completar la meiosi i generar gàmetes cromosòmicament desequilibrats. De fet, és possible que quan més baix sigui el percentatge observat d'anomalies cromosòmiques en cèl·lules germinals de segona divisió, més difícil és que aquesta dotació cromosòmica s'observi en espermatozoides. Per exemple, en l'estudi d'un dels dos individus amb cariotip 47,XYY (Blanco *et al.* 1997) es va observar un 78,1% dels espermatòcits secundaris o espermatides hiperploides XY, en canvi, només un 0,30% dels espermatozoides analitzats presentaven aquesta dotació cromosòmica. En els altres tres individus amb gonosomopaties analitzats per nosaltres (Blanco *et al.* apartat 4.2.6., pàgina 99) el percentatge de cèl·lules hiperhaploides XY va ser considerablement inferior.

Malgrat els esforços dels darrers anys per intentar esbrinar la segregació dels cromosomes sexuals en individus portadors de gonosomopaties, els treballs publicats fins ara no permeten establir un patró de segregació específica per a cada anomalia. Des del nostre punt de vista són necessaris més estudis, no només per determinar el risc de transmissió a la descendència, també per comprendre els esdeveniments meiòtics que originen la presència d'un cromosoma sexual de més.

### **5.7. Aplicacions clíniques**

La hibridació *in situ* fluorescent aplicada sobre nuclis descondensats d'espermatozoides ha aportat informació valuosa dels esdeveniments meiòtics associats amb l'aparició d'espermatozoides portadors d'anomalies cromosòmiques.

A més, actualment molts laboratoris l'han incorporat com a eina de diagnòstic genètic en individus que presenten un risc elevat de transmetre una anomalia cromosòmica a la

descendència. Entre d'altres, aquesta possibilitat diagnòstica s'està aplicant com a mètode d'avaluació de factors de risc en individus infèrtils candidats a programes d'ICSI (Arán *et al.* 1999; Pang *et al.* 1999), en parelles amb un historial clínic d'avortaments de repetició (Rubio *et al.* 1999), en individus portadors de reorganitzacions cromosòmiques estructurals candidats a programes de diagnòstic genètic preimplantacional (Van Assche *et al.* 1999; Vidal *et al.* 1999), o en individus portadors de gonosomopaties (Arán, comunicació personal).

Tenint en compte que la majoria d'aquestes situacions estan associades amb infertilitat, l'anàlisi del contingut cromosòmic dels espermatozoides procedents d'aquests pacients, permetrà determinar, per a cada cas en particular, el risc potencial de transmissió a la descendència. Aquesta informació pot ser utilitzada per establir el programa de reproducció assistida més adequat a les característiques de cada cas.

## **6. CONCLUSIONS**

**1-** Les tècniques d'hibridació *in situ* fluorescent, aplicades sobre nuclis d'espermatozoides humans prèviament descondensats, permeten l'anàlisi de les anomalies cromosòmiques, numèriques i estructurals, en el nucli interfàsic de la gàmeta masculina.

**2-** En individus control, els mecanismes que originen gàmetes aneuploides afecten preferentment a alguns cromosomes, concretament el cromosoma 21 i els cromosomes sexuals. Aquest fet probablement està relacionat amb la baixa freqüència de recombinació que presenten aquests cromosomes a profase I.

**3-** L'increment significatiu de la freqüència disomies pel cromosoma 21, observat en els dos pares d'individus amb la síndrome de Down d'origen patern, posa de manifest un increment dels processos de no disjunció en l'espermatogènesi d'aquests individus. Aquest resultat suggereix que aquests individus presenten un risc incrementat de transmetre anomalies cromosòmiques a la descendència.

**4-** Les tècniques d'hibridació *in situ* fluorescent, aplicades sobre nuclis d'espermatozoides humans prèviament descondensats, permeten la valoració dels diferents tipus de segregacions que adopten els cromosomes reorganitzats, en individus portadors de translocacions recíproques.

En aquests estudis, la proporció dels genotips resultants de cada tipus de segregació no s'ajusta a la proporció 1:1 esperada, suggerint l'existència de punts de control al llarg de la meiosi que eliminen selectivament cèl·lules germinals en funció del seu contingut cromosòmic.

**5-** Almenys per algunes reorganitzacions, el risc de transmissió d'una anomalia cromosòmica a la descendència pot provenir, o de la presència d'aneusomies recombinants resultants de la segregació dels cromosomes reorganitzats a meiosi I, o de l'increment d'anomalies numèriques resultants de la presència d'efectes intercromosòmics. En última instància, la presència d'efectes intercromosòmics sembla dependre de la severitat de les anomalies meiòtiques provocades per la reorganització estructural.



**6-** En els individus amb la síndrome de Klinefelter, els nostres resultats confirmen la incapacitat de la línia aneuploide 47,XXY d'iniciar la meiosi. D'altra banda, l'increment de cèl·lules aneuploides de segona divisió meiòtica XY, es podria explicar pel desenvolupament de la meiosi en un ambient testicular anormal, conduint a un increment de no disjunció de cèl·lules diploides 46,XY presents al teixit testicular. No obstant això, aquest increment de no es va traduir en un increment d'espermatozoides aneuploides, suggerint l'existència d'un bloqueig meiòtic d'aquestes cèl·lules en l'estadi d'espermatòcit secundari o espermatide.

**7-** En els individus amb cariotip 47,XYY, algunes cèl·lules amb aquesta dotació cromosòmica tenen la capacitat d'iniciar la meiosi. Els dos tipus d'aparellaments majoritaris dels tres cromosomes sexuals a profase van ser la configuració en trivalent i la formació d'un bivalent YY més un univalent X.

Les dades en aquests individus suggereixen l'existència d'un bloqueig de les cèl·lules aneuploides en l'estadi d'espermatòcit primari, secundari o en l'estadi d'espermatide, donant lloc a una eliminació continuada de les cèl·lules anormals al llarg de l'espermatogènesi.

**8-** Les avantatges que presenten les tècniques d'hibridació *in situ* fluorescent per a l'estudi citogenètic de l'espermatozoide humà ha permès la seva incorporació com a eina de diagnòstic genètic en individus de risc.

Tenint en compte que la majoria d'aquests individus presenten problemes de fertilitat, l'anàlisi del contingut cromosòmic dels espermatozoides permet determinar, per a cada cas en particular, el risc potencial de transmissió a la descendència. Aquesta informació pot ser utilitzada per establir el programa de reproducció assistida més adequat a les característiques de cada cas.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

- 
- Álvarez R (1998) Estudis citogenètics en l'espermatozoide humà. Anomalies induïdes per les radiacions ionitzants. Universitat Autònoma de Barcelona. Tesi Doctoral.
  - Angell RR (1991) Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet* 86:383-387.
  - Antonarakis SE (1993) Human chromosome 21: genome mapping and exploration, circa 1993. *TIG* 9:142-148.
  - Arán B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, Egozcue J, Veiga A (1999) Screening for abnormalities of chromosomes X, Y and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril* 72:696-701.
  - Ashley T (1988) Effect of G-band position on meiotic synapsis and crossing-over. *Genetics* 118:307-317.
  - Aurias A, Prieur M, Dutrillaux B, Lejeune J (1978) Systematic analysis of 95 reciprocal translocations of autosomes. *Hum Genet* 45:259-282.
  - Balkan W, Martin RH (1983) Chromosome segregation into the spermatozoa of two men heterozygous for different reciprocal translocation. *Hum Genet* 63:345-348.
  - Barlow P, Vosa CG (1970) The Y chromosome in human spermatozoa. *Nature* 226:961-962.
  - Batanian J, Hultén MA (1987) Electron microscopic investigations of synaptonemal complexes in an infertile human male carrier of a pericentric inversion *inv(1)(q32;q42)*: regular loop formation but defective synapsis including a possible interchromosomal effect. *Hum Genet* 76:81-86.
  - Beatty RA (1977) F-bodies as Y chromosome markers in mature human sperm heads: a quantitative approach. *Cytogenet Cell Genet* 18:33-49.
  - Benet J, Martin RH (1988) Sperm chromosome complements in a 47,XYY man. *Hum Genet* 78:313-315.

- Benkhalifa M, Menezo, Janny L, Pouly JL, Qumsiyeh B (1996) Cytogenetics of uncleaved oocytes and arrested zygotes in IVF programs. *J Assist Reprod Genet* 2:140-148.
- Benzacken B, Martin-Pont B, Bergère M, Hugues JN, Wolf JP, Selva J (1998) Chromosome 21 detection in human oocyte fluorescence in situ hybridization: Possible effect of maternal age. *J Assist Reprod Genet* 15:105-110.
- Bernardini L, Martini E, Geraedts JPM, Hopman AHN, Lanteri S, Conte N, Capitanio GL (1997) Comparison of gonosomal aneuploidy in spermatozoa of normal fertile men and those with severe male factor detected by in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 3:431-438.
- Berthelsen JG, Skakkebaek NE, Perboll O, Nielsen J (1981) Electron microscopic demonstration of the extra Y chromosome in spermatocytes from human XYY males. A: Development and function of reproductive organs. Byskov AG, Peters H (editors). *Excerpta Medica, Amsterdam*, pp 328-337.
- Bischoff FZ, Nguyen DD, Burt KJ, Shaffer LG (1994) Estimates of aneuploidy using multicolor fluorescence in situ hybridization on human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 66:237-243.
- Bishop JB, Dellarco VL, Hassold TJ, Ferguson LR, Wyrobek AJ, Friedman JM (1996) Aneuploidy in germ cells: Etiologies and risk factors. *Environ Mol Mutagen* 28:159-166.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F (1996) Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 11:722-726.
- Blanco J, Rubio C, Simón C, Egozcue J, Vidal F (1997) Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XYY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Hum Genet* 99:413-416.

- 
- Blanco J, Gabau E, Gómez D, Baena N, Guitart M, Egozcue J, Vidal F (1998a) Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 in a population with a high prevalence of Down's syndrome. Increased incidence in cases of paternal origin. *Am J Hum Genet* 63:1067-1072.
  - Blanco J, Egozcue J, Clusellas N, Vidal F (1998b) FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and inter-chromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenet Cell Genet* 83:275-280.
  - Blanco J, Egozcue J, Vidal F (1999) Meiotic behaviour of the sex chromosome in two mosaic 46,XY/47,XXY Klinefelter patients and a 47,XYY patient analysed by FISH. *Cytogenet Cell Genet* 85:47 (P169).
  - Bobrow M, Madan K, Pearson PL (1972) Staining of some specific regions of human chromosomes, particularly the secondary constriction of n°9. *Nature New Biol* 238:122-124.
  - Bossuyt PJ, Van Tienen M-N, De Gruyter L, Smets V, Dumon J, Wauters JG (1995) Incidence of low-fluorescence  $\alpha$ -satellite region on chromosome 21 escaping detection of aneuploidy at interphase by FISH. *Cytogenet Cell Genet* 68:203-206.
  - Bulletti C, Flamigni C, Giacomucci E (1996) Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 2:118-136.
  - Burns J, Koduru P, Alonso M, Chaganti R (1986) Analysis of meiotic segregation in a man heterozygous for two reciprocal translocation using the hamster in vitro penetration system. *Am J Hum Genet* 38:954-964.
  - Chandley AC, Fletcher J, Robinson A (1976) Normal meiosis in two 47,XYY men. *Hum Genet* 33:231-240.
  - Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Mollard J, Sèle B (1994) Male meiotic segregation of gonosomes analysed by two colour FISH in human interphase spermatozoa. *Hum Genet* 94:701-704.

- Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Pelletier R, Cozzi J, Sèle B (1995) Meiotic segregation of the X and Y chromosomes and chromosome 1 analyzed by three-color FISH in human interphase spermatozoa. *Cytogenet Cell Genet* 71:126-130.
- Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Usson Y, Cozzi J, Pelletier R, Sèle B (1996) Increased incidence of hyperhaploid 24,XY spermatozoa detected by three-colour FISH in a 46,XY/47,XXY male. *Hum Genet* 97:171-175.
- Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Usson Y, Cozzi J, Pelletier R, Sèle B (1997) Meiotic behaviour of sex chromosomes investigated by three-colour FISH on 35142 sperm nuclei from two 47,XYY males. *Hum Genet* 99:407-412.
- Cifuentes P, Navarro J, Blanco J, Vidal F, Míguez L, Egozcue J, Benet J (1999) Cytogenetic analysis of sperm chromosomes and sperm nuclei in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) by in situ hybridisation. *Eur J Hum Genet* 7:231-238.
- Coonen E, Pieters M, Dumoulin J, Meyer H, Evers J, Ramaekers F, Geraedts J (1991) Nonisotopic in situ hybridization as a method for nondisjunction studies in human spermatozoa. *Mol Reprod Develop* 28:18-22.
- Couzin DA, Watt JL, Stephen GS (1987) Structural rearrangements in the parents of children with primary trisomy 21. *J Med Genet* 24:280-282.
- Cozzi J, Chevret E, Rousseaux S, Pelletier R, Benitz V, Sèle J (1994) Achievement of meiosis in XXY germ cells: study of 543 sperm karyotypes from an XY/XXY mosaic patient. *Hum Genet* 93:32-34.
- Cremer T, Tesin D, Hopman AHN, Manuelidis L (1988) Rapid interphase and metaphase assessment of specific chromosomal changes in neuroectodermal tumor cells by in situ hybridization with chemically modified DNA probes. *Exp Cell Res* 176:199-220.
- de Braekelaer M, Dao T-N (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6:245-250.

- 
- Downie SE, Flaherty SP, Swann NJ, Matthews CD (1997) Estimation of aneuploidy for chromosomes 3, 7, 16, X and Y in spermatozoa from 10 normospermic men using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 3:815-819.
  - Durban M, Benet J, Sarquella J, Egozcue J, Navarro J (1998) Chromosome studies in first polar bodies from hamster and human oocytes. *Hum Reprod* 13:583-587.
  - Dutrillaux B, Lelorier G, Salat J, Rotman J (1971) Incidence des anomalies chromosomiques dans la stérilité masculine. A propos d'une étude de 40 cas. *Presse Méd* 79:1231-1234.
  - Eastmond DA, Pinkel D (1990) Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific DNA probes. *Mutat Res* 234:303-318.
  - Edwards RG (1986) Causes of early embryonic loss in human pregnancy. *Hum Reprod* 1:185-198.
  - Egozcue J (1976) Variantes y anomalías cromosómicas. A: *Genética Médica*. Egozcue J (editor). Editorial Espaxs, Barcelona, pp 167-186.
  - Egozcue J, Templado C, Vidal F, Navarro J, Morer-Fargas F, Marina S (1983) Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum Genet* 65:185-188.
  - Egozcue J, Templado C, Caballín MR, Navarro J, Miró R, Benet J, Genescà A (1991) Genetics of human spermatozoa. New concepts in reproduction. A: *Proceedings of the 13<sup>th</sup> World Congress on Fertility and Sterility*. Boutaleb Y, Gzouli A. (editors). Parthenon Press, New Jersey, pp 25-30.
  - Egozcue J, Blanco J, Vidal F (1997) Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 3:441-452.
  - Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J (en premsa) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal sperm and recurrent abortion *Hum Reprod Update*.

- Estop AM, Cieply KM, Wakim A, Feingold E (1998a) Meiotic products of two reciprocal translocation studied by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 83:193-198.
- Estop AM, Munné S, Cieply KM, Vandermark KK, Lamb AN, Fisch H (1998b) Meiotic products of a Klinefelter 47,XXY male as determined by sperm fluorescence in-situ hybridization analysis. *Hum Reprod* 13:124-127.
- Estop AM, Cieply KM, Munné S, Feingold E (1999) Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of the spermatozoa of a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Hum Genet* 104:412-417.
- Evans EP, Ford CE, Chaganti RSK, Blank CE, Hunter H (1970) XY spermatocytes in a XYY male. *Lancet* I:719-720.
- Faed M, Robertson J, MacIntosh WS, Grieve J (1976) Spermatogenesis in an infertile XYY man. *Hum Genet* 33:341-347.
- Ferguson LR, Allen JW, Mason JM (1996) Meiotic recombination and germ cell aneuploidy. *Environ Mol Mutagen* 28:192-210.
- Fisher JM, Harvey JF, Lindenbaum RH, Boyd PA, Jacobs PA (1993) Molecular studies of trisomy 18. *Am J Hum Genet* 52:1139-1144.
- Fisher JM, Harvey JF, Morton NE, Jacobs PA (1995) Trisomy 18: studies of the parent and cell division of origin and the effect of aberrant recombination on non-disjunction. *Am J Hum Genet* 56:669-675.
- Ford EHR (1973) Human chromosomes. Ford EHR (editor). Academic Press, London.
- Ford JH, Lester P (1982) Factors affecting the displacement of human chromosomes from the metaphase plate. *Cytogenet Cell Genet* 33:327-332.
- Foresta C, Galeazzi C, Bettella A, Stella M, Scandellari C (1998) High incidence of sperm sex chromosomes aneuploidies in two patients with Klinefelter's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 83:203-205.



- 
- Gabriel-Robez O, Ratomponirina C, Dutrillaux B, Carré-Pigeon F, Rumpler Y (1986) Meiotic association between the XY chromosomes and the autosomal quadrivalent of a reciprocal translocation in two infertile men, 46,XY,t(19;22) and 46,XY,t(17;21). *Cytogenet Cell Genet* 43:154-160.
  - Genescà A, Miró R, Caballín MR, Benet J, Germà JR, Egozcue J (1990) Sperm chromosome studies in individuals treated for testicular cancer. *Hum Reprod* 3:286-290.
  - Genescà A, Caballín MR, Miró R, Benet J, Germà JR, Egozcue J (1992) Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum Genet* 89:181-186.
  - Geraedts J, Pearson PL (1973) Specific staining of the human n°1 chromosome in spermatozoa. *Humangenetik* 20:171-173.
  - Giltay JC, Kastrop PMM, Tiemessen CHJ, van Inzen WG, Scheres JMJC, Pearson PL (1999) Sperm analysis in a subfertile male with a Y;16 translocation, using four-color FISH. *Cytogenet Cell Genet* 84:67-72.
  - Goldman ASH, Hultén MA (1993a) Analysis of chiasma frequency and first meiotic segregation in a male reciprocal translocation heterozygote, t(1;11)(p36.3;q13.1), using fluorescence in situ hybridisation. *Cytogenet Cell Genet* 63:16-23.
  - Goldman ASH, Hultén MA (1993b) Meiotic analysis by FISH of a human male 46,XY,t(15;20)(q11.1;q11.2) translocation heterozygote: quadrivalent configuration, orientation and first meiotic segregation. *Chromosoma* 102:102-111.
  - Goldman ASH, Fomina Z, Knights PA, Hill CJ, Walker AP, Hultén MA (1993) Analysis of the primary sex ratio, sex chromosome aneuploidy and diploidy in human sperm using dual-colour fluorescence in situ hybridization. *Europ J Hum Genet* 1:325-325.
  - Gras L, McBain J, Trounson A, Kola I (1992) The incidence of chromosomal aneuploidy in stimulated and unstimulated (natural) unseminated human oocytes. *Hum Reprod* 7:1396-1401.

- Grifo JA, Boyle A, Fischer E, Lavy G, DeCherney AH, Ward DC, Sanyal MK (1990) Preembryo biopsy and analysis of blastomeres by in situ hybridization. *Am J Obstet Gynecol* 163:2013-2019.
- Guichaoua MR, Quack B, Speed RM, Noel B, Chandley AC, Luciani JM (1990) Infertility in human males with autosomal translocations: meiotic study of a 14;22 robertsonian translocation. *Hum Genet* 86:162-166.
- Guttenbach M, Schmid M (1990) Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 46:553-538.
- Guttenbach M, Schmid M (1991) Non-isotopic detection of chromosome 1 in human meiosis and demonstration of disomic sperm nuclei. *Hum Genet* 87:261-265.
- Guttenbach M, Schakowski R, Schmid M (1994a) Incidence of chromosome 3, 7, 10, 11, 17 and X disomy in mature human sperm nuclei as determined by nonradioactive in situ hybridization. *Hum Genet* 93:7-12.
- Guttenbach M, Schakowski R, Schmid M (1994b) Incidence of chromosome 18 disomy in human sperm nuclei as detected by nonisotopic in situ hybridization. *Hum Genet* 93:421-423.
- Guttenbach M, Michelmann HW, Hinney B, Engel W, Schmid M (1997) Segregation of sex chromosomes into sperm nuclei in a man with 47,XXY Klinefelter's karyotype: a FISH analysis. *Hum Genet* 99:474-477.
- Hall, JG (1990) Genomic imprinting: Review and relevance to human diseases. *Am J Hum Genet* 46:857-873.
- Han TL, Webb GC, Flaherty SP, Corell A, Matthews CD, Ford JH (1992) Detection of chromosome 17- and X-bearing human spermatozoa using fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Develop* 33:189-194.

- 
- Han TL, Ford JH, Webb GC, Flaherty SP, Corell A, Matthews CD (1993) Simultaneous detection of X- and Y- bearing human sperm by double fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Develop* 34:308-313.
  - Han TL, Ford JH, Flaherty SP, Webb GC, Matthews CD (1994) A fluorescent in situ hybridization analysis of the chromosome constitution of ejaculated sperm in a 47,XYY male. *Clin Genet* 45:67-70.
  - Hassold TJ, Jacobs PA (1984) Trisomy in man. *Annu Rev Genet* 18:69-97.
  - Hassold TJ, Pettay D, Freeman SB, Grantham M, Takaesu N (1991a) Molecular studies of non-disjunction in trisomy 16. *J Med Genet* 28:159-162.
  - Hassold TJ, Sherman SL, Pettay D, Page DC, Jacobs PA (1991b) XY chromosome nondisjunction in man is associated with diminished recombination in the pseudoautosomal region. *Am J Hum Genet* 49:253-260.
  - Hassold TJ, Pettay D, Robinson A, Uchida I (1992) Molecular studies of parental origin and mosaicism in 45,X conceptuses. *Hum Genet* 89:647-652.
  - Hassold TJ, Merrill M, Adkins K, Freeman S, Sherman S (1995) Recombination and maternal age-dependent nondisjunction: molecular studies of trisomy 16. *Am J Hum Genet* 57:867-874.
  - Hassold TJ (1996) Mismatch repair goes meiotic. *Nat Genet* 13:261-262.
  - Henderson AS, Waburton D, Atwood KC (1973) Ribosomal DNA connectives between human acrocentric chromosomes. *Nature* 245:95-97.
  - Hixon M, Millie E, Judis LA, Sherman S, Allran K, Taft L, Hassold TJ (1998) FISH studies of the sperm of fathers of paternally derived cases of trisomy 21: no evidence for an increase in aneuploidy. *Hum Genet* 103:654-657.
  - Holmes JM, Martin RH (1993) Aneuploidy detection in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 91:20-24.

- Hsu LY, Shapiro LR, Hirschorn K (1970) Meiosis in an XYY male. *Lancet* I:1173-1174.
- Hultén MA, Pearson PL (1971) Fluorescent evidence for spermatocytes with two Y chromosomes in an XYY male. *Ann Hum Genet* 34:273-276.
- In't Veld P, Branderburg H, Verhoeff A, Onont M, Los F (1995) Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 346:773.
- In't Veld PA, Broekmans FJM, de France HF, Pearson PL, Pieters MHEC, van Kooij RJ (1997) Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. *Hum Reprod* 12:752-754.
- Jacobs PA, Betts PR, Cockwell AE, Crolla JA, MacKenzie MJ, Robinson DO, Youings SA (1990) A cytogenetic and molecular reappraisal of a series of patients with Turner's syndrome. *Ann Hum Genet* 54:209-223.
- Jacobs PA (1992) The chromosome complement of human gametes. *Oxford Rev Reprod Biol* 14:48-72.
- Jalbert P, Sèle B (1979) Factors predisposing to adjacent 2 and 3:1 disjunctions: study of 161 human reciprocal translocations. *J Med Genet* 16:467-478.
- John H, Birnstiel M, Jones K (1969) RNA:DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:582-587.
- Joseph AM, Gosden JR, Chandley AC (1984) Estimation of aneuploidy levels in human spermatozoa using chromosome specific probes and in situ hybridisation. *Hum Genet* 66:234-238.
- Kjessler B (1966) Karyotype, meiosis and spermatogenesis in a sample of men attending an infertility clinic. *Monogr Hum Genet* 2:1-92.
- Klasen M, Schmid M (1981) An improved method for Y-body identification and confirmation of a high incidence of YY sperm nuclei. *Hum Genet* 58:156-161.

- 
- Knights P, Goldman ASH, Kitts J, Hultén MA (1992) Meiotic non-disjunction of the X and Y by two colour FISH analysis of human spermatozoa. *Clinical Cytogenetics Bulletin* 2:22.
  - Kruse R, Guttenbach M, Schartmann B, Schubert R, van der Ven H, Schmid M, Propping P (1998) Genetic counseling in a patient with XXY/XXXY/XY mosaic Klinefelter's syndrome: estimate of sex chromosome aberrations in sperm before intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 69:482-485.
  - Kuo WL, Tenjin H, Segraves R, Pinkel D, Golbus MS (1991) Detection of aneuploidy involving chromosomes 13, 18, or 21, by fluorescence in situ hybridization (FISH) to interphase and metaphase amniocytes. *Am J Hum Genet* 49:112-119.
  - Kupke KG, Müller U (1989) Parental origin of the extra chromosome in trisomy 18. *Am J Hum Genet* 45:599-605.
  - Lähdetie J, Ajosenpää-Saari M, Mykkänen J (1996) Detection of aneuploidy in human spermatozoa of normal semen donors by fluorescence in situ hybridization. *Environ Health Perspec* 104:629-631 (suplement 3).
  - Lamb N, Freeman S, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, Gu Y, Shen J, Saker D, May KM, Avramopoulos D, Petersen MB, Hallberg A, Mikkelsen M, Hassold TJ, Sherman SL (1996) Susceptible chiasmate configurations of chromosomes 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet* 14:400-405.
  - Laurent C, Papathanassiou Z, Haour B, Cognat M (1973) Étude mitotique et méiotique de 70 cas de stérilité masculine. *Andrologie* 5:193-200.
  - Laurie DA, Hultén MA (1985) Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann Hum Genet* 49:189-201.
  - Lejeune J (1963) Autosomal disorders. *Pediatrics* 32:326-337.

- Liebaers I, Bonduelle M, Legein J, Wilikens E, Van Assche E, Buysse A, Wisanto A (1995) Follow-up of children born after intracytoplasmic sperm injection. A: Fertility and Sterility. A Current Overview. Proceedings of the 15<sup>th</sup> World Congress on Fertility and Sterility. Hedon B, Bringer J, Mares P (editors). Parthenon Press, Londres, pp 409-412.
- Lim AST, Fong Y, Yu SL (1999) Estimates of sperm sex chromosome disomy and diploidy rates in a 47,XXY/46,XY mosaic Klinefelter patient. Hum Genet 104:405-409.
- Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Lipshultz LI, Kim ED (1997) In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrated increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. Fertil Steril 68:1065-1069.
- Lindenbaum RH, Hultén MA, McDermott A, Seabright M (1985) The prevalence of translocations in parents of children with regular trisomy 21: a possible interchromosomal effect?. J Med Genet 22:24-28.
- Lorber BJ, Grantham M, Peters J, Huntington FW, Hassold TJ (1992) Nondisjunction of chromosome 21: comparisons of cytogenetic and molecular studies of the meiotic stage and parent of origin. Am J Hum Genet 51:1265-1276.
- Lorda-Sanchez I, Binkert F, Maechler M, Robinson WP, Schinzel AA (1992) Reduced recombination and paternal age effect in Klinefelter syndrome. Hum Genet 89:524-530.
- Lowe X, Collins B, Allen J, Holland N, Breneman J, vanBeek M, Bishop J, Wyrobek A (1995) Aneuploidies and micronuclei in the germ cells of male mice of advanced age. Mutat Res 338:59-76.
- Lu P, Hammitt D, Zinsmeister A, Dewald G (1994) Dual color fluorescence in situ hybridization to investigate aneuploidy in sperm from 33 normal males and a man with a t(2;4;8)(q23;q27;p21). Fertil Steril 62:394-399.

- 
- Luciani JM, Mattei A, Devictor-Vuillet M, Rubin P, Stahl A, Vague J (1970) Étude des chromosomes méiotiques dans un cas de maladie de Klinefelter avec spermatogenèse et caryotype 46,XY/47,XXY. *Ann Génét* 13:249-253.
  - Luciani JM, Vagner-Capodano AM, Devictor-Vuillet M, Aubert L, Stahl A (1973) Presumptive fluorescent evidence for spermatocyte with X+Y+Y diacinetetic univalents in an XYY male. *Clin Genet* 4:415-416.
  - Luciani JM, Guichaoua MR, Mattei A, Morazzani MR (1984) Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. Behaviour of the trivalent and nonrandom association with the sex vesicle. *Cytogenet Cell Genet* 38:14-22.
  - MacDonald M, Hassold T, Harvey J, Wang LH, Jacobs P (1994) The origin of 47,XXY and 47,XXX aneuploidy: heterogeneous mechanisms and role of aberrant recombination. *Hum Mol Gen* 3:1365-1371.
  - Márquez C, Egozcue J, Martorell MR, Moreno V, Templado C (1996) Colcemid increases the frequency of chromosome abnormalities in human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 72:164-170.
  - Martin RH, Balkan W, Burns K, Linn CC (1982) Direct chromosomal analysis of human spermatozoa. *Am J Hum Genet* 34:459-468.
  - Martin RH, Rademaker A (1990) The frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6821 human sperm chromosome complements. *Cytogenet Cell Genet* 53:103-107.
  - Martin RH, Ko E, Rademaker A (1991) Distribution of aneuploidy in human gametes. *Am J Med Genet* 39:321-331.
  - Martin RH, Ko E, Chan K (1993) Detection of aneuploidy in human interphase spermatozoa by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Cytogenet Cell Genet* 64:23-26.

- Martin RH, Rademaker A (1995) Reliability of aneuploidy estimates in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two different scoring criteria. *Mol Reprod Dev* 42:89-93.
- Martin RH, Spriggs E, Rademaker AW (1996) Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of aneuploidy and diploidy frequencies in 225846 sperm from 10 normal men. *Biol Reprod* 54:394-398.
- Martin RH, Ernst S, Rademaker A, Barclay A, Ko E, Summers N (1997) Analysis of human sperm karyotypes in testicular cancer patients before and after chemotherapy. *Cytogenet Cell Genet* 78:120-123.
- Martínez-Pasarell O, Nogués C, Bosch M, Egozcue J, Templado C (1999) Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 104:345-349.
- Martini E, Geraedts JPM, Liebaers I, Land JA, Capitanio GL, Ramaekers FCS, Hopman AHN (1996) Constitution of semen samples from XYY and XXY males as analysed by in-situ hybridization. *Hum Reprod* 11:1638-1643.
- Martini E, Flaherty S, Swann NJ, Payne D, Matthews CD (1997) Analysis of unfertilized oocytes subjected to intracytoplasmic sperm injection using two rounds of fluorescence in-situ hybridization and probes to five chromosomes. *Hum Reprod* 12:2011-2018.
- May KM, Jacobs PA, Lee M, Ratcliffe S, Robinson A, Nielsen J, Hassold TJ (1990) The parental origin of the extra X chromosome in 47,XXX females. *Am J Hum Genet* 46:754-761.
- Melnyk J, Thompson H, Rucci AJ, Vanasele F, Hayes S (1969) Failure of transmission of the extra chromosome in subjects with 47,XYY karyotype. *Lancet* II:797-798.



- 
- Mercier S, Morel F, Roux C, Clavequin MC, Bresson JL (1996) Analysis of the sex chromosomal equipment in spermatozoa of a 47,XYX male using two-colour fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 2:485-488.
  - Mercier S, Morel F, Fellman F, Roux C, Bresson JL (1998) Molecular analysis of the chromosomal equipment in spermatozoa of a 46,XY,(q11.21;cen) carrier by using fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 102:446-451.
  - Miharuru N, Best RG, Young SR (1994) Numerical chromosome abnormalities in spermatozoa of fertile and infertile men detected by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 93:502-506.
  - Mikkelsen M (1971) Down's syndrome. Current stage of cytogenetic research. *Humangenetik* 12:1-28.
  - Moosani N, Pattinson HA, Carter MD, Cox DM, Rademaker AW, Martin RH (1995) Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 64:811-817
  - Mroz K, Hassold TJ, Hunt P (1999) Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors. *Hum Reprod* 14:1151-1156.
  - Munné S, Grifo J, Cohen J, Weier H-UG (1994) Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple-probe FISH study. *Am J Hum Genet* 55:150-159.
  - Munné S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J (1995) The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Mol Hum Reprod* 1:1014-1020.
  - Nath J, Tucker JD, Hando JC (1995) Y chromosome aneuploidy, micronuclei, kinetochores and aging in men. *Chromosoma* 103:725-731.
  - Navarro J, Vidal F, Benet J, Templado C, Marina S, Egozcue J (1991) XY-trivalent association and synaptic anomalies in a male carrier of a Robertsonian t(13;14) translocation. *Hum Reprod* 6:376-381.

- Nicolaidis P, Petersen MB (1998) Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 13:311-319.
- Olson SD, Magenis RE (1988) Preferential paternal origin of de novo structural rearrangements. A: The cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements. Daniel A (editor), Alan R Liss, New York, pp 583-599.
- Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, Kearns WG (1999) Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 14:1266-1273.
- Pardue ML, Gall JG (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci, USA* 64:600-604.
- Pawlowitzki IH, Pearson PL (1972) Chromosomal aneuploidy in human spermatozoa. *Humangenetik* 16:119-122.
- Pellestor F, Sèle B, Jalbert H, Jalbert P (1989) Direct segregation analysis of reciprocal translocations: a study of 283 sperm karyotypes from four carriers. *Am J Hum Genet* 44:464-473.
- Pellestor F (1991) Frequency and distribution of aneuploidy in human female gametes. *Hum Genet* 86:283-288.
- Pellicer A, Rubio C, Vidal F, Mínguez Y, Giménez C, Egozcue J, Remohí J, Simón C (1999) In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 71:1-7.
- Penrose LS (1933) The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. *J Genet* 27:219-224.
- Perreault SD, Zirkin BR (1982) Sperm nuclear decondensation in mammals: Role of sperm-associated proteinase in vivo. *J Exp Zool* 224:253-257.

- 
- Petersen MB, Frantzen M, Antonarakis SE, Warren AC, van Broeckhoven C, Chakravarti A, Cox TK, Lund C, Olsen B, Poulsen H, Sand A, Tommerup N, Mikkelsen M (1992) Comparative study of microsatellite and cytogenetic markers for detecting the origin of the nondisjoined chromosome 21 in Down syndrome. *Am J Hum Genet* 51:516-525.
  - Pieters MHEC, Geraedts JPM, Meyer H, Dumoulin JCM, Evers JLH, Jongbloed RJE, Nederlof PM, Van der Flier S (1990) Human gametes and zygotes studied by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 53:15-19.
  - Preston RJ (1996) Aneuploidy in germ cells: Disruption of chromosome mover components. *Environ Mol Mutagen* 28:176-181.
  - Robbins WA, Segraves R, Pinkel D, Wyrobek AJ (1993) Detection of aneuploid human sperm by fluorescence in situ hybridization: Evidence for a donor difference in frequency of sperm disomic for chromosomes 1 and Y. *Am J Hum Genet* 52:799-807.
  - Robbins WA, Meistrich ML, Cassel MJ, Wyrobek AJ (1994) Aneuploidy in sperm of Hodgkin's disease patients receiving NOVP chemotherapy. *Am J Hum Genet* 55:A371.
  - Roberts AM, Goodall H (1976) Y chromosome visibility in quinacrine-stained human spermatozoa. *Nature* 262:493-494.
  - Ross A, Waymire K, Moss J, Parlow AF, Skinner M, Russell L, MacGregor G (1998) Testicular degeneration in Bclw-deficient mice. *Nat Genet* 18:251-256.
  - Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Delafontaine D, Sèle B (1995) Sperm nuclei analysis of a Robertsonian t(14q21q) carrier, by FISH, using three plasmids and two YAC probes. *Hum Genet* 96:655-660.
  - Rubio C, Simón C, Blanco J, Vidal F, Mínguez Y, Egozcue J, Crespo J, Remohí J, Pellicer A (1999) Implication of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet* 16:253-258.

- Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi R (1978) Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 274:911-913.
- Saadallah N, Hultén MA (1986) EM investigations of surface spread synaptonemal complexes in a human male carrier of a pericentric inversion inv(13)(p12q14): the role of heterosynapsis for spermatocyte survival. *Ann Hum Genet* 50:369-383.
- Schwinger E, Ites J, Korte B (1976) Studies on frequency of Y chromatin in human sperm. *Hum Genet* 34:265-270.
- Seligman J, Kosower NS, Weissenberg R, Shalgi R (1994) Thiol-disulfide status of human sperm proteins. *J Reprod Fertil* 101:435-443.
- Serés-Santamaria A, Català V, Cuatrecasas E, Villanueva R (1993) Fluorescent in-situ hybridization and Down's syndrome. *Lancet* 341:1544.
- Serra A, Brahe C, Millington-Ward A, Neri B, Tedeschi F, Tassone F, Bova R (1990) Pericentric inversion of chromosome 9: prevalence in 300 Down syndrome families and molecular studies of nondisjunction. *Am J Med Genet* 7:162-168 (suplement).
- Sharara FI (1999) Klinefelter's Syndrome. A: *Encyclopedia of Reproduction*, Academic Press 2:938-941.
- Sherman SL, Takaesu N, Freeman SB, Grantham M, Phillips C, Blackston RD, Jacobs PA, Cockwell AE, Freeman V, Uchida I, Mikkelsen M, Kurnit DM, Buraczynska M, Keats BJB, Hassold TJ (1991) Trisomy 21: Association between reduced recombination and nondisjunction. *Am J Hum Genet* 49:608-620.
- Skakkebaek NE, Phillip J, Hammen R (1969) Meiotic chromosomes in Klinefelter's syndrome. *Nature* 221:1075-1076.
- Speed RM (1989) Heterologous pairing and fertility in humans. A: *Fertility and chromosome pairing: recent studies in plant and animals*. Gillies GB (editor). CRC Press Inc, Sydney, pp2-30.

- 
- Speed RM, Faed MJW, Batstone PJ, Baxby K, Barnetson W (1991) Persistence of two chromosomes through meiotic prophase and metaphase I in an XYY man. *Hum Genet* 87:416-420.
  - Spriggs E, Martin RH (1994) Analysis of segregation in a human male reciprocal translocation carrier, t(1;11)(p36.3;q13.1), by two-colour fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev* 38:247-250.
  - Spriggs E, Rademaker AW, Martin RH (1996) Aneuploidy in human males: The use of FISH to test various theories of nondisjunction. *Am J Hum Genet* 58:356-362.
  - Sumner AT, Robinson JA (1976) A difference in dry mass between the heads of X- and Y-bearing human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 48:9-15.
  - Templado C, Navarro J, Vidal F, Marina S, Egozcue J (1984) Meiotic translocations in two sterile males. *Hum Genet* 67:239.
  - Templado C, Navarro J, Benet J, Genescà A, Pérez MM, Egozcue J (1988) Human sperm chromosome studies in a reciprocal translocation t(2;5). *Hum Genet* 79:24-28.
  - Templado C, Navarro J, Requena R, Benet J, Ballesta F, Egozcue J (1990) Meiotic and sperm chromosome studies in a reciprocal translocation, t(1;2)(q32;q36). *Hum Genet* 84:159-162.
  - Templado C, Márquez C, Munné S, Colls P, Martorell MR, Ciepły K, Benet J, Van Kirk V, Navarro J, Estop AM (1996) An analysis of human sperm chromosome aneuploidy. *Cytogenet Cell Genet* 74:194-200.
  - Tettenborn V, Gropp A, Murker JC, Tinnefeld W, Fuhrmann W, Schwinger E (1970) Meiosis and testicular histology in XYY males. *Lancet* II:267-268.
  - Thompson H, Melnyk J, Hecht F (1967) Reproduction and meiosis in XYY men. *Lancet* II:831.

- Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, Bonduelle M, Vandervorst M, Van Steirteghem A, Liebaers I (1999) Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in-situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Mol Hum Reprod* 5:682-690.
- Van Hummelen P, Manchester D, Lowe X, Wyrobek AJ (1997) Meiotic segregation, recombination, and gamete aneuploidy assessed in a t(1;10)(p22.1;q22.3) reciprocal translocation carrier by three- and four probe multicolor FISH in sperm. *Am J Hum Genet* 61:651-659.
- Vendrell JM, García F, Veiga A, Calderón G, Egozcue S, Egozcue J, Barri PN (1999) Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Hum Reprod* 14:375-378.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Freidline M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A (1995a) Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 1:1923-1927.
- Verlinsky Y, Ginsberg M, Chmura M, Freidline M, White M, Strom C, Kuliev A (1995b) Cross-hybridization of the chromosome 13/21 alpha satellite DNA probe to chromosome 22 in the prenatal screening of common chromosomal aneuploidies by FISH. *Prenat Diag* 15:831-834.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Lifchez A, Strom C, Kuliev A (1996) Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body fluorescent in situ hybridization analysis. Preimplantation genetics group. *Fertil Steril* 66:126-129.
- Verlinsky Y, Evsikov S (1999) Karyotyping of human oocytes by chromosomal analysis of the second polar bodies. *Mol Hum Reprod* 5:89-95.
- Vidal F, Templado C, Navarro J, Marina S, Egozcue J (1982) Meiotic and synaptonemal complex studies in a 14/21 translocation carrier. *Int J Androl* 5:21-26.

- 
- Vidal F, Navarro J, Templado C, Brusadin S, Egozcue J (1984) Synaptonemal complex studies in a mosaic 46,XY/47,XXY male. *Hum Genet* 66:306-308.
  - Vidal F, Navarro J, Templado C, Egozcue J (1987) Synaptonemal complex studies in the male. *Hum Reprod* 2:577-581.
  - Vidal F, Blanco J, Rubio MC, Giménez C, Simón C, Martínez MC, Santaló J, Mínguez Y, Pellicer A, Remohí J, Egozcue J (1999) Segregation analysis in the spermatozoa and preimplantation genetic diagnosis in the embryos from a patient 46,XY,t(7;Y)(q13;p11). *Cytogenet Cell Genet* 85:60 (P229).
  - Vysis Inc, product catalog 1999-2000. Downers Grove IL, USA.
  - Wall MB, Marks K, Smith TA, Gearon CM, Muggleton-Harris AL (1996) Cytogenetic and fluorescent in-situ hybridization chromosomal studies on in-vitro fertilized and intracytoplasmic sperm injected “failed-fertilized” human oocytes. *Hum Reprod* 11:2230-2238.
  - Warren AC, Chakravarti A, Wong C, Slaugenhaupt SA, Halloran SL, Watkins PC, Metaxotou C, Antonarakis SE (1987) Evidence for reduced recombination on the nondisjoined chromosomes 21 in Down syndrome. *Science* 237:652-654.
  - West JD, West KM, Aitken RJ (1989) Detection of Y-bearing spermatozoa by DNA-DNA in situ hybridization. *Mol Reprod Develop* 1:201-207.
  - Williams BJ, Ballenger CA, Malter HE, Bishop F, Tucker M, Zwingman TA, Hassold TJ (1993) Non-dinjunction in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two and three probes. *Hum Mol Genet* 2:1929-1936.
  - Wyrobek AJ, Alhborn T, Balhorn R, Stanker L, Pinkel D (1990) Fluorescence in situ hybridization to Y chromosome in decondensed human sperm nuclei. *Mol Reprod Develop* 27:200-208.
  - Wyrobek AJ, Robbins WA, Weier HU, Pinkel D (1992) Detection of human sperm carrying sex-chromosomal and autosomal aneuploidies using one, two, and three-color fluorescence in situ hybridizations. *Am J Hum Gen* 51:A23-82 (supplement).

- Wyrobek AJ, Robbins WA, Mehraein Y, Pinkel D, Weier HU (1994) Detection of sex chromosomal aneuploidies X-X, Y-Y and X-Y in human sperm using two-chromosome fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 53:1-7.
- Wyrobek AJ, Lowe X, Pinkel D, Bishop J (1995a) Aneuploidy in late-step spermatids of mice detected by two-chromosome fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev* 40:259-266.
- Wyrobek AJ, Rubes J, Cassel M, Moore D, Perreault S, Slott V, Evenson D, Zudova Z, Borkovec L, Selevan S, Lowe X (1995b) Smokers produce more aneuploid sperm than non-smokers. *Am J Hum Genet* 57:A31.
- Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ (1976) Use of zona free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of the human spermatozoa. *Biol Reprod* 15:471-476.
- Zaragoza MV, Millie E, Redline RW, Hassold TJ (1998) Studies of non-disjunction in trisomies 2, 7, 15, and 22: does the parental origin of trisomy influence placental morphology?. *J Med Genet* 35:924-931.
- Zijno A, Leopardi P, Marcon F, Crebelli R (1996) Sex chromosome loss and non-disjunction in women: analysis of chromosomal segregation in binucleated lymphocytes. *Chromosoma* 104:461-467.
- Zirkin BR, Soucek DA, Chang TSK, Perreault SD (1985) In vitro and in vivo studies of mammalian sperm nuclear decondensation. *Gamet Res* 11:349-365.
- Zuffardi O, Tiepolo L (1982) Frequencies and types of chromosome abnormalities associated with human male infertility. A: Genetic control of gamete production and function. Crosignani PG, Rubin BL (editors). Academic Press, London, pp 261-273.