

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Facultat de Biociències
Universitat Autònoma de Barcelona

**Reorganitzacions cromosòmiques:
segregació, efecte intercromosòmic i risc reproductiu**

Ester Anton Martorell

Memòria presentada per optar al Grau de Doctor per la
Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, 2008

Directors:

Dra. Francesca Vidal Domínguez i Dr. Joan Blanco Rodríguez.

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

CERTIFIQUEN:

Que Ester Anton Martorell ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació que s'exposa en la memòria titulada "Reorganitzacions cromosòmiques: segregació, efecte intercromosòmic i risc reproductiu" per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

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

I perquè així consti, firmen el present certificat.

Bellaterra, 5 de juny de 2008.

Dra. Francesca Vidal Domínguez

Dr. Joan Blanco Rodríguez

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

- Ministerio de Ciencia y Tecnología (DGI) SAF2003-04312
- Generalitat de Catalunya 2005SGR-00437

Ester Anton Martorell s'ha beneficiat d'una beca predoctoral per a la Formació de Personal Investigador (2001FI/00457) concedida pel Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, i de dos ajuts d'aquest mateix organisme per a estades a l'estranger (2003BV/00043, 2004BV/00112).

Als meus pares,
per tenir sempre totes les respostes.

Al Txema,
per ser la meva resposta.

“Habrá vivido más de cien años el viejo estanque de oro y lluvia,
pensando a ver si el sol tal vez quisiera nadar...”

Menta y agua, La buena vida

ÍNDIX

1- Introducció	1
1.1- Bases genètiques de la infertilitat masculina	3
1.1.1- Anomalies cromosòmiques	6
1.2- Efecte de les variants cromosòmiques estructurals sobre la fertilitat	9
1.2.1- Progressió meiòtica alterada	10
1.2.2- Producció de gàmetes desequilibrats	10
1.3- Comportament meiòtic de les variants cromosòmiques estructurals	11
1.3.1- Translocacions Robertsonianes	11
1.3.2- Translocacions recíproques	13
1.3.3- Inversions	17
1.4- L'efecte intercromosòmic	20
1.5- Estudis citogenètics en espermatozoides i consell reproductiu en portadors de reorganitzacions cromosòmiques	21
1.5.1- Estudis de segregació	22
1.5.2- Estudis d'ICE	23
2- Objectius	25
3- Material i mètodes	29
3.1- Mostres analitzades	31
3.2- Fixació i emmagatzematge de les mostres	32
3.3- Protocol de FISH en espermatozoides	33
3.3.1- Descondensació de la cromatina del nucli dels espermatozoides	33
3.3.2- Desnaturalització del DNA espermàtic	34
3.3.3- Preparació de les sondes	35
3.3.4- Hibridació	40
3.3.5- Rentats i contratinció	40
3.4- Valoració microscòpica	40
3.4.1- Microscopi	40
3.4.2- Criteris d'anàlisi	43
3.5- Anàlisi estadística dels resultats	45
3.5.1- Número d'espermatozoides valorats	45

3.5.2- Programes estadístics.....	47
3.5.3- Població control.....	47
4- Resum de resultats	49
4.1- Portadors de translocacions Robertsonianes	51
4.1.1- Segregació	51
4.1.2- Efecte intercromosòmic.....	52
4.2- Portadors de translocacions recíproques	52
4.2.1- Segregació	52
4.2.2- Efecte intercromosòmic.....	59
4.3- Portadors d'inversions	60
4.3.1- Segregació	60
4.3.2- Efecte intercromosòmic.....	61
5- Publicacions	63
Treball 1	67
<i>Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10).</i>	
Anton E , Blanco J, Egozcue J, Vidal F	
Human Reproduction 19:1345-1351	
Treball 2	77
<i>Preferential alternate segregation in the common t(11;22)(q23;q11) reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers.</i>	
Anton E , Vidal F, Egozcue J, Blanco J	
RBM-Online 9(6):637-644	
Treball 3	87
<i>Reciprocal translocations: tracing their meiotic behavior.</i>	
Anton E , Vidal F, Blanco J	
Genetics in Medicine (Acceptat, juny 2008)	
Treball 4	107
<i>Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion inv(6)(p23q25) carrier using FISH on decondensed sperm nuclei.</i>	
Anton E , Blanco J, Egozcue J, Vidal F	
Cytogenetics and Genome Research 97:149-154	
Treball 5	115
<i>Genetic reproductive risk in inversion carriers.</i>	
Anton E , Vidal F, Egozcue J, Blanco J	
Fertility and Sterility 85(3):661-666	

Treball 6.....	123
<i>Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review.</i>	
Anton E , Blanco J, Egozcue J, Vidal F	
Cytogenetics and Genome Research 111(3-4):297-304	
Treball 7.....	133
<i>Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers.</i>	
Anton E , Vidal F, Blanco J	
Human Reproduction 22(8):2088-2092	
6- Discussió	141
6.1- Segregació	143
6.1.1- Translocacions Robertsonianes.....	143
6.1.2- Translocacions recíproques.....	146
6.1.3- Inversions	151
6.2- Efecte intercromosòmic.....	153
6.2.1- ICE en portadors de translocacions Robertsonianes.....	154
6.2.2- ICE en portadors de translocacions recíproques.....	155
6.2.3- ICE en portadors d'inversions.....	157
6.2.4- Altres factors relacionats amb la producció d'espermatozoides amb anomalies numèriques.....	158
6.3- Consell reproductiu.....	160
7- Conclusions	163
8- Annexes	167
Annex I: Recull bibliogràfic de dades de segregació	169
Annex II: Recull bibliogràfic de dades d'ICE	177
Annex III: Recull de sondes utilitzades	183
9- Bibliografia	187



1- Introducció

1.1- BASES GENÈTIQUES DE LA INFERTILITAT MASCULINA

Aproximadament el 15% de les parelles presenten problemes de fertilitat i en la meitat dels casos hi participa un factor masculí (revisat per Evers 2002). Tot i que les causes d'infertilitat¹ masculina poden ser d'etiologia molt diversa: endocrina, immunològica, vírica, resultant de lesions o d'agents tòxics, entre d'altres (Skakkebaek et al. 1994), s'estima que el 30% tenen un origen genètic (Kupker et al. 1999). L'etiologia genètica de la infertilitat es pot classificar en tres categories:

► Delecions del cromosoma Y

Representen la causa genètica més freqüent en individus azoospermics i oligozoospermics, afectant un de cada 10 pacients amb aquestes alteracions del seminograma (Guttenbach i Schmid 1990; De Braekeleer et al. 2006).

Les regions del cromosoma Y afectades per aquestes delecions es coneixen amb el nom de *AZF* (factor d'azoospermia). S'han identificat els *loci* *AZFa*, *AZFb* i *AZFc* localitzats de forma consecutiva al llarg de la banda Yq11 (**Figura 1.1**) (Vogt et al. 1996) i s'ha proposat l'existència d'un quart *locus* *AZFd*, situat entre *AZFb* i *AZFc* (Kent-First et al. 1999).

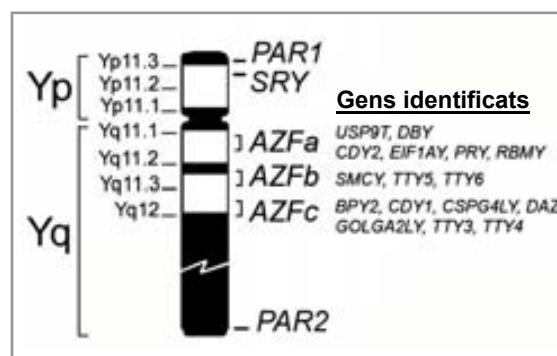


Figura 1.1- Ideograma del cromosoma Y humà on es localitzen les regions pseudoautosòmiques (*PAR1* i *PAR2*), la regió determinant del sexe (*SRY*) i els *loci* *AZFa*, *b* i *c*. Aquests últims contenen gens relacionats amb la fertilitat masculina.

El *locus* *AZFc* és el que més sovint es veu afectat en aquest tipus de delecions, tot i que en alguns casos s'hi veuen implicats diversos *loci* a la vegada (**Figura 1.2**).

¹L'existència de nombroses connotacions associades al concepte "infertilitat" ha generat recents debats sobre la definició i ús correcte d'aquest terme en diferents àmbits (Habbema et al. 2004). En aquest treball el concepte d'infertilitat s'utilitza per fer referència a la reducció de la capacitat reproductiva d'un individu que implica una dificultat per poder concebre o dur un embaràs a terme (Gardner and Sutherland 2004).

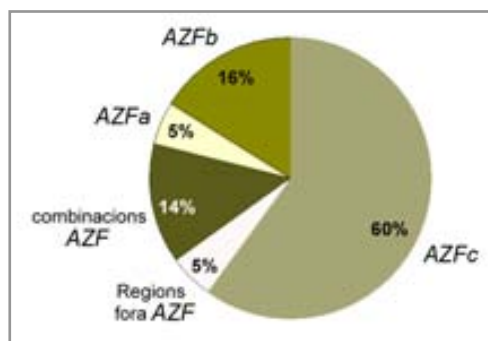


Figura 1.2- Freqüència relativa de les deleccions en el cromosoma Y en individus infèrtils (a partir de Foresta et al. 2001)

Malgrat que la carència dels gens deleccionats està clarament relacionada amb l'aparició de problemes de fertilitat, encara no s'ha pogut establir una relació directa entre els diferents tipus de deleccions i els efectes produïts en el fenotip de l'individu (De Braekeleer et al. 2006). Són una excepció les deleccions completes de la regió *AZFa* que han s'han associat a l'absència total de cèl·lules germinals (Síndrome de *Sertoli-Cell-Only*), i les deleccions completes de la regió *AZFb* que comporten una manca de maduració espermàtica.

► **Alteració de gens específics**

S'han descrit centenars de gens relacionats amb el desenvolupament sexual i la gametogènesi humana, la majoria dels quals han estat estudiats a través de models animals (Matzuk i Lamb 2002). Les vies d'expressió d'aquests gens formen un complex entramat en el que la mutació d'algun d'ells pot alterar el resultat global del procés i donar lloc a infertilitat (**Figura 1.3**).

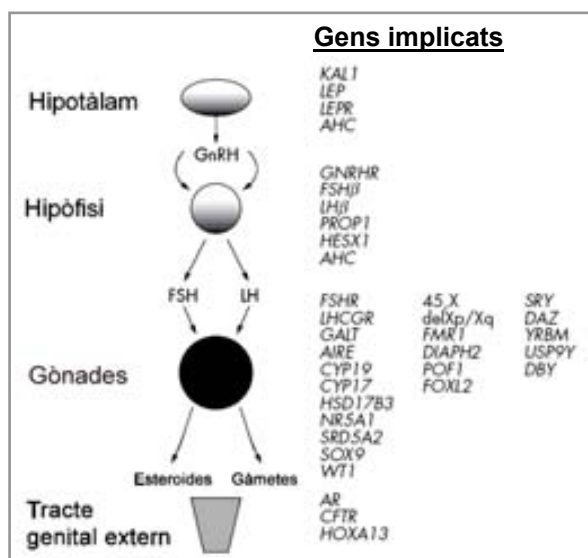


Figura 1.3- Gens expressats al llarg de l'eix hipotàlam-hipofisari-gonadal implicats en problemes de fertilitat (adaptat de Layman 2002).

En el diagnòstic clínic dels individus que consulten per infertilitat, els gens que més sovint s'inclouen en el cribatge gènic donada la seva elevada incidència són els següents (Foresta et al. 2002):

- *CFTR* (regulador de la conductància transmembranal de la fibrosi quística)

S'han descrit més de 1000 mutacions per aquest gen (localitzat a la banda 7q31) entre les quals hi trobem mutacions relacionades amb l'absència congènita de vasos deferents i amb deficiències en els processos de maduració espermàtica (Shah et al. 2003). La incidència de mutacions en heterozigosi en individus amb infertilitat idiopàtica és d'aproximadament el 6% (Jakubiczka et al. 1999; Schulz et al. 2006).

- *AR* (receptor d'andrògens)

S'estima que les mutacions en aquest gen (localitzat a la regió Xq11q12) podrien arribar a explicar un 2% dels casos que consulten per infertilitat (Ferlin et al. 2006). Aquests individus presenten com a característica comú azoospermia o oligozoospermia severa.

► Alteracions cromosòmiques

Entre un 2-8% dels individus que consulten per infertilitat són portadors d'alteracions cromosòmiques (revisat per Ferlin et al. 2007), tot i que aquest percentatge s'incrementa fins a un 13% en poblacions d'individus azoospermics (revisat per Mau-Holzmann 2005). Aquests valors són notablement superiors als de la població general on, entre un 0.4-0.8% dels nounats, presenta alteracions cromosòmiques en el seu cariotip (De Braekeleer i Dao 1991; Nielsen i Wohlert 1991).

Aquests canvis poden ser numèrics o estructurals. Els primers impliquen una variació en el nombre de cromosomes (acompanyada de guany o pèrdua de DNA), mentre que els segons comporten una variació de la distribució del DNA d'algun/s cromosoma/es.

Les alteracions que apareixen amb més freqüència en poblacions d'individus infèrtils (52%) són anomalies numèriques en aneuploidia (el número de cromosomes no és múltiple del nombre cromosòmic bàsic de l'espècie), i preferentment afecten els cromosomes sexuals (**Figura 1.4**). El 48% restant són portadors de variants i anomalies cromosòmiques estructurals entre les quals, les

translocacions són les més freqüents (a partir de Mau-Holzmann 2005) (**Figura 1.4**).

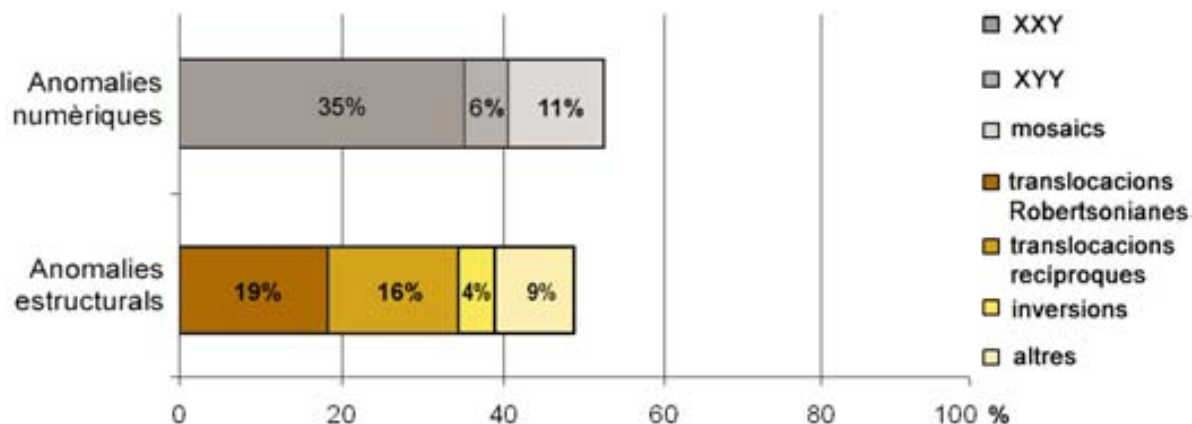


Figura 1.4- Freqüències relatives de les diverses anomalies cromosòmiques constitucionals detectades en poblacions d'individus infèrtils (a partir de Mau-Holzmann 2005).

1.1.1- ANOMALIES CROMOSÒMIQUES

► Aneuploïdies dels cromosomes sexuals

En el 80% dels casos aquestes anomalies es presenten en forma pura, és a dir afectant a totes les cèl·lules dels portadors (Mau-Holzmann 2005). En el 10% restant, es troben en forma de mosaic, amb coexistència d'una línia cel·lular normal 46,XY i una o varies línies aneuploides. Les aneuploïdies majoritàries en individus infèrtils són les següents:

47,XXY (Síndrome de Klinefelter)

La incidència d'aquesta síndrome és de aproximadament 1/600 nounats (Nielsen i Wohlert 1991) però augmenta deu vegades en individus amb problemes de fertilitat (Mau-Holzmann 2005) (**Taula 1.1**).

Els portadors presenten uns trets fenotípics característics a més dels problemes de fertilitat derivats d'un bloqueig de l'espermatogènesi (azoospermia o oligozoospermia severa). Aquests efectes són més lleus en individus amb mosaïcisme (revisat per Lanfranco et al. 2004).

47, XYY

Afecta 1/1000 nounats (Nielsen i Wohlert 1991) i presenta una incidència tres vegades superior en individus infèrtils (Mau-Holzmann 2005).

Els individus portadors no solen presentar uns trets fenotípics diferencials i en la majoria de casos, l'espermatogènesi és normal. Això s'ha relacionat amb una pèrdua del cromosoma Y addicional en etapes pre-meiotiques (revisat per Rives et

al. 2003b) i també amb la competència de les cèl·lules XYY que poden entrar en meiosi i formar un trivalent en l'aparellament dels cromosomes sexuals evitant així un bloqueig meiótic (Blanco et al. 2001).

Taula 1.1- Incidència d'anomalies cromosòmiques numèriques en diverses poblacions d'individus infèrtils (a partir de Mau-Holzmann 2005)

	XXY (%)	XYY (%)	Mosaics (%)	TOTAL (%)
Azoospèrmics	8.7	0.1	1.3	10.1
Oligozoospèrmics	0.5	0.3	0.2	1.0
Infèrtils	2.0	0.3	0.1	2.4
Estudis previs a FIV	0.0	0.2	0.0	0.2
Estudis previs a ICSI	1.0	0.3	0.8	2.1
Incidència global	1.7	0.3	0.5	2.5

► **Variants cromosòmiques estructurals**

Aquestes reorganitzacions són equilibrades (no hi ha guany ni pèrdua de DNA), de manera que la majoria d'individus portadors no presenten efectes fenotípics. En humans, les variants cromosòmiques estructurals que s'observen amb més freqüència són:

Translocacions Robertsonianes (rob)

Aquest tipus de reorganització va ser descrita per primera vegada per W.R.B. Robertson l'any 1916 i consisteix en una unió de dos cromosomes acrocèntrics que passen a formar un sol cromosoma anomenat *derivatiu* (ISCN 2005) (**Figura 1.5**).

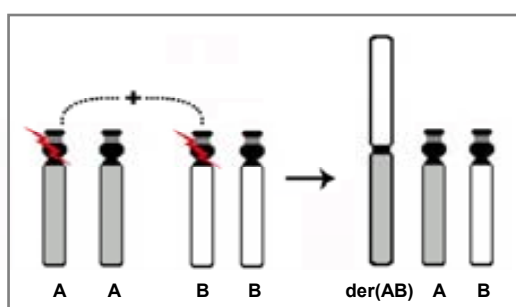


Figura 1.5 – Mecanisme de formació d'una translocació Robertsoniana. El trencament dels cromosomes A i B a la regió pericentromèrica i la posterior unió dels dos segments origina el cromosoma derivatiu, der(AB).

Són presents en 1.23/1000 nounats (Nielsen i Wohlert 1991) i d'entre totes les combinacions possibles en humans, la més freqüent és la der(13;14)(q10;q10) afectant a quatre de cada cinc individus portadors (Nielsen i Wohlert 1991).

En individus infèrtils, la incidència d'aquests reorganitzacions és 9 vegades superior (De Braekeleer i Dao 1991) i augmenta especialment en els casos amb oligozoospermia on les freqüències són dotze vegades més elevades (Mau-Holzmann 2005) (**Taula 1.2**)

Translocacions recíproques (rcp)

Les translocacions recíproques són un tipus de reorganització que es dona entre cromosomes no homòlegs (normalment dos) que pateixen un trencament en un dels seus braços i que durant la seva reparació s'intercanvien mútuament els dos fragments terminals generats (**Figura 1.6**). Els cromosomes reorganitzats resultants també s'anomenen *derivatius* i s'identifiquen segons el centròmer que presenten.

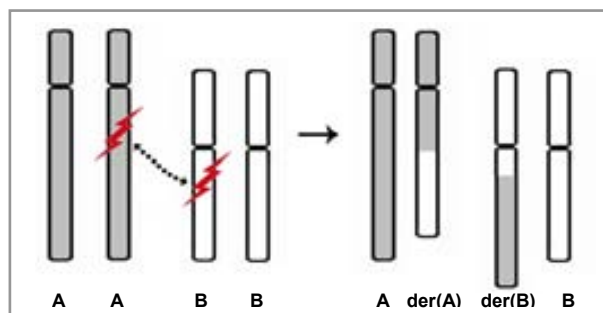


Figura 1.6 - Mecanisme de formació d'una translocació recíproca. El cromosoma A i el cromosoma B que han patit un trencament intercanvien els segments distals originant els cromosomes derivatius, der(A) i der(B).

Aproximadament 1/700 nounats són portadors de translocacions recíproques equilibrades (Nielsen i Wohler 1991). Aquesta incidència augmenta sis vegades en poblacions d'individus infèrtils (De Braekeleer i Dao 1991) (**Taula 1.2**). Normalment impliquen autosomes però en un de cada cinc casos la translocació es dona entre un autosoma i un gonosoma (Mau-Holzmann 2005).

Inversions (inv)

Les inversions són reorganitzacions intracromosòmiques que consisteixen en un canvi de sentit d'una regió del cromosoma que pot incloure el centròmer (inversions pericèntriques; **Figura 1.7A**) o no (inversions paracèntriques; **Figura 1.7B**).

Al voltant d'un 1-2% dels individus de la població general són portadors d'inversions (de la Chapelle et al. 1974; Kaiser 1984). No obstant, la major part d'elles són considerades variants polimòrfiques que afecten les regions

heterocromàtiques dels cromosomes 1, 9, 16 i Y o la regió pericentromèrica del cromosoma 2.

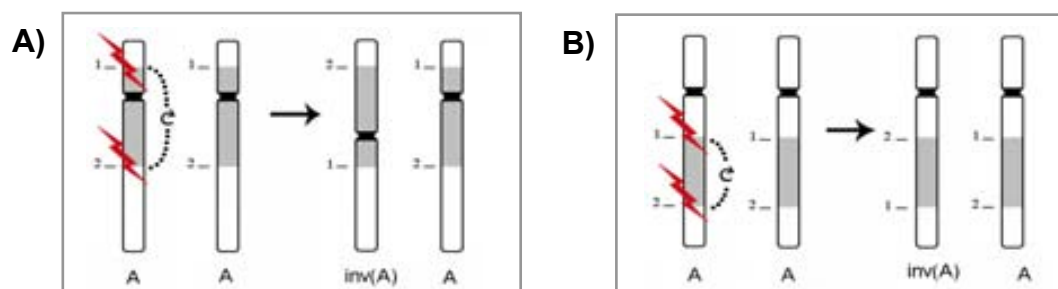


Figura 1.7- Mecanisme de formació d'una inversió A) pericèntrica B) paracèntrica. Els dos trencaments del cromosoma A (posicions 1 i 2) són reparats de forma que la regió interior canvia de sentit originant el cromosoma inv(A).

Pel que fa a les inversions no polimòrfiques, la seva incidència és la més baixa de totes les reorganitzacions cromosòmiques, amb freqüències que oscil·len entre 0.01% i el 0.07% (Mau-Holzmann 2005). Aquests valors són 3-20 vegades superiors en poblacions d'individus infèrtils (**Taula 1.2**).

Taula 1.2- Incidència de les variants cromosòmiques estructurals en diverses poblacions d'individus infèrtils (a partir de Mau-Holzmann 2005).

	rob (%)	rcp (%)	inv (excepte X,Y) (%)	Altres (%)	TOTAL (%)
Azoospermics	0.2	0.7	0.0	1.2	2.1
Oligozoospermics	1.5	0.9	0.3	0.3	2.9
Infèrtils	0.7	0.5	0.3	0.6	2.1
Estudis previs a FIV	0.2	0.5	0.0	0.0	0.6
Estudis previs a ICSI	0.9	0.9	0.3	0.4	2.4
Incidència global	0.9	0.8	0.2	0.5	2.3

1.2- EFECTE DE LES VARIANTES CROMOSÒMIQUES ESTRUCTURALS SOBRE LA FERTILITAT

Les reorganitzacions cromosòmiques poden afectar la correcta progressió de la meiosi dels individus portadors. Aquest és un procés altament regulat, que consta d'una primera etapa (profase I) en la que és necessari un reconeixement entre les regions homòlogues del genoma per tal de que els cromosomes quedin aparellats (formació de bivalents). La presència de variants cromosòmiques dificulta, tant el reconeixement d'homologia, com el seu posterior repartiment. Això pot

comprometre la fertilitat de l'individu en dos aspectes fonamentals que es revisen a continuació.

1.2.1- PROGRESSIÓ MEIÒTICA ALTERADA

El reconeixement d'homologia de les regions implicades en aquestes alteracions provoca que els cromosomes adoptin geometries d'aparellament complexes. Aquestes configuracions moltes vegades dificulten l'aparellament i afavoreixen l'aparició de regions asinàptiques. En el cas de les reorganitzacions estructurals, les anomalies sinàptiques sovint es localitzen prop dels punts de trencament (Oliver-Bonet et al. 2005). En les numèriques, poden afectar cromosomes sencers que es presenten en forma d'univalents (Solari i Rey Valzacchi 1997; Blanco et al. 2001).

Aquestes irregularitats són detectades per diversos punts de control del cicle cel·lular que intervenen durant la progressió de la meiosi. Un d'aquests mecanismes actua durant l'etapa de paquítè verificant que les regions homòlogues hagin aparellat correctament (Roeder and Bailis 2000). La presència de regions asinàptiques pot desencadenar la seva activació que aturarà la progressió de la meiosi.

A l'etapa de metafase I s'ha descrit la participació d'un segon punt de control que actua verificant la correcta disposició dels cromosomes i del fus meiòtic. La presència de cromosomes desalineats a la placa metafàsica o una mala estructuració del fus podria ser detectat com una descompensació de les forces de tensió que exerceixen els microtúbuls sobre els cromosomes, inhibint el pas de metafase I a anafase I (Eaker et al. 2001).

L'activació d'aquests punts de control sovint implica una menor producció de gàmetes i per tant una reducció de la capacitat reproductiva de l'individu.

1.2.2- PRODUCCIÓ DE GÀMETES DESEQUILIBRATS

L'altre aspecte condicionant de fertilitat dels individus portadors de variants cromosòmiques està relacionat amb la producció d'espermatozoides amb desequilibris cromosòmics. Aquests poden tenir dos orígens diferents:

► Segregació dels cromosomes implicats en la reorganització

Les geometries d'aparellament que adopten els cromosomes reorganitzats per tal d'assolir la homosinapsi sovint permeten que les cèl·lules superin els punts de control descrits a l'apartat 1.2.1. Aquest fet també provoca que els cromosomes

implicats quedin vinculats per processos de recombinació i segregació conjunts. Tal com es desenvolupa més endavant (apartat 1.3), la segregació d'aquestes estructures pot donar-se segons diferents modes, alguns de les quals donaran lloc a gàmetes portadors de desequilibris cromosòmics.

► **Associacions sinàptiques “il·lícites”**

A profase I, les regions asinàptiques resultants de la presència d'anomalies cromosòmiques (apartat 1.2.1), poden aparellar heteròlogament amb altres regions del genoma. Això permet a la cèl·lula defugir la intervenció del punt de control paquitènic, però també condiona la correcta segregació dels cromosomes que hagin entrat en contacte, fet que pot generar la presència d'anomalies cromosòmiques numèriques en els espermatozoides resultants.

Aquest fenomen es va descriure amb el nom d'efecte intercromosòmic i les seves característiques són tractades amb més detall a l'apartat 1.4.

1.3- COMPORTAMENT MEIÒTIC DE LES VARIANTS CROMOSÒMIQUES ESTRUCTURALS

1.3.1- TRANSLOCACIONS ROBERTSONIANES

L'aparellament a profase I dels tres cromosomes implicats en la reorganització (el cromosoma derivatiu i els dos homòlegs respectius) es dóna formant una estructura en forma de *trivalent* (**Figura 1.8**).

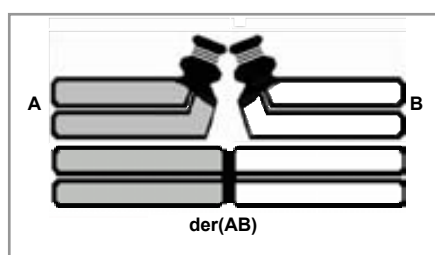
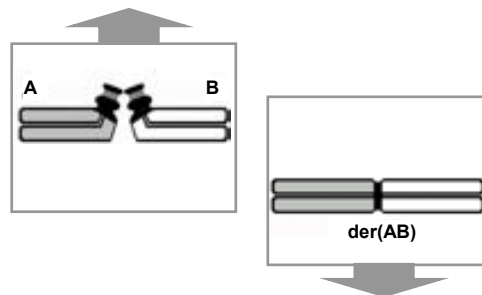


Figura 1.8 - Esquema de l'aparellament dels cromosomes implicats en una translocació Robertsoniana formant un trivalent.

De la mateixa manera que la resta de bivalents, durant l'anafase de la primera divisió meiótica, els tres cromosomes que configuren el trivalent s'han de separar en dos grups. Aquest repartiment pot donar-se de 3 maneres:

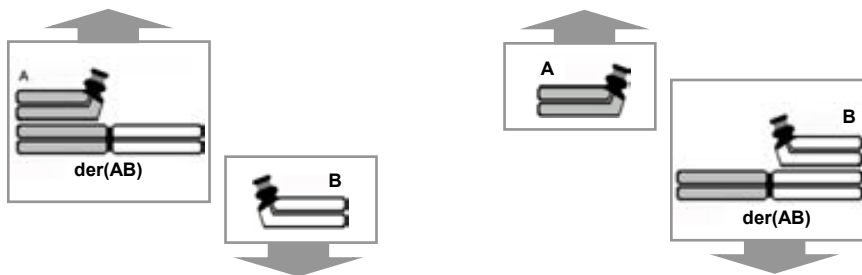
- Segregació alternant

Els dos cromosomes no translocats segreguen conjuntament mentre que el derivatiu va cap al pol oposat.



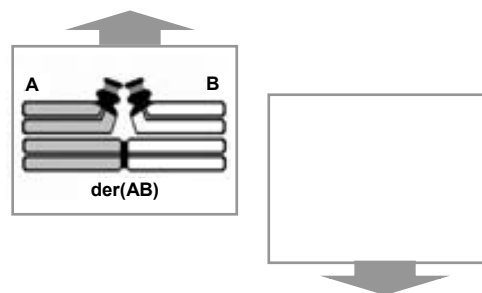
- Segregació adjacent

El cromosoma derivatiu i un dels no translocats segreguen cap al mateix pol i l'altre no translocat va al pol oposat.



- Segregació 3:0

Els tres cromosomes segreguen junts cap al mateix pol.



Només en la segregació alternant el resultat serà normal o equilibrat. En els dos darrers tipus de repartiment, les cèl·lules resultants seran portadores de disomies/nul·lisomies. La proporció amb que es donin cadascuna d'aquestes segregacions determinarà el risc reproductiu de l'individu portador.

En el **Treball 1** adjuntat al capítol de publicacions s'analitza més detalladament el comportament d'aquest tipus de reorganització, concretament en individus portadors de la translocació $der(13;14)(q10;q10)$.

1.3.2- TRANSLOCACIONS RECÍPROQUES

Durant l'etapa de Profase I, els quatre cromosomes implicats en aquesta reorganització poden aparellar mitjançant la formació d'una estructura coneguda com a *creu de translocació* o *tetravalent*, que permet el reconeixement de les diverses regions homòlogues (**Figura 1.9**).

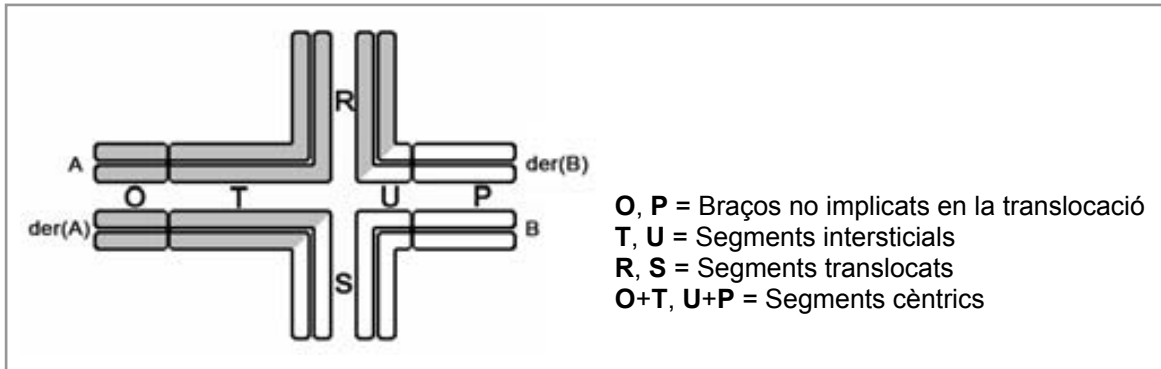
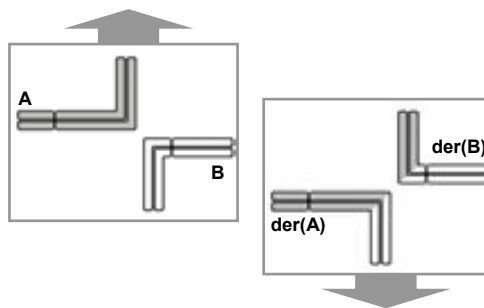


Figura 1.9- Esquema d'una creu de translocació amb les diverses regions d'aparellament.

En funció de la distribució dels cromosomes en les cèl·lules resultants podem distingir 5 modes teòrics de segregació a la primera divisió meiótica:

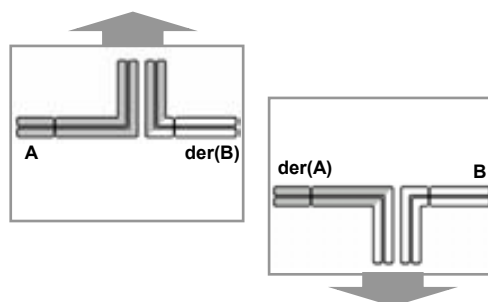
- Segregació alternant

Els dos cromosomes normals segreguen cap a un mateix pol mentre que els dos derivatius ho fan cap a l'oposat.



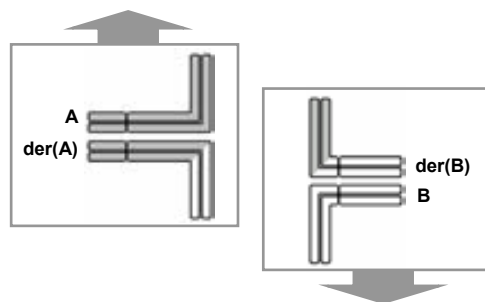
- Segregació adjacent I

Cada cromosoma normal segrega amb el derivatiu de l'altra parella cap a un mateix pol.



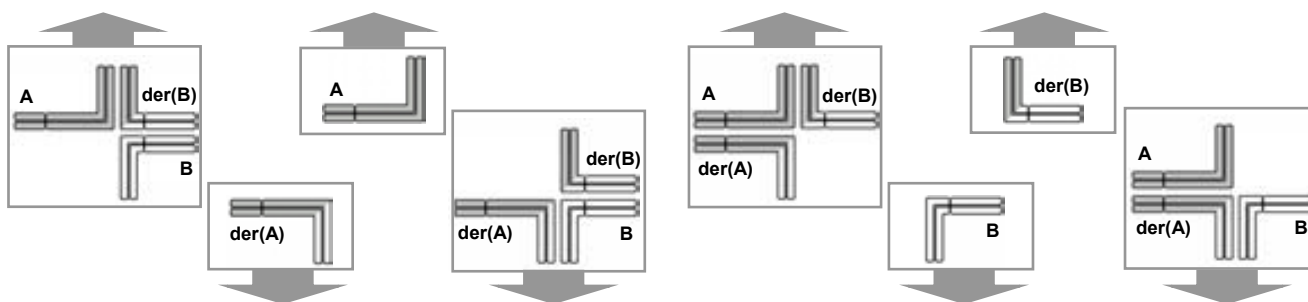
- Segregació adjacent II

Cada cromosoma normal segrega conjuntament amb el seu derivatiu.



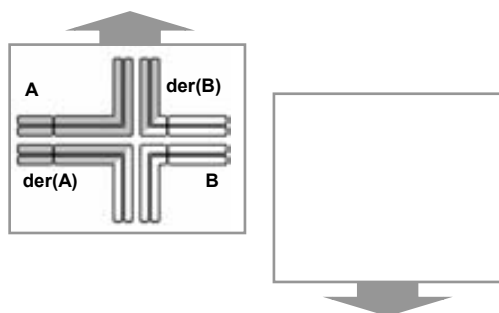
- Segregació 3:1

Tres dels quatre cromosomes segregen cap a una banda mentre que l'univalent restant va cap al pol oposat.



- Segregació 4:0

Tots els cromosomes segregen conjuntament cap a la mateixa cèl·lula filla.



Només a partir de la segregació alternant s'obtenen gàmetes amb una dotació normal/equilibrada. En els altres tipus de segregació, els espermatozoides resultants sempre són portadors de desequilibris (delecions/duplicacions).

Aquesta relació entre el mode de segregació i el tipus de dotació final dels gàmetes es compleix sempre que no es produeixin quiasmes als segments intersticials. La presència d'almenys un quiasma intersticial provoca que també es puguin generar

dotacions desequilibrades a partir de la segregació alternant (50%) a la vegada que es poden obtenir productes equilibrats a partir de la segregació adjacent I (50%) (Figura 1.10).

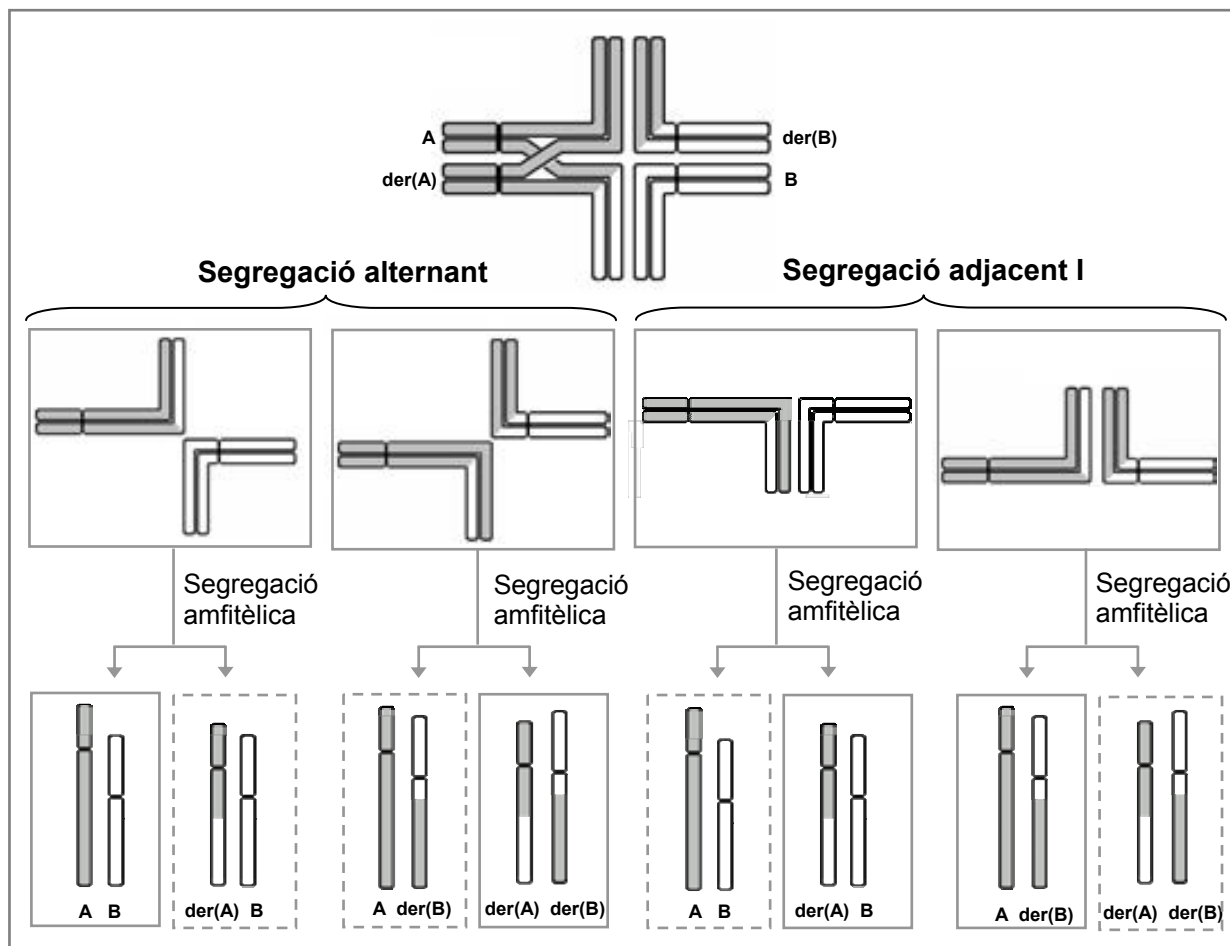


Figura 1.10- Resultat de les segregacions alternant i adjacent I en un tetravalent amb un quiasma intersticial al segment T. Els productes amb línies discontinues derivats d'una segregació alternant tenen un contingut adjacent I, mentre que els derivats d'una segregació adjacent I tenen un contingut alternant.

En conseqüència, l'associació directa dels gàmetes amb contingut normal/equilibrat a una segregació alternant no és del tot correcta (Armstrong i Hulten 1998). Tot i això, aquest matís es continua obviant en la majoria d'estudis de segregació ja que, els productes resultants de la segregació alternant amb contingut equivalent a adjacent I, compensen en gran mesura els productes resultants d'una segregació adjacent I amb contingut alternant. Cal tenir en compte que, donat que el mode de segregació alternant és el que es veu més afavorit (Sybenga 1975), aquesta simplificació provoca una lleugera sobreestimació del mode de segregació adjacent I (en detriment del mode alternant).

En el cas de la segregació adjacent II, la presència de quiasmes intersticials també altera el contingut cromosòmic dels productes finals (**Figura 1.11**).

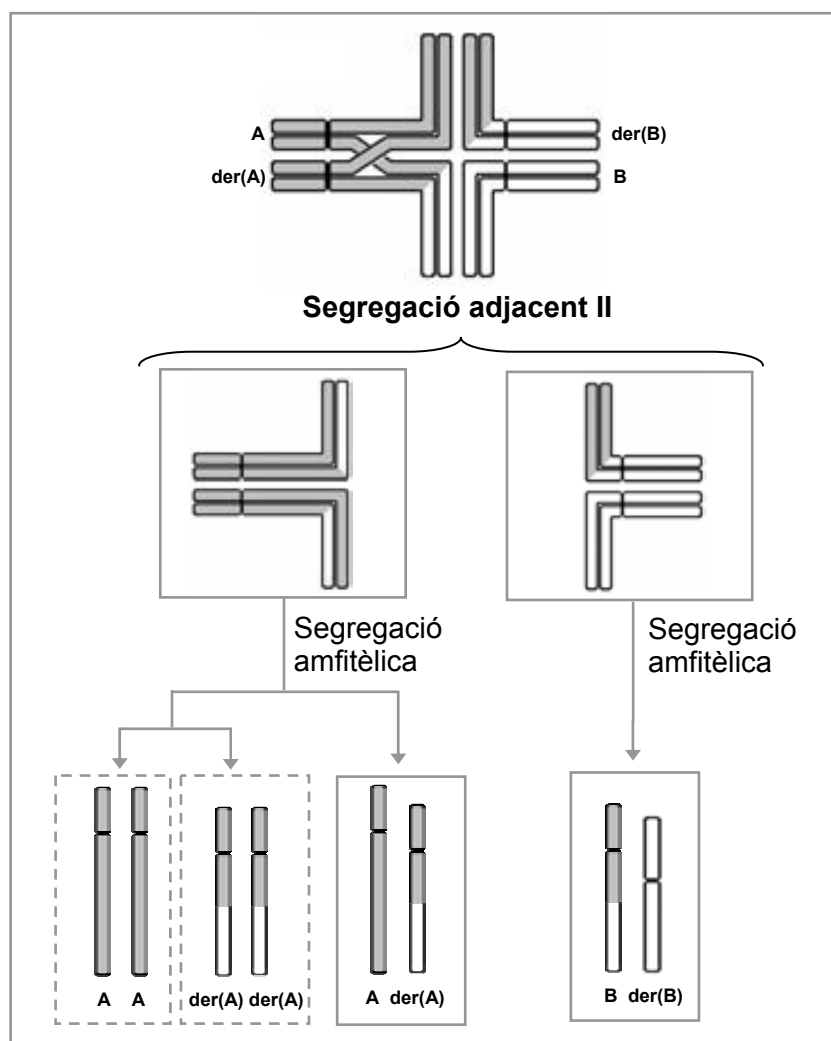


Figura 1.11- Productes resultants de les segregació adjacent II en un tetravalent amb un quiasma intersticial al segment T. Les combinacions amb línies discontinues (en conjunt un 25% del total dels productes) serien equivalents a una no-disjunció a la segona divisió meiótica tot i originar-se amfítèlicament.

En aquesta situació es veuen afectats el 50% dels productes resultants de la segregació adjacent II, que continuen essent desequilibrats però amb una dotació cromosòmica diferent de l'esperada.

En el capítol de publicacions s'adjunten dos treballs que analitzen més detalladament el comportament d'aquest tipus de reorganitzacions (**Treball 2 i Treball 3**).

1.3.3- INVERSIONS

Durant la profase I de la meiosi, el cromosoma portador de la inversió i el seu homòleg poden assolir un aparellament homosinàptic complet mitjançant la formació d'una estructura que es coneix amb el nom de *nansa d'inversió* (**Figura 1.12**).

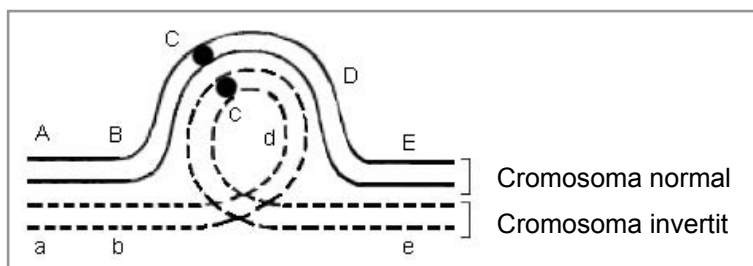


Figura 1.12- Esquema de l'aparellament d'un cromosoma portador d'una inversió (segments a, b, d, c i e) amb el seu homòleg (segments A, B, C, D i E) formant una nansa d'inversió.

També s'ha descrit que aquests cromosomes poden adoptar altres configuracions en les que queden regions asinàptiques, fet que s'ha relacionat amb les dimensions del segment invertit (Kaiser 1984) (**Figura 1.13**).

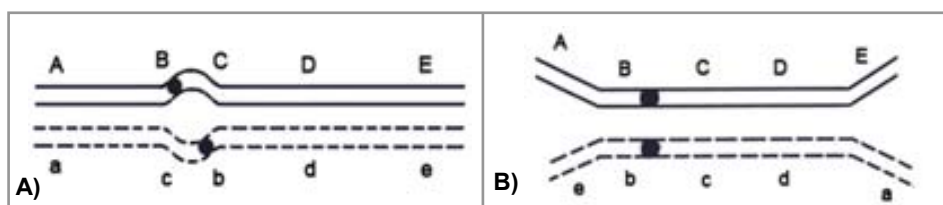


Figura 1.13- Altres configuracions d'aparellament de les inversions: A) Inversió petita (segment c, b) amb asinapsi en el segment invertit; B) Inversió gran (segment b, c, d) amb asinapsi en els segments no invertits.

La producció de gàmetes amb desequilibris cromosòmics en portadors d'inversions és conseqüència de que hi hagi recombinació dins de la regió invertida. En funció del nombre de quiasmes i de les cromàtides implicades, els cromosomes resultants poden presentar duplicacions i deficiències anomenant-se cromosomes *recombinants*, i les anomalies generades aneusomies de recombinació (ISCN 2005).

A la **Figura 1.14** es mostren els diversos productes que es poden generar en un portador d'una inversió pericèntrica com a resultat de la ocurrència d'un o dos quiasmes dins la regió invertida. Quan s'hi dóna tan sols un quiasma, el 50% dels

productes resultants són normals/equilibrats. En canvi quan hi tenen lloc dos o més quiasmes, la proporció d'aneusomies de recombinació depèn de quines cromàtides s'hi vegin implicades.

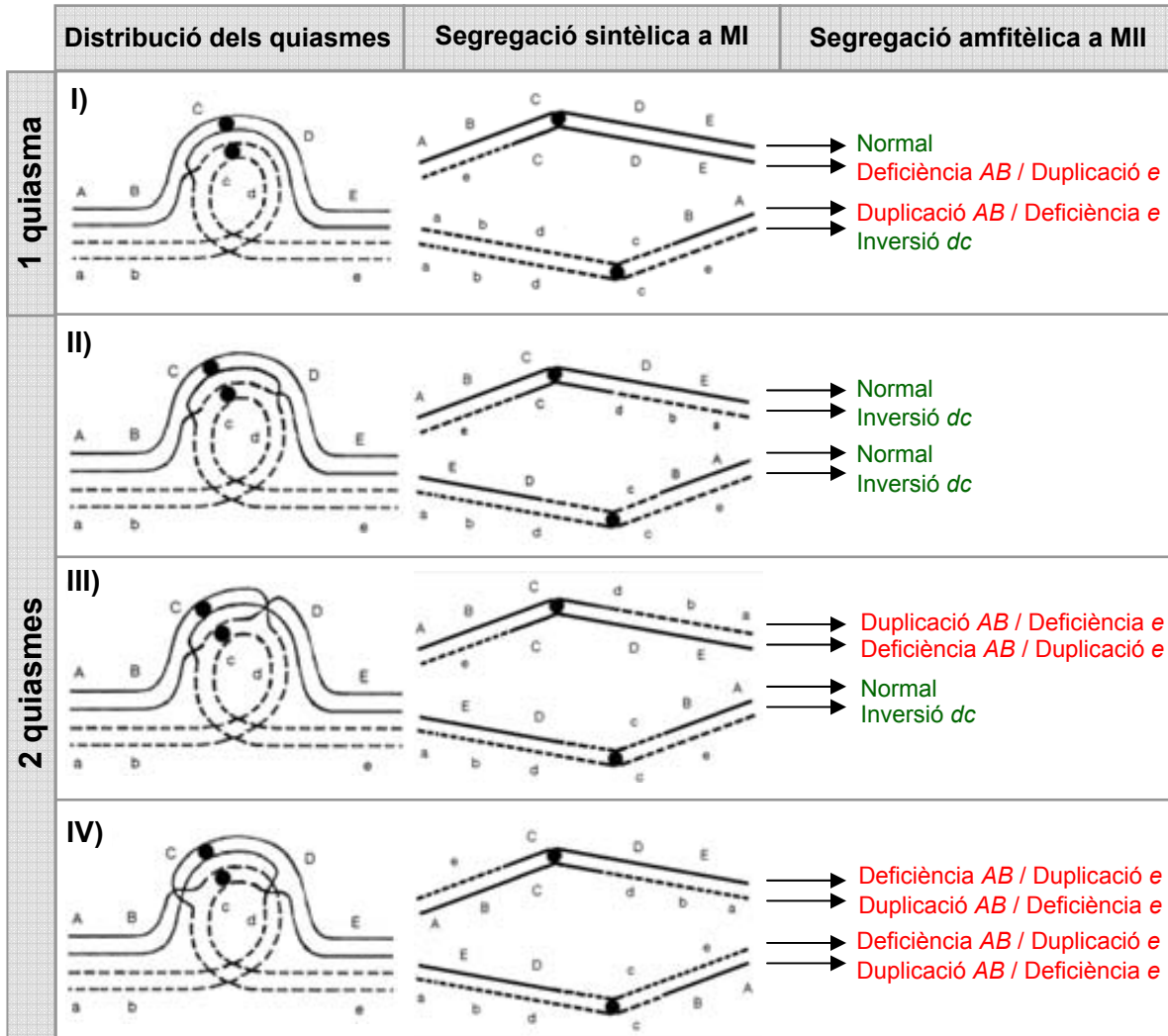


Figura 1.14- Productes resultants de la ocurrència d'un quiasma dins d'una inversió pericèntrica (I), o bé de dos quiasmes que afectin les mateixes cromàtides (II), tres cromàtides diferents (III) o les quatre cromàtides (IV).

En inversions paracèntriques, la ocurrència de quiasmes dins de la regió invertida té efectes similars (**Figura 1.15**), però en aquest cas les cromàtides amb duplicacions/deficiències són a la vegada acèntriques o dicèntriques. Per altra banda en aquest tipus d'inversions, la combinació de quiasmes dins i fora de la regió invertida pot donar lloc a la formació de cromàtides en forma de bucle o llaç (Lacadena 1996) (**Figura 1.15-V**).

	Distribució dels quiasmes	Segregació sintètica a MI	Productes resultants a MII
1 quiasma	I)		<ul style="list-style-type: none"> Dupl. AB / Def. e (dicèntric) Inversió dc Def. AB / Dupl. E (acèntric) Normal
	II)		<ul style="list-style-type: none"> Normal Normal Inversió dc Inversió dc
2 quiasmes	III)		<ul style="list-style-type: none"> Dupl. AB / Def. e (dicèntric) Inversió dc Def. AB / Dupl. E (acèntric) Normal
	IV)		<ul style="list-style-type: none"> Dupl. AB / Def. e (dicèntric) Dupl. AB / Def. e (dicèntric) Def. AB / Dupl. E (acèntric) Def. AB / Dupl. E (acèntric)
	V)		<ul style="list-style-type: none"> Normal Inversió dc Dupl. AB / Def. e (llaç) Def AB / Dupl. E (acèntric)

Figura 1.15- Productes resultants de la ocurrència d'un (I) o dos quiasmes (II, III, IV) dins d'una inversió paracèntrica. La combinació d'un quiasma al segment invertit i un altre a la regió cèntrica externa també dóna lloc a cromàtides recombinants (V).

Tant en inversions pericèntriques com paracèntriques, com més gran sigui el segment invertit, més fàcilment podrà aparellar per homosinapsi i més probabilitat hi haurà de que s'hi doni almenys un quiasma. Per tant, la mida d'aquestes reorganitzacions influeix en la producció de gàmetes amb desequilibris cromosòmics.

El comportament d'aquestes reorganitzacions es tracta més detalladament en tres treballs adjuntats al capítol de publicacions (**Treball 4, Treball 5 i Treball 6**).

1.4- L'EFECTE INTERCROMOSÒMIC

Entenem per efecte intercromosòmic un fenomen d'interferència generat per part de les reorganitzacions cromosòmiques estructurals en la correcta disjunció i segregació d'altres cromosomes no involucrats en la pròpia reorganització. L'existència d'aquest fenomen en humans va ser postulada per primera vegada per Lejeune l'any 1963 quan va detectar un increment de portadors de translocacions recíproques entre pares de nens afectats per la síndrome de Down (Lejeune 1963). Aquest destorb entre cromosomes s'atribueix a la formació d'aparellaments heterosinàptics entre cromosomes reorganitzats -que sovint adopten configuracions amb regions asinàptiques- amb altres cromosomes (Guichaoua et al. 1990; Cheng et al. 1999; Oliver-Bonet et al. 2005). Entre les regions del genoma que s'hi poden veure involucrades hi trobem aquelles amb propensió a aparellar per heterosinapsi (e.g. braços curts dels cromosomes acrocèntrics, el bivalent XY) i regions amb tendència a aparellar amb retard o a presentar discontinuïtats sinàptiques anòmales (Codina-Pascual et al. 2006b).

Nombrosos estudis han associat les interaccions intercromosòmiques amb el desencadenament de bloquejos meiòtics (Gabriel-Robez et al. 1986; Johannisson et al. 1987). Aquests, sovint es veuen reflectits en l'alteració dels paràmetres seminals dels individus, característica bastant comú en els individus portadors de reorganitzacions estructurals (De Braekeleer i Dao 1991). Tot i això, també s'ha descrit que l'heterosinapsi podria ser una via alternativa d'actuació cel·lular que actua de mecanisme de rescat d'una aturada meiòtica causada per l'existència de regions asinàptiques (Saadallah and Hulten 1986; Chandley et al. 1986; Navarro et al. 1991).

Sigui com sigui, l'existència dels fenòmens d'interacció intercromosòmica es podria veure traduïda en un increment significatiu d'anomalies cromosòmiques numèriques en les cèl·lules resultants. Això representaria una font addicional d'anomalies cromosòmiques pels portadors de reorganitzacions estructurals, que s'afegirien a les derivades dels modes de segregació desequilibrats.

Nombrosos treballs han avaluat els efectes d'aquest fenomen en espermatozoides de diversos tipus de portadors de reorganitzacions estructurals (veure **Annex II**). Els resultats han mostrat dades contradictòries ja que en alguns casos s'han observat increments significatius d'anomalies numèriques per molts dels cromosomes analitzats (Rousseaux et al. 1995a; Rousseaux et al. 1995b; Van

Hummelen et al. 1997; Blanco et al. 1998a; Mercier et al. 1998; Blanco et al. 2000; Amiel et al. 2001; Morel et al. 2001b; Oliver-Bonet et al. 2001; Baccetti et al. 2002; Oliver-Bonet et al. 2002; Anton et al. 2004a; Anton et al. 2004b; Morel et al. 2004b; Baccetti et al. 2005; Douet-Guilbert et al. 2005; Machev et al. 2005b; Anton et al. 2006; Chen et al. 2007; Wiland et al. 2007; Vozdova et al. 2008; Anton et al. Acceptat) mentre que en d'altres no s'ha observat cap tipus de variació respecte la població control (Martini et al. 1998; Cifuentes et al. 1999a; Honda et al. 1999; Estop et al. 2000; Rives et al. 2003a; Mikhaail-Philips et al. 2004; Oliver-Bonet et al. 2004; Mikhaail-Philips et al. 2005; Hatakeyama et al. 2006; Kekesi et al. 2007; Vialard et al. 2007).

El ventall de cromosomes pels quals es valoren les taxes d'aneuploidies és molt variable. En la majoria d'estudis, els cromosomes sexuals formen part dels cromosomes estudiats degut a la singularitat de les seves característiques d'aparellament, que els fan més susceptibles de veure's implicats en aparellaments heterosinàptics. Pel que fa als autosomes, en total s'han obtingut dades referents als cromosomes 1, 4, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21 i 22 (**Annex II**).

En els treballs adjuntats en el capítol de publicacions s'aprofundeix en l'ocurrència d'aquest fenomen tant en portadors de translocacions Robertsonianes (**Treball 1**), com en portadors de translocacions recíproques (**Treball 2** i **Treball 3**) i en portadors d'inversions (**Treball 4**, **Treball 5** i **Treball 6**).

1.5- ESTUDIS CITOGÈNÈTICS EN ESPERMATOZOIDES I CONSELL REPRODUCTIU EN PORTADORS DE REORGANITZACIONS CROMOSÒMIQUES

La presència de variants cromosòmiques estructurals està relacionada amb l'alteració dels processos meiótics dels portadors (apartat 1.2.1) i també amb la producció de gàmetes desequilibrats (apartat 1.2.2). Això fa que aquests individus constitueixin una població amb fertilitat reduïda que sovint recorre a assessorament genètic especialitzat i a l'ús de tècniques de reproducció assistida.

Entre els recursos que s'ofereixen a aquestes parelles, hi trobem els estudis citogenètics en espermatozoides en els que s'utilitza la tècnica d'hibridació in situ fluorescent (FISH). Aquests permet valorar la presència d'anomalies cromosòmiques tant numèriques com estructurals en els espermatozoides del portador (**Requadre 1.1**).

Requadre 1.1- Els estudis citogenètics en espermatozoides.

S'han descrit diversos mètodes que permeten determinar el contingut cromosòmic dels espermatozoides. Els primers estudis que van permetre observar cromosomes metafàsics d'espermatozoide (Rudak et al. 1978) es van realitzar mitjançant una tècnica que consistia en fusionar *in vitro* espermatozoides humans amb oòcits de hámster sense zona pel·lúcida (Yanagimachi et al. 1976). Més endavant va aparèixer la tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) sobre nuclis descondensats d'espermatozoide (Pieters et al. 1990; Wyrobek et al. 1990) que va permetre l'anàlisi d'un nombre molt més elevat d'espermatozoides en una quantitat de temps inferior. Aquest fet, juntament amb el desenvolupament d'un nombre cada cop més elevat de sondes amb les que es podien identificar diverses regions (centromèriques, telomèriques i específiques de *locus*) repartides per tots els cromosomes i amb l'opció d'estar marcades amb fluorocroms diferents va fer que la tècnica de FISH es consolidés com el mètode d'anàlisi més habitual en aquest tipus d'estudi.

Aquestes tècniques han permès valorar els resultats de segregació en més de 230 portadors de reorganitzacions cromosòmiques (Annex I) i la incidència d'aneuploïdies relacionades amb ICE en 100 casos (Annex II).

1.5.1- ESTUDIS DE SEGREGACIÓ

Els estudis de segregació mitjançant FISH en espermatozoides en portadors de variants estructurals estan dirigits a estimar la producció de gàmetes desequilibrats pels cromosomes implicats en cada reorganització, establint així el risc de transmetre aquests desequilibris.

Tot i això, a diferència del que passa amb altres tècniques com el diagnòstic genètic pre-implantacional o pre-natal en les que les indicacions i els supòsits d'aplicació es troben recollits en recomanacions elaborades per societats científiques (Thornhill et al. 2005; Hastings et al. 2007), la utilització de la tècnica de FISH en espermatozoides en el context del consell genètic reproductiu és un recurs sobre el que no hi ha directrius clares. Així doncs, la seva aplicació queda relegada al criteri particular de cada centre.

La manca de directrius contrastada amb tota la informació recollida en els nostres treballs, ens va fer plantejar la opció de revisar quin seria el criteri més adequat per indicar aquests estudis en portadors de variants estructurals.

Les consideracions obtingudes es recullen en un article d'opinió (**Treball 7**) que tanca tota la sèrie de treballs adjuntats al capítol de publicacions.

1.5.2- ESTUDIS D'ICE

En el consell genètic reproductiu, la informació que es pot obtenir d'aquests estudis va dirigida a acotar el risc de transmissió d'aneuploïdies derivades d'ICE a l'embrió. Però les dades publicades que relacionen la incidència d'aneuploïdies en espermatozoides i en embrions no han estat exemptes de controvèrsia: mentre alguns autors suggereixen que els embrions resultants dels cicles de reproducció assistida on hi participen individus portadors de reorganitzacions estructurals presenten una taxa d'aneuploïdies significativament més elevada que la resta (Gianaroli et al. 2002), altres consideren que aquest efecte és negligible comparat amb les anomalies derivades de la segregació de la pròpia reorganització (Munné et al. 2005).

En el **Treball 7** es tracta la idoneïtat de realitzar estudis d'ICE en el context del consell genètic reproductiu dels individus portadors de translocacions Robertsonianes, translocacions recíproques i inversions.



2- Objectius

Els objectius plantejats a l'iniciar aquest treball de recerca van ser els següents:

1er

Caracteritzar els patrons de segregació de les translocacions Robertsonianes, les translocacions recíproques i les inversions.

2on

Identificar els factors cromosòmics que influeixen en la segregació d'aquestes reorganitzacions.

3r

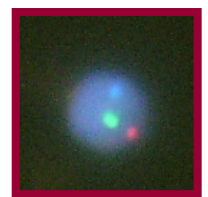
Avaluar la participació d'un efecte intercromosòmic en la producció de gàmetes amb anomalies cromosòmiques numèriques.

4rt

Establir el risc reproductiu dels individus portadors a partir de la producció estimada de gàmetes normals/equilibrats.

5è

Determinar l'adequació dels estudis de segregació i de ICE mitjançant FISH en espermatozoides en el context del consell genètic reproductiu dels portadors de reorganitzacions estructurals.



3- Material i mètodes

3.1- MOSTRES ANALITZADES

Durant la realització d'aquesta tesi es van estudiar mostres de semen de 29 individus portadors de reorganitzacions cromosòmiques. Entre ells hi havia deu portadors de translocacions Robertsonianes (**Taula 3.1**), catorze portadors de translocacions recíproques (**Taula 3.2**) i cinc portadors d'inversions pericèntriques un dels quals també era portador d'una inversió paracèntrica (**Taula 3.3**). Les translocacions recíproques avaluades van ser seleccionades per presentar característiques citogenètiques molt diferents.

Les mostres van ser recollides en col·laboració amb 11 centres de reproducció assistida i/o diagnòstic genètic (**Taules 3.1, 3.2 i 3.3**).

Taula 3.1- Individus portadors de translocacions Robertsonianes.

	Seminograma	Edat	Centre de procedència
45,XY,der(13;14)(q10;q10)	OAT	33	Institut de Reproducció CEFER
45,XY,der(13;14)(q10;q10)	OA	37	Hospital Clínic de Barcelona
45,XY,der(13;14)(q10;q10)	OA	35	Hospital Clínic de Barcelona
45,XY,der(13;14)(q10;q10)	OAT	33	Clínica Tambre
45,XY,der(13;14)(q10;q10)	OAT	30	IVI
45,XY,der(13;14)(q10;q10)	OAT	32	IVI
45,XY,der(13;14)(q10;q10)	OA	33	Institut Universitari Dexeus
45,XY,der(13;22)(q10;q10)	OA	28	IVI
45,XY,der(14;21)(q10;q10)	OA	43	Hospital Clínic de Barcelona
45,XY,der(14;21)(q10;q10)	OA	41	Fundació Puigvert

Taula 3.2- Individus portadors de translocacions recíproques.

	Seminograma	Edat	Centre de procedència
46,XY,t(1;11)(q12;q13)	OAT	37	Clínica Tambre
46,XY,t(2;6)(q37;p21)	-	37	Hospital Clínic de Barcelona
46,XY,t(4;7)(q31.1;q32)	N	40	Hospital Clínic de Barcelona
46,XY,t(5;8)(q33;q13)	N	42	IBQ Flor de maig
46,XY,t(5;8)(q35.1;p11.2)	A	54	Institut Universitari Dexeus
46,XY,t(5;17)(q31.2;p13)	N	34	IVI
46,XY,t(6;22)(q13.2;q13.1)	-	34	Hospital Universitari Vall d'Hebron
46,XY,t(8;14)(q22;q32)	-	39	Institut Universitari Dexeus
46,XY,t(9;19)(q10;p10)	-	34	Prenatal Genetics SL
46,XY,t(9;20)(p24;q13.1)	OA	22	Hospital Clínic de Barcelona
46,XY,t(10;13)(p13;p13)	OA	36	IVI
46,XY,t(10;14)(q24;p11.2)	OA	40	Hospital Clínic de Barcelona
46,XY,t(11;22)(q23;q11)	N	35	Hospital Clínic de Barcelona
46,XY,t(11;22)(q23;q11)	N	34	Hospital Clínic de Barcelona

Taula 3.3- Individus portadors d'inversions.

	Seminograma	Edat	Centres de procedència
46,XY,inv(2)(p11.2q13)	OA	38	Hospital Clínic de Barcelona
46,XY,inv(4)(p16q21)	OA	36	IVI
46,XY,inv(4)(p14p15.3), inv(Y)(p11.1q11.23)	OA	29	Institut Marquès
46,XY,inv(6)(p23q25)	N	37	Institut Universitari Dexeus
46,XY,inv(10)(p13q22.3)	N	55	Institut Universitari Dexeus

3.2- FIXACIÓ I EMMAGATZEMATGE DE LES MOSTRES

Les mostres van ser obtingudes per masturbació, després d'un període mínim de tres dies d'abstinència, i recollides en contenidors estèrils de polietilè. La seva fixació es va dur a terme segons el protocol següent:

- Centrifugar la mostra durant 5 minuts a 1000G per tal de separar el plasma seminal de la fracció cel·lular (temperatura=20°C).
- Eliminar del sobrenedant (plasma seminal) amb una pipeta Pasteur.
- Afegir solució hipotònica (KCl 0.075M) temperada a 37°C, gota a gota i en agitació.
- Incubar la suspensió cel·lular a 37°C durant 30 minuts.
- Repetir la centrifugació (temps=5 minuts; velocitat=1000G; temperatura=20°C).
- Eliminar el sobrenedant per decantació.
- Resuspendre el sediment cel·lular amb fixador de Carnoy (metanol:àcid acètic en una proporció 3:1) gota a gota i en agitació.
- Repetir la centrifugació (temps=5 minuts; velocitat=1000G; temperatura=20°C).
- Eliminar el sobrenedant per decantació.
- Repetir els rentats amb Carnoy tantes vegades com sigui necessari fins que el sediment cel·lular sigui totalment blanc.
- Realitzar un últim rentat de fixador amb Carnoy preparat de nou.
- Fer les extensions cel·lulars deixant caure una gota de la suspensió en portaobjectes desengreixats.
- Verificar la dispersió cel·lular del material fixat mitjançant la observació de les extensions al microscopi de contrast de fases (**Figura 3.1**).

Un cop realitzades, les extensions van ser emmagatzemades a -20°C. La resta de material fixat també es va guardar en aquestes condicions.



Figura 3.1 - Espermatozoides al microscopi de contrast de fases (3000X) un cop finalitzat el procés de fixació.

3.3- PROTOCOL DE FISH EN ESPERMATOZOIDES

Aquest protocol el podem desglossar en 5 apartats que s'apliquen de forma seqüencial:

3.3.1- DESCONDENSACIÓ DE LA CROMATINA DEL NUCLI DELS ESPERMATOZOIDES

La cromatina del nucli dels espermatozoides està empaquetada per protamines que li confereixen un elevat grau de condensació. Aquest ha de ser reduït de forma prèvia a la FISH mitjançant un tractament amb 1,4-Ditiotreitol (DTT) que trenca els ponts disulfur d'aquestes proteïnes. Consisteix en:

- Descongelar les extensions a temperatura ambient.
- Rentar els portaobjectes dues vegades en dues solucions de 2xSSC (Citrat Sòdic Salí), durant 3 minuts cada una, a temperatura ambient (pH 7-7.5).
- Deshidratar la mostra mitjançant immersions successives en una sèrie de solucions amb concentracions creixents d'etanol en aigua destilada (70%-90%-100%), durant 2 minuts cada una i a temperatura ambient.
- Deixar assecar completament les preparacions.
- Incubar les preparacions a 37°C en la solució de descondensació (pH=7.4): 5mM DTT, 1% Triton X-100 i 50mM Tris (2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol).

El temps d'incubació de les mostres en la solució de descondensació depèn de la susceptibilitat de cada mostra a aquest tractament. En els estudis realitzats la durada d'aquest tractament va oscil·lar entre 1-12 minuts tot i que en la majoria de casos va estar al voltant dels 8 minuts. Aquest temps també s'ha d'ajustar en funció de les característiques de les sondes que s'utilitzin (les sondes que hibriden amb regions més petites requereixen una grau de descondensació més elevat que les que reconeixen regions més grans).

- Repetir els rentats amb 2xSSC i la sèrie de deshidratacions en etanol (70%-90%-100%) a temperatura ambient.
- Deixar assecar completament les preparacions.
- Comprovar l'efecte del tractament de descondensació al microscopi de contrast de fases (**Figura 3.2**)



Figura 3.2 – Espermatozoides al microscopi de contrast de fases (3000X) després del protocol de descondensació. S'observa un halo al voltant del cap de l'espermatozoide que confirma l'acció del DTT.

3.3.2- DENATURALITZACIÓ DEL DNA ESPERMÀTIC

Per tal de fer accessible el DNA dels espermatozoides a les sondes, aquest ha de ser desnaturalitzat amb un tractament que combina l'efecte de la temperatura amb l'acció de la formamida:

- Incubar els portaobjectes durant 5 minuts a 73°C en una solució de desnaturalització formada per 70% formamida i 10% 20xSSC (pH=7-7.5).
- Deshidratar la mostra mitjançant immersions successives d'un minut en una sèrie d'etanols amb concentracions creixents (70%-85%-100%) a temperatura ambient.
- Deixar assecar completament les preparacions.
- Comprovar l'efecte del tractament de desnaturalització al microscopi de contrast de fases (**Figura 3.3**).



Figura 3.3 – Espermatozoides al microscopi de contrast de fase (3000X) després del protocol de desnaturalització. Un cop desnaturalitzat el DNA, el cap dels espermatozoides presenta un aspecte fosc.

3.3.3- PREPARACIÓ DE LES SONDES

En els diversos estudis realitzats es van fer servir sondes comercials de Vysis Inc. (Downers Grove, IL, USA) i Qbiogene Inc. (Irvine, CA, USA). Totes les sondes utilitzades i les combinacions amb que van ser aplicades estan recollides a l'**Annex III**.

► Característiques de les sondes

L'aplicabilitat d'una sonda ve determinada per 2 paràmetres: la regió on hibrida i el tipus de fluorocrom amb el que està conjugada. És tan important trobar una sonda que identifiqui la regió que ens interessa com que aquesta estigui marcada amb un fluorocrom que la diferenciï de les altres sondes utilitzades.

En funció de la regió cromosòmica que reconeix, podem diferenciar tres tipus de sondes:

- Sondes centromèriques

Hibriden amb seqüències de DNA α -satèl·lit específiques de cada centròmer. Donat que abasten regions àmplies (aproximadament 2-5 Mb), els senyals que emeten són fàcils de identificar.

- Sondes específiques de *locus*

Hibriden amb *loci* cromosòmics d'entre 200-800 kb.

- Sondes subtelomèriques

Hibriden amb regions de DNA que es troben just per sota dels telòmers. Reconeixen regions més petites (<200 kb) i per tant el senyal resultant és molt puntual.

Pel que fa al color dels fluorocroms, en general el verd (SpectrumGreen/FITC) i el vermell (SpectrumOrange/Rodamina) són els més comuns, mentre que el blau (SpectrumAqua/DEAC) tan sols es troba disponible per determinades sondes (<http://www.abbottmolecular.com/>; <http://www.qbiogene.com>). En aquest punt és interessant esmentar la possibilitat de barrejar una sonda verda amb la mateixa sonda marcada amb un fluorocrom vermell en proporcions 1:1 per tal d'obtenir un quart color.

► Combinacions de sondes utilitzades en els estudis de segregació

L'objectiu dels estudis de segregació és esbrinar quin ha estat el repartiment dels cromosomes implicats en una determinada reorganització estructural a partir de la observació dels productes resultants. Això requereix utilitzar una combinació de

sondes que ofereixi un patró de colors diferent per a cada un dels cromosomes implicats en la reorganització. D'aquesta manera, a partir del número i color dels senyals d'hibridació visualitzats en el nucli d'un espermatozoide es podrà deduir quin mode de segregació l'ha originat. L'obtenció d'aquesta informació per un nombre elevat d'espermatozoides permet estimar la freqüència amb que ocorre cada un d'aquests modes i per tant establir el patró de segregació.

Translocacions Robertsonianes

Durant la profase I de la meiosi, l'aparellament dels cromosomes implicats en aquest tipus de reorganització dóna lloc a la formació d'un *trivalent* (apartat 1.3.1). Per tal de diferenciar els tres cromosomes implicats en aquesta estructura és suficient amb utilitzar dues sondes amb fluorocroms diferents (per exemple: verd i vermell) i que cadascuna reconegui un dels braços q dels cromosomes translocats. D'aquesta manera tenim un patró de colors diferent per cada cromosoma: un dels dos cromosomes normals vindrà determinat per un senyal de color verd, l'altre per un senyal de color vermell, i el cromosoma derivatiu per un senyal verd i un vermell (**Figura 3.4**). Amb aquesta distribució de sondes, els productes derivats de la segregació del trivalent poden ser identificats pel seu patró de colors i associats a un mode de segregació concret (**Figura 3.4**).

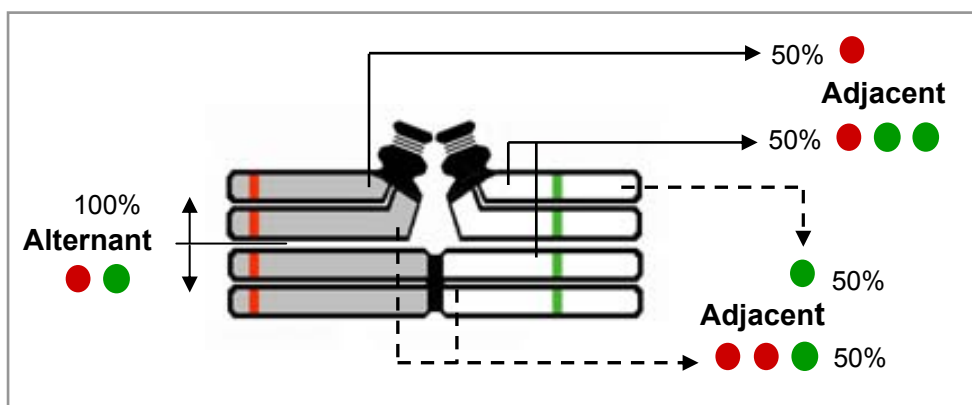


Figura 3.4 - Esquema que mostra una possible distribució de sondes per identificar els productes de segregació de les translocacions Robertsonianes.

Cal tenir present que aquesta tècnica no permet diferenciar els productes amb dotació "normal" (corresponent als dos cromosomes no reorganitzats) dels portadors d'una dotació "equilibrada" (corresponent al cromosoma derivatiu).

Aquest disseny experimental és el que s'ha utilitzat en l'estudi desenvolupat en el **Treball 1** adjuntat en el capítol de publicacions.

Translocacions recíproques

En les translocacions recíproques, l'aparellament a paquet dels cromosomes implicats en la reorganització dóna lloc a la formació d'una *creu de translocació* (apartat 1.3.2). Per tal de poder identificar cada un dels 4 cromosomes implicats en aquesta estructura amb un patró de colors particular, cal combinar un mínim de tres sondes marcades amb fluorocroms diferents (per exemple verd, vermell i blau). Aquestes es poden distribuir de manera que dues d'elles estiguin localitzades sobre els segments cèntrics i la tercera en un dels segments translocats (**Figura 3.5**) o al revés (marcatge dels 2 segments translocats i només un dels segments cèntrics). Així doncs, i segons l'exemple de la figura, un dels dos cromosomes normals seria portador d'un senyal blau mentre que el seu derivatiu portaria a més a més el vermell, i l'altre cromosoma normal seria portador d'un senyal verd i un vermell mentre que el seu derivatiu portaria només el verd.

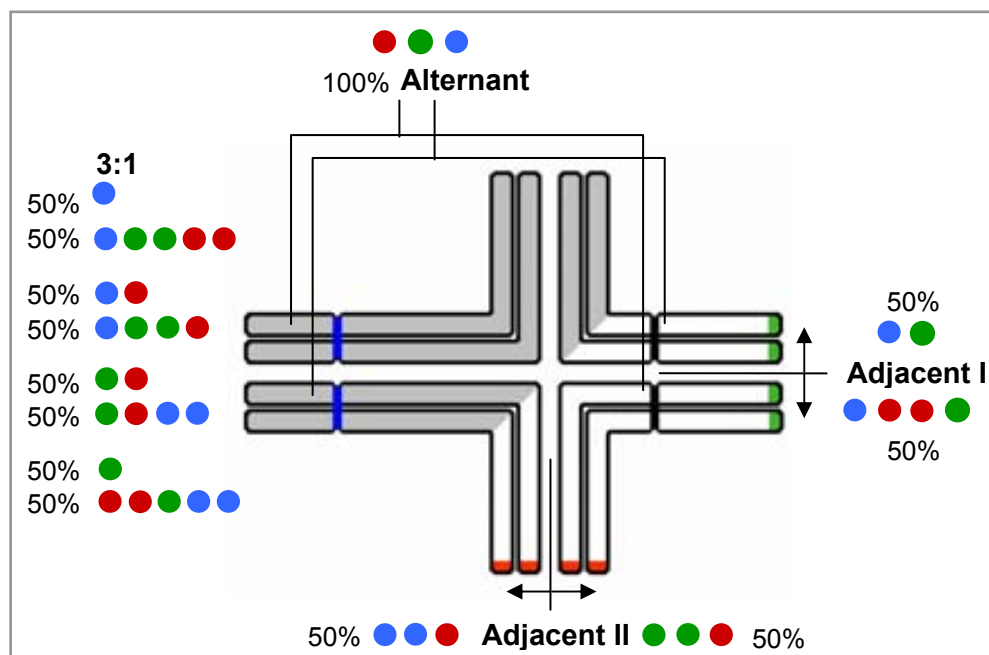


Figura 3.5 - Esquema que mostra una possible distribució de sondes per identificar els productes de segregació de les translocacions recíproques.

Respecte a la segregació alternant, les limitacions de la tècnica tampoc permeten distingir els productes amb una dotació "normal" dels portadors d'una dotació "equilibrada". En canvi, els productes complementaris resultants de les

segregacions adjacent I, adjacent II i 3:1, sí que presenten patrons de segregació diferents.

En el cas de la segregació adjacent II, les combinacions de senyals descrites a la **Figura 3.5** es poden veure alterades quan es donen fenòmens de recombinació a les regions intersticials de la creu. El 50% d'aquests productes presenten una combinació de senyals diferent de les anteriors que permet la seva identificació (**Figura 3.6**).

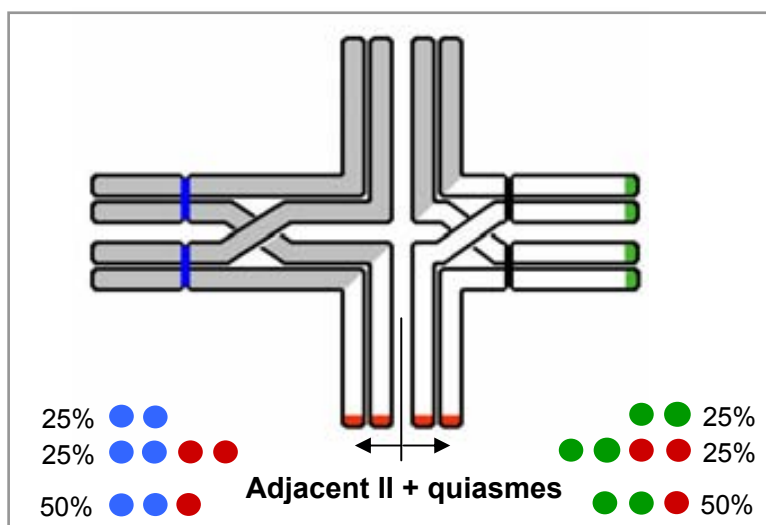


Figura 3.6 - Combinacions de senyals resultants de la segregació adjacent II d'una translocació recíproca amb quiasmes intersticials.

En els **Treballs 2 i 3** adjuntats a l'apartat de publicacions, es recullen estudis de segregació realitzats en portadors de translocacions recíproques basats en aquest disseny experimental.

Inversions

En el cas de les inversions, donat que només hi ha un cromosoma implicat en la reorganització, els estudis de segregació van dirigits al cromosoma reorganitzat i al seu homòleg. L'existència de fenòmens de recombinació dins de la regió invertida dóna lloc a productes portadors de duplicacions i deficiències (apartat 1.3.3). Per tal de poder distingir aquests desequilibris, és necessari identificar de forma distinta les dues regions no invertides, fet que requereix la utilització de com a mínim dues sondes marcades amb fluorocroms diferents.

La opció de marcar el centròmer amb un tercera sonda permet utilitzar aquest senyal com a control d'hibridació en el cas d'inversions pericèntriques. En el cas de

les inversions paracèntriques aquest senyal addicional permet determinar la presència de cromosomes acèntrics i dicèntrics (**Figura 3.7**), per bé que són variants cromosòmiques inestables i per tant, amb tendència a perdre's durant la divisió cel·lular.

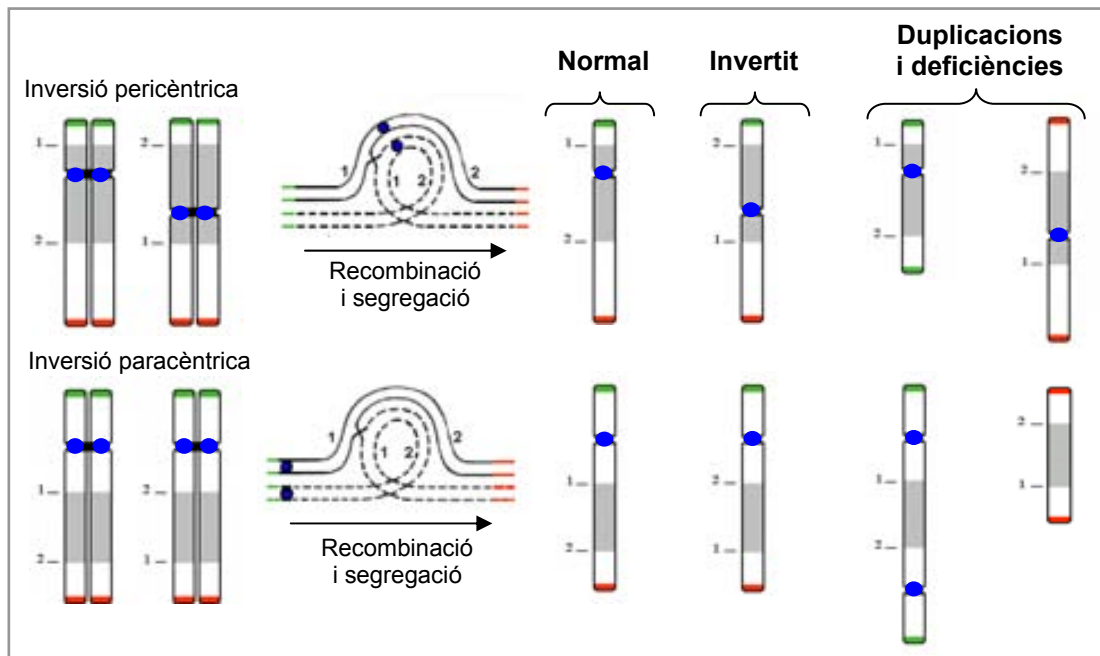


Figura 3.7 - Combinacions de senyals resultants de la segregació d'inversions pericèntriques i paracèntriques en les que ha tingut lloc un fenomen de recombinació a l'interior de la regió invertida.

En els **Treballs 4, 5 i 6** adjuntats al capítol de publicacions, hi ha recollits estudis de segregació realitzats en portadors d'inversions pericèntriques i paracèntriques en els que s'ha utilitzat l'estratègia que combina dues sondes.

► Sondes utilitzades pels estudis d'efecte inter cromosòmic

L'objectiu d'aquests estudis és detectar la presència d'aneuploïdies per altres cromosomes no implicats en una determinada reorganització.

En tots els individus es va analitzar la presència d'anomalies numèriques pels cromosomes 18, X, i Y mitjançant una barreja de sondes centromèriques (**Annex III**).

En alguns individus (**Treball 2 i Treball 5**), es va analitzar de forma complementària la presència d'anomalies numèriques pels cromosomes 13 i 21 (**Annex III**). En els casos on el cromosoma 13 formava part de la reorganització (**Treball 1**), es va optar per estudiar els cromosomes 21 i 22 (**Annex III**).

3.3.4- HIBRIDACIÓ

La majoria de les sondes utilitzades requereixen un procés de desnaturalització previ a la hibridació. La desnaturalització del DNA s'aconsegueix mitjançant un procés que combina l'efecte de la formamida (55% en el tampó de les sondes CEP i 50% en el de les sondes LSI) i de la temperatura. El resultat final és la presència de DNA en forma de cadena senzilla apte per hibridar amb les seqüències complementàries. El protocol consisteix en:

- Incubar a 73°C durant 5 minuts la mescla de sondes (preparada segons les indicacions de les cases comercials).
- Afegir les sondes desnaturalitzades sobre la mostra.
- Cobrir amb un cobreobjectes i segellar.
- Incubar les preparacions durant 12-16 hores en una cambra humida a 37°C.

3.3.5- RENTATS I CONTRATINCIÓ

Passat el temps d'hibridació, els portaobjectes es sotmeten a uns rentats en solucions salines amb astringència i temperatura decreixent per tal d'eliminar les restes de sonda que no hagin hibridat, o que ho hagin fet de forma inespecífica:

- Treure el cobreobjectes amb cura.
- Rentar en 0.4xSSC/0.3% NP-40 (pH 7-7.5) durant 2 minuts a 73°C.
- Rentar en 2xSSC/0.1% NP-40 (pH 7-7.5) durant 1 minut a temperatura ambient.

Finalment, la cromatina dels nuclis es tenyeix amb el fluorocrom DAPI II (Vysis Inc.) i es torna a segellar el cobreobjectes amb esmalt d'ungles.

Mentre no siguin valorades, aquestes mostres s'han de guardar en fosc a una temperatura de -20°C per tal de preservar al màxim la fluorescència.

3.4- VALORACIÓ MICROSCÒPICA

3.4.1- MICROSCOPI

La valoració de les mostres es va realitzar amb un microscopi de fluorescència Olympus BX-60 (Olympus Optical España, S.A.) dotat amb el següent equipament:

► Lents

Les mostres es van avaluar a través d'uns oculars de 10X i d'un objectiu d'immersió de 100X (Obertura numèrica=1.35).

► Bombeta de fluorescència

La font d'il·luminació utilitzada va ser una bombeta de mercuri de 100W. Aquesta està formada per dos elèctrodes segellats dins d'un bulb de vidre d'alta pressió que conté mercuri i un gas inert (xenó o argó). Un pols d'alt voltatge és emès pels elèctrodes, ionitzant el gas i fent que la bombeta emeti llum amb pics importants de longitud d'ona dins l'espectre ultraviolat (**Figura 3.8**).

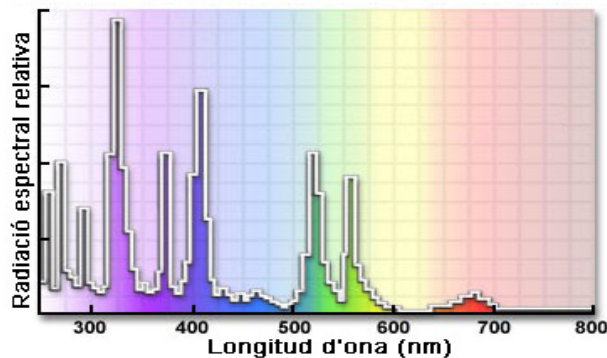


Figura 3.8- Espectre de llum emesa per la bombeta utilitzada (imatge adaptada de <http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/sources.html>).

El voltatge determina la intensitat de la llum que incideix sobre la preparació. Com més elevada sigui la intensitat, més fluorescència emeten els fluorocroms excitats, però també s'esvaeix més ràpidament per foto-oxidació.

► Filtres de fluorescència

Cada filtre de fluorescència està format per un cub que consta de tres elements bàsics (**Figura 3.9**):

- Filtre d'excitació

Selecciona un rang de longituds d'ona concrets de l'espectre de llum que emet la bombeta i que seran els que excitaran els fluorocroms de la mostra.

- Mirall dicroic

És un component òptic que reflexa selectivament la llum provinent del filtre d'excitació en direcció a la mostra a la vegada que deixa passar a través seu la llum amb una longitud d'ona superior emesa pels fluorocroms.

- Filtre d'emissió

Només deixa passar un determinat rang de longituds d'ona, específic pel fluorocrom que es vol observar i que és diferent en cada un dels cubs utilitzats.

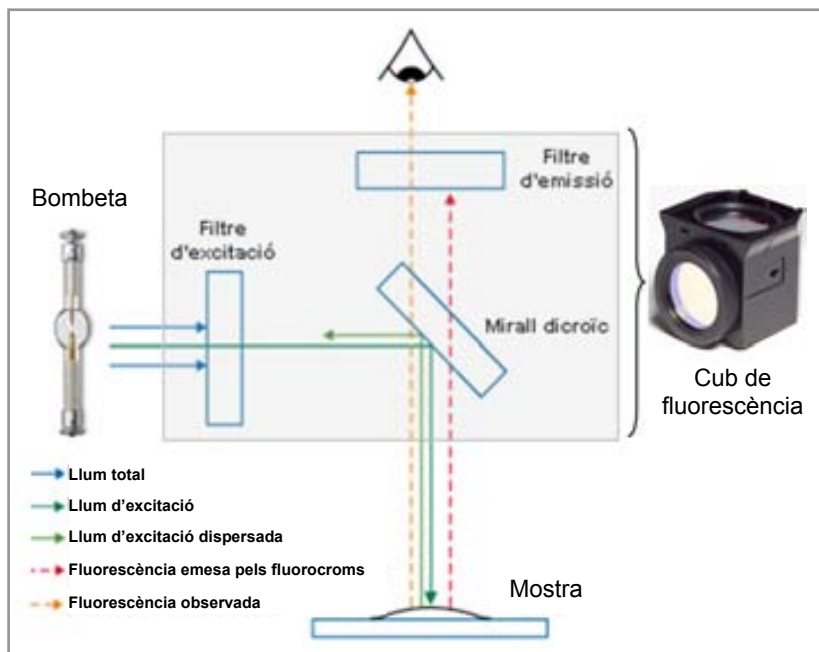


Figura 3.9 – Imatge d'un cub de filtres de fluorescència i esquema del pas de la llum a través de les parts que el formen (Adaptat de <http://www.tuckerlab.com/equip/microscope/cam/image/g000346.gif>).

El microscopi utilitzat disposava d'una roda de filtres de quatre posicions. En els estudis realitzats es van fer servir els següents filtres:

- Filtre de banda única pel fluorocrom FITC (Isotiocianat de fluoresceïna)
Aquest fluorocrom requereix una excitació amb llum $\lambda=494$ nm i emet una fluorescència amb $\lambda=525$ nm, corresponent a la llum verda (**Figura 3.10A**).
- Filtre de banda única pel fluorocrom Texas Red
Aquest fluorocrom és excitat amb llum de $\lambda=595-605$ nm i emet llum amb una $\lambda=620$ nm, corresponent a la llum vermella (**Figura 3.10B**).
- Filtre de banda única pel fluorocrom Aqua
Aquest fluorocrom requereix una excitació amb llum $\lambda=429$ nm que fa que emeti una $\lambda=476$ nm, corresponent a la llum blava (Figura 3.10C).
- Filtre de triple banda pels fluorocroms FITC / Texas Red / DAPI
Aquest filtre permet veure de forma conjunta la fluorescència verda, vermella i blava (**Figura 3.10D**).

► Sistema de captura d'imatges

El microscopi portava incorporada una càmera digital Olympus C-5050 Zoom connectada a un monitor de TV per tal de poder capturar i visualitzar les imatges.

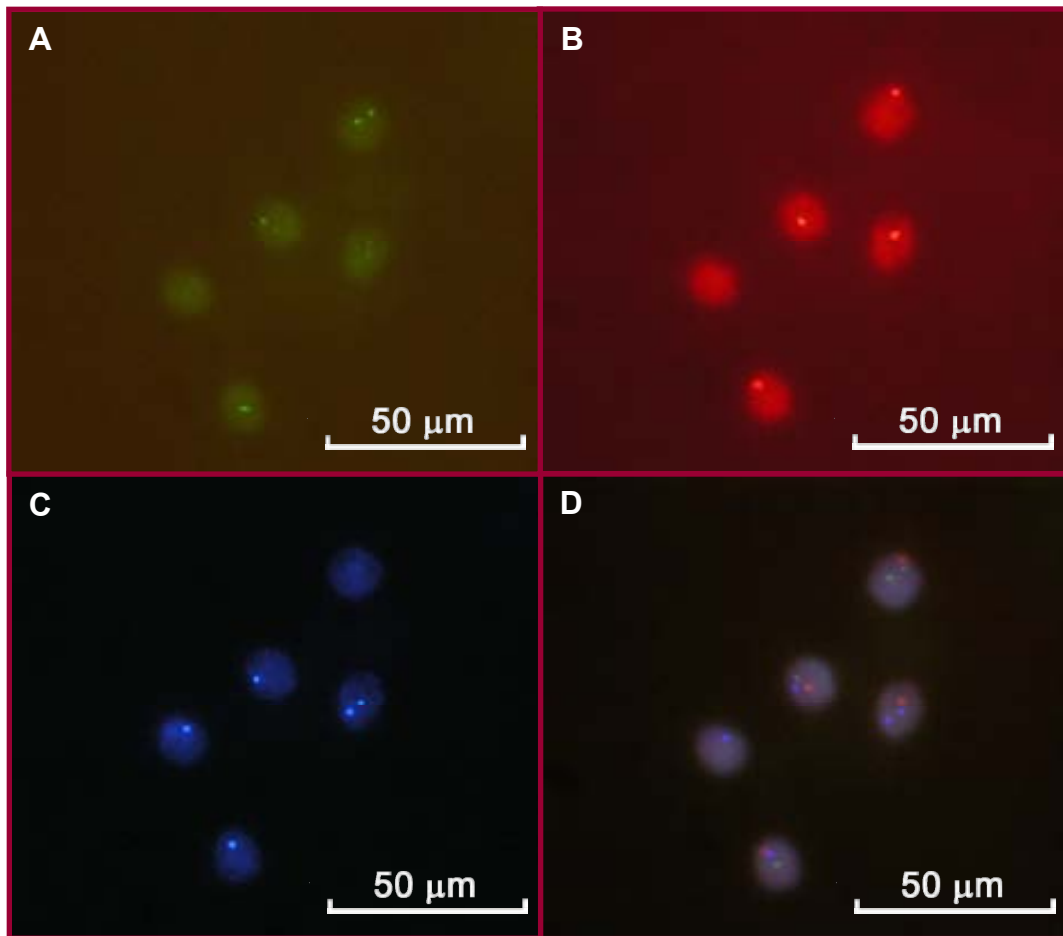


Figura 3.10- Nuclis d'espermatozoides d'un individu portador de la reorganització $t(9;19)(q10;p10)$ hibridats amb les sondes Tel 19p SpectrumGreen, Tel 19q SpectrumOrange i LSI 9q34 SpectrumAqua. La mateixa imatge apareix capturada al microscopi de fluorescència (a 3000X) a través dels 4 filtres específics utilitzats: A) Filtre de banda única per FITC; B) Filtre de banda única per Texas Red; C) Filtre de banda única per Aqua; D) Filtre de triple banda FITC/Texas Red/DAPI.

3.4.2- CRITERIS D'ANÀLISI

L'anàlisi citogenètica mitjançant FISH en nuclis interfàsics requereix l'establiment d'uns criteris força estrictes. Aquests tenen en compte:

► Grau de descondensació

El temps de descondensació de la cromatina dels nuclis d'espermatozoides és un paràmetre determinant per obtenir hibridacions de qualitat. Tant un excés com una manca del temps d'incubació pot provocar una alteració de l'eficiència d'hibridació de les sondes emprades (**Figura 3.11**):

- Si els nuclis estan poc descondensats les sondes no podran accedir al DNA i per tant no s'observaran senyals.
- Si estan massa descondensats, els senyals quedaran dispersos i donaran problemes d'interpretació.

TEMPS DE DESCONDENSACIÓ

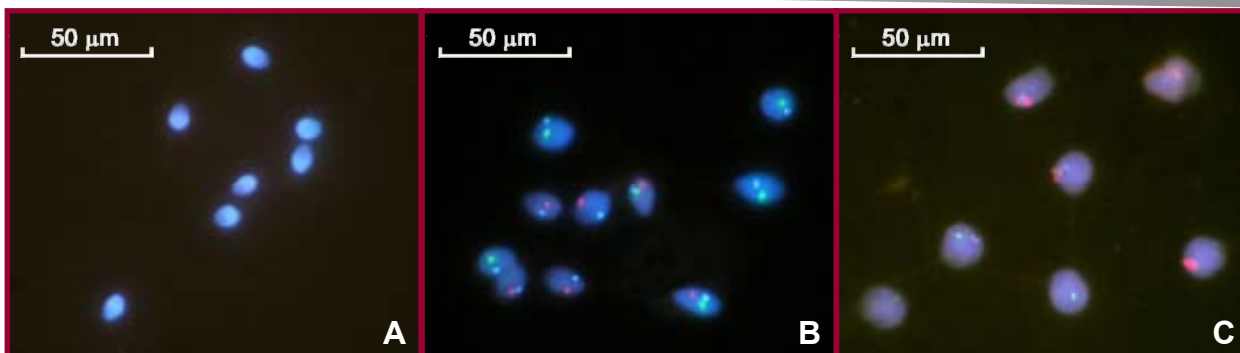


Figura 3.11- Imatges de nuclis dels espermatozoides (captats a 3000X) i sotmesos a diferents temps d'incubació en DTT (Sondes utilitzades: CEP X SpectrumGreen, CEP Y SpectrumOrange i CEP 18 SpectrumAqua; AneuVysion® Assay): A) Nuclis poc descondensats (absència de senyals); B) Nuclis amb un grau de descondensació òptim; C) Nuclis massa descondensats (senyals dispersos i poc específics).

► Criteris de valoració

Un cop obtinguda una hibridació amb un grau de descondensació òptim, només s'analitzen aquells espermatozoides que:

- Presenten com a mínim un senyal.
- No estan superposats.
- Tenen el contorn ben definit.

En els espermatozoides que compleixen aquests requisits, es valora quants senyals tenen i de quin color són cada un d'ells. En el cas de que hi hagi dos senyals amb el mateix color, només es consideren vàlids aquells que presenten:

- La mateixa intensitat.
- La mateixa mida.
- Una distància de separació igual o superior al seu diàmetre (**Figura 3.12**).

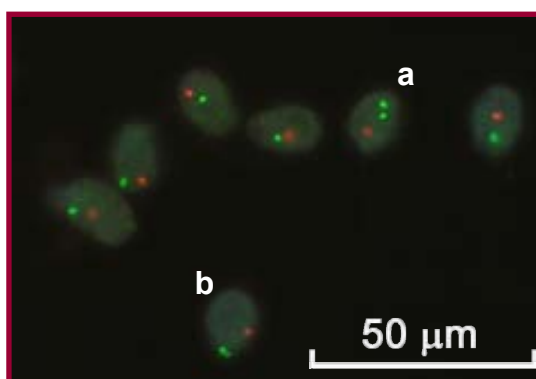


Figura 3.12- Nuclis d'espermatozoide hibridats amb les sondes LSI 13q14 SpectrumGreen i LSI 21q22 SpectrumOrange (AneuVysion® Assay). L'espermatozoide (a) va ser valorat com a disòmic pel cromosoma 13 (un senyal vermell i dos verds) mentre que el (b) es va classificar com a normal (un senyal vermell i un verd: els dos senyals verds estan massa propers i un és més petit que l'altre).

3.5- ANÀLISI ESTADÍSTICA DELS RESULTATS

L'anàlisi estadística dels resultats obtinguts en els diversos estudis es va realitzar amb la supervisió del Servei d'estadística de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.5.1- NÚMERO D'ESPERMATOZOIDES VALORATS

Per tal d'establir el nombre mínim d'espermatozoides a analitzar tant en els estudis de segregació com en els d'ICE, es va utilitzar el model estadístic de determinació de la mida de la mostra (**Requadre 3.1**). Aquest model té en compte els següents paràmetres:

► Nivell de confiança

El nivell de confiança és la probabilitat de que, a priori, l'interval de confiança contingui el veritable valor del paràmetre que estem estudiant. És a dir, el grau de seguretat amb que podem afirmar el que estem buscant sense equivocar-nos.

En el nostre estudi vam establir com a nivell de confiança el 95%. A partir d'aquest valor i segons les taules de distribució establertes per aquest tipus d'estudi, es va obtenir el valor **K** ($Z_{\alpha/2}$) (**Taula 3.4**).

Taula 3.4- Valors K corresponents a diversos nivells de confiança.

Nivell de confiança	Valor K	Nivell de significació (α)
90%	1.64	0.01
95%	1.96	0.05
95.5%	2	0.045
99%	2.57	0.001

► Incertesa

En la determinació de p_0 (proporció esperada de observacions que presentaran la característica que valorem) i del seu complementari $q_0=1-p_0$ (proporció dels que no la presenten), vam establir una situació de màxima incertesa (és aquella en la que no es coneix el valor p a priori). En aquest cas s'entén que, la probabilitat de que una observació presenti una característica o de que no la presenti és la mateixa i per tant $p=q=0.5$. A més a més, per aquests valors es pot demostrar que la mida de la mostra que s'obtindrà amb el càlcul del model utilitzat serà la màxima.

► Precisió

Pel que fa al valor e , aquest ens determinarà el nivell de precisió amb que podrem diferenciar una població d'una altra. És a dir, la diferència de percentatge que, per damunt i per sota d'un valor determinat, creiem que representa una diferència rellevant pels nostres resultats. Aquest valor s'estableix a criteri de l'avaluador, en funció del tipus d'estudi que vulgui realitzar. En el nostre cas vam establir que:

- En els estudis de segregació, la diferència mínima que es volia detectar era del $\pm 5\%$ ja que, la variació d'un percentatge com aquest (o inferior) en la valoració dels diferents modes de segregació, vam considerar que no modificaria de forma substancial el patró de comportament d'una reorganització.
- En els estudis d'efecte intercromosòmic en canvi, les diferències mínimes que es volien detectar eren d'un $\pm 1\%$, ja que variacions per sobre d'aquest valor tenen una significació biològica més important. Això es deu a que les freqüències observades en individus problema i en controls són molt més properes, de manera que és necessari ajustar-les al màxim per tal de poder detectar variacions significatives.

Tenint en compte que la població a valorar en el nostre estudi és de tipus infinit (el número d'espermatozoides susceptibles de ser analitzats per cada individu és il·limitat), la fórmula apropiada per calcular la mida de la mostra, on es troben recollits tots aquests paràmetres, és la següent (**Requadre 3.1**):

Requadre 3.1- Fórmula del model estadístic de determinació de la mida de la mostra.

$$n = \frac{K^2 \cdot p_0 \cdot q_0}{e^2}$$

On:

n = Mida de la mostra.

K = És el coeficient obtingut a partir del nivell de confiança ($1 - \alpha$). Fa referència al valor de l'abscissa en una determinada distribució que deixa a la seva dreta una àrea igual a $\alpha/2$. El valor α és el nivell de significació, és a dir, la probabilitat de fallar en la nostra estimació. Per exemple, en una estimació amb un nivell de confiança del 95%, el valor α és $1 - 0.95 = 0.05$.

p_0 = Proporció esperada d'observacions que presentaran la característica que valorem.

$q_0 = 1 - p_0$

e = Precisió amb la que es vol estimar un paràmetre ($2e$ és la amplitud del interval de confiança).

A partir d'aquesta fórmula es va establir que, en els estudis de segregació, el nombre mínim d'espermatozoides a valorar per a cada individu havia de ser de 400:

$$n = \frac{K^2 \cdot p_0 \cdot q_0}{e^2} = \frac{1.96^2 \cdot 0.5 \cdot 0.5}{0.05^2} = 384.16 \sim \boxed{400}$$

Pel que fa als estudis d'efecte intercromosòmic, es va calcular que la mida de mostra a valorar havia de ser, sempre que fos possible, més gran de 10000 espermatozoides:

$$n = \frac{K^2 \cdot p_0 \cdot q_0}{e^2} = \frac{1.96^2 \cdot 0.5 \cdot 0.5}{0.01^2} = 9604 \sim \boxed{10000}$$

3.5.2- PROGRAMES ESTADÍSTICS

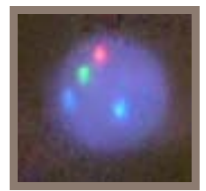
Els programes informàtics que es van utilitzar per dur a terme les anàlisis estadístiques van ser el SPSS 13.0 i el SigmaStat 2.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA).

Donat que en els nostres estudis vam establir un nivell de confiança del 95%, es van considerar estadísticament significatius tots aquells resultats que presentaven una $p < 0.05$.

3.5.3- POBLACIÓ CONTROL

Per tal de poder determinar la significança dels resultats obtinguts en els estudis d'efecte intercromosòmic, és necessari disposar de dades sobre la freqüència basal d'aneuploidies dels cromosomes analitzats en individus de la població general amb cariotip normal i paràmetres seminals normals (World Health Organization 1999).

En els estudis realitzats, es van utilitzar com a referència els valors obtinguts en poblacions control publicades pel nostre grup de recerca (Blanco et al. 1997; Blanco et al. 1998b; Soares et al. 2001).



4- Resum de resultats

4.1- PORTADORS DE TRANSLOCACIONS ROBERTSONIANES

4.1.1- SEGREGACIÓ

Els estudis realitzats en els portadors de les translocacions der(13;14) (**Treball 1**), der(13;22) i der(14;21) (dades no publicades) van mostrar una producció preferent d'espermatozoides amb un contingut normal/equilibrat (78.0-88.2%) amb una mitjana±DE de 85.4±3.1 (**Taula 4.1**). Els gàmetes desequilibrats derivats d'una segregació adjacent (11.2-21.5%) van presentar una mitjana±DE de 13.8±3.0. Les limitacions de la tècnica no van permetre diferenciar els espermatozoides amb contingut 3:0 dels diploides, que van ser agrupats sota el denominador polivalent "3:0/2n". Els portadors de combinacions de senyals que no es corresponien a cap d'aquests grups van ser classificats com a "Altres" (**Taula 4.1**).

Taula 4.1- Percentatges d'espermatozoides obtinguts pels diferents modes de segregació en portadors de translocacions Robertsonianes.

	Alternant (%)	Adjacent (%)	3:0/2n (%)	Altres (%)	Total (n)
der(13;14)	86.5	12.6	0.4	0.5	1361
der(13;14)	87.5	12.2	0.0	0.3	2901
der(13;14)	83.0	14.5	0.2	2.3	1012
der(13;14)	84.5	14.2	0.2	1.1	1002
der(13;14)	88.1	11.4	0.4	0.1	1272
der(13;14)	88.2	11.1	0.3	0.3	6128
der(13;14)	87.7	11.6	0.4	0.3	774
der(13;22)	85.5	13.9	0.5	0.1	1134
der(14;21)	78.0	21.5	0.3	0.3	1102
der(14;21)	85.1	14.7	0.2	0.0	523
Mitjana±DE	85.4±3.1	13.8±3.0	0.3±0.1	0.5±0.7	
Rang	78.0-88.2	11.1-21.5	0.0-0.5	0.0-2.3	

Tal com es desprèn dels valors de la taula, els percentatges d'espermatozoides observats pels diversos modes de segregació van ser molt homogenis en tots els individus, amb desviacions estàndard molt ajustades a la mitjana.

Degut al baix nombre de portadors de les reorganitzacions der(13;22) i der(14;21) analitzats, no va ser possible comparar estadísticament els resultats dels tres tipus de translocacions Robertsonianes. Per aquest motiu, els casos van ser agrupats en funció de la simetria del trivalent (translocacions entre cromosomes del grup D o bé que impliquin un cromosoma del grup D i un altre del grup G). La comparació estadística d'aquestes dues tipologies no va mostrar diferències significatives (Test de Mann-Whitney; $p>0.05$).

4.1.2- EFECTE INTERCROMOSÒMIC

En tots els casos es va valorar la presència d'anomalies numèriques pels cromosomes sexuals i les diploïdies (**Taula 4.2**). En els portadors de la translocació der(13;14) també es van valorar les anomalies numèriques pels cromosomes 21 i 22 (**Treball 1**) (**Taula 4.2**).

Es van observar increments significatius en els percentatges d'espermatozoides portadors de disomies pels cromosomes sexuals en tres dels deu individus (Test de χ^2 ; $p < 0.05$). El portador de la reorganització der(13;22) també va mostrar una producció de gàmetes diploides significativament incrementada (Test de χ^2 ; $p < 0.05$) (**Taula 4.2**).

Taula 4.2- Resultats dels estudis d'ICE en portadors de translocacions Robertsonianes i valors de referència de les poblacions control.

	Disomies 21 (%)	Disomies 22 (%)	Total (n)	Disomies 18 (%)	Disomies cr. sexuals (%)	2n (%)	Total (n)
der(13;14)	0.11	0.00	880	0.00	0.23	0.15	1299
der(13;14)	0.10	0.10	6303	0.11	0.44	0.00	1841
der(13;14)	0.07	0.07	1494	0.12	0.94*	0.12	2440
der(13;14)	0.06	0.17	1788	0.00	0.18	0.19	1071
der(13;14)	0.31	0.18	1628	0.05	0.47	0.52	2115
der(13;14)	0.66	0.08	1209	0.00	1.34*	0.13	2240
der(13;14)	0.23	0.23	429	0.00	0.39	0.00	256
der(13;22)	---	---	---	0.03	0.38*	0.34*	10480
der(14;21)	---	---	---	0.09	0.17	0.09	10217
der(14;21)	---	---	---	0.09	0.04	0.09	2347
A	0.37	---	28044	---	---	---	---
Controls B	---	0.06	90474	---	---	---	---
C	---	---	---	0.09	0.37	0.24	51368

A (Blanco et al. 1998b); **B** (Soares et al. 2001); **C** (Blanco et al. 1997).

*Diferències significatives respecte la població control ($p < 0.05$).

Els percentatges de diploïdies observats en cada un dels individus (**Taula 4.2**), no van ser significativament diferents (Test de χ^2 ; $p > 0.05$) dels espermatozoides classificats com a 3:0/2n en els estudis de segregació (**Taula 4.1**), indicant una ocurrència pràcticament nul·la del mode 3:0.

4.2- PORTADORS DE TRANSLOCACIONS RECÍPROQUES

4.2.1- SEGREGACIÓ

En els portadors de translocacions recíproques (**Treballs 2 i 3**), la producció mitjana \pm DE de gàmetes normals/equilibrats va ser del 46.4 \pm 6.5 (**Taula 4.3**). Pel que fa a la ocurrència dels modes de segregació desequilibrats, el més freqüent va

ser l'adjacent I (rang 21.8-38.3%) amb una mitjana \pm DE de 33.6 \pm 4.4, seguit de l'adjacent II (rang 0.2-25.4%), amb una mitjana \pm DE de 11.7 \pm 6.9 i finalment el 3:1 (rang 2.3-13.6%), amb una mitjana \pm DE de 6.8 \pm 3.5 (**Taula 4.3**). Les limitacions de la tècnica no van permetre diferenciar els espermatozoides amb contingut 4:0 dels diploides, que van ser agrupats sota el denominador polivalent "4:0/2n". Els portadors de combinacions de senyals que no es corresponien a cap d'aquests grups van ser classificats com a "Altres" (**Taula 4.3**).

Taula 4.3- Percentatges d'espermatozoides obtinguts pels diferents modes de segregació en portadors de translocacions recíproques.

	Alternant (%)	Adjacent I (%)	Adjacent II (%)	3:1 (%)	4:0/2n (%)	Altres (%)	Total (n)
t(9;19)(q10;p10)	43.5	32.4	17.8	4.7	1.2	0.4	1054
t(1;11)(q12;q13)	51.2	21.8	16.7	8.0	1.9	0.5	648
t(5;8)(q33;q13)	45.1	38.3	7.0	6.6	1.2	1.8	9994
t(4;7)(q31.1;q32)	45.3	38.0	9.8	6.1	0.1	0.4	1046
t(2;6)(q37;p21)	39.5	33.8	12.2	13.6	0.2	0.6	1005
t(8;14)(q22;q32)	41.5	35.3	4.4	12.3	1.7	4.8	641
t(5;8)(q35.1;p11.2)	47.7	34.5	9.6	7.0	0.1	1.2	2531
t(5;17)(q31;p13)	45.1	37.0	14.6	3.2	0.1	0.0	1453
t(9;20)(p24;q13.1)	37.1	29.5	25.4	7.1	0.2	0.8	1006
t(10;13)(p13;p13)	61.8	34.4	0.2	2.5	0.5	0.8	1054
t(10;14)(q24;p11.2)	56.7	38.3	1.4	2.3	0.6	0.4	1051
t(11;22)(q23;q11)	42.9	33.3	13.2	9.8	0.1	0.6	3596
t(11;22)(q23;q11)	45.0	29.8	15.9	8.6	0.2	0.5	4058
t(6;22)(q13;q13)	46.7	33.5	16.0	3.4	0.0	0.4	1163
Mitjana \pm DE	46.4 \pm 6.5	33.6 \pm 4.4	11.7 \pm 6.9	6.8 \pm 3.5	0.6 \pm 0.6	0.9 \pm 1.2	
Rang	37.1-61.8	21.8-38.3	0.2-25.4	2.3-13.6	0.0-1.9	0.0-4.8	

Les freqüències dels diversos modes de segregació en portadors de translocacions recíproques, van ser més heterogènies que les detectades en les translocacions Robertsonianes, amb desviacions estàndard més elevades i rangs més amplis.

Atenent a aquesta divergència, es va realitzar una anàlisi de conglomerats jeràrquics per tal d'avaluar estadísticament el grau de similitud existent entre els patrons de segregació dels catorze individus. El dendrograma² resultant va mostrar dos grups clarament diferenciats (**Figura 4.1**): el Grup 1 (distància d'associació <10), va englobar dotze casos que a la vegada estaven distribuïts en diversos subgrups més petits, mentre que els dos individus restants van ser inclosos en el Grup 2 (distància d'associació =25).

² Dendrograma = Diagrama en forma d'arbre que mostra les relacions de proximitat entre diversos elements.

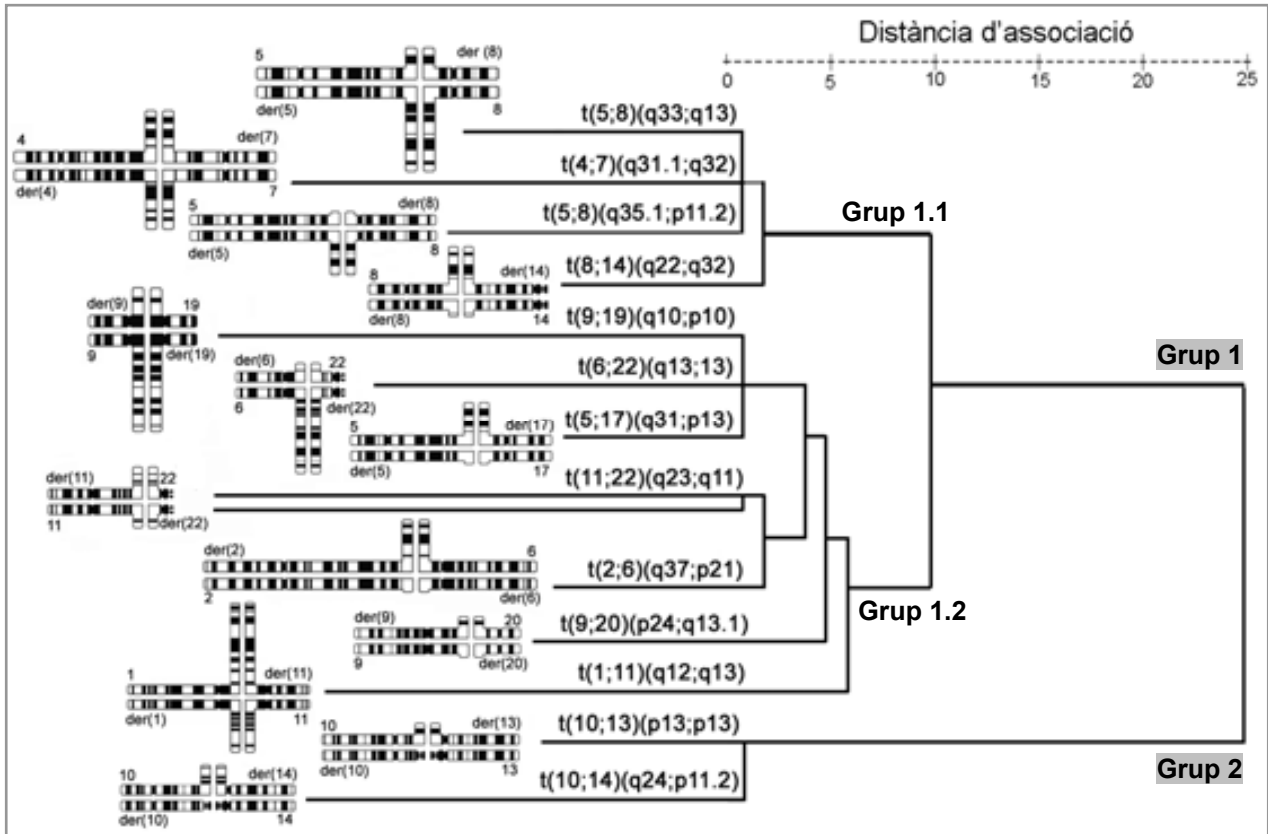


Figura 4.1- Dendrograma obtingut a partir de l'anàlisi de conglomerats jeràrquics realitzat sobre els patrons de segregació dels catorze portadors de translocacions recíproques. Per simplificar, els ideogrames de les reorganitzacions s'han representat amb una sola cromàtide.

El patró de segregació dels individus del Grup 1 presentava una producció esglaonada decreixent de les segregacions alternant, adjacent I, adjacent II i 3:1 (**Figura 4.2A**). En canvi, els individus del Grup 2 mostraven una absència quasi total dels modes de segregació adjacent II i 3:1, compensada per un increment del mode alternant (**Figura 4.2B**), que va resultar ser significativament més elevat que el del Grup 1 (Test de Mann-Whitney; $p=0.028$).

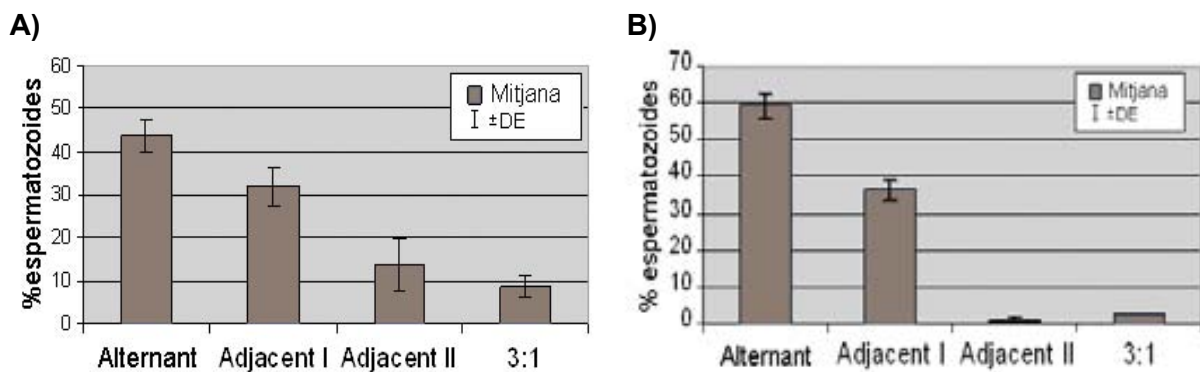


Figura 4.2- Freqüències mitjanes i desviacions estàndard dels modes de segregació de les translocacions recíproques del Grup 1 (**A**) i del Grup 2 (**B**).

Els dos individus portadors de la mateixa translocació recíproca $t(11;22)(q23;q11)$ van quedar agrupats a la distància mínima en un dels subconjunts del Grup 1, fet que va posar de manifest l'elevada similitud dels seus patrons de segregació (**Treball 2**).

Donat que les diferències de comportament de les translocacions recíproques han estat clàssicament associades a les característiques pròpies de cada reorganització, els resultats obtinguts en el dendrograma (**Figura 4.1**) van ser comparats amb les característiques citogenètiques de les translocacions:

► Posició dels centròmers/mida dels segments intersticials

La localització dels centròmers en les creus de translocació del Grup 1 va ser molt heterogènia, amb casos que presentaven els dos centròmers al centre de la creu (translocacions 1;11 i 9;19), d'altres amb un segment intersticial curt i l'altre llarg (translocacions 2;6 i 5q;8p), i també translocacions amb el dos segments intersticials llargs (translocacions 4;7 i 8;14). En cap dels diversos subconjunts del Grup 1 es va detectar una implicació preferent d'alguna d'aquestes característiques (**Figura 4.1**).

En els dos individus del Grup 2 es va observar que, el centròmer del cromosoma acrocèntric implicat en cada reorganització, estava localitzat al centre de la creu. L'altre centròmer definia un segment intersticial de mida similar en ambdós casos (**Figura 4.1**).

► Configuracions meiòtiques

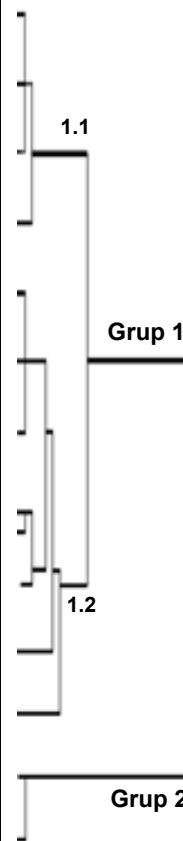
Les configuracions meiòtiques esperades a metafase I per a cada una de les reorganitzacions es van inferir a partir de les freqüències de quiasmes estimades a les diverses regions de les creus de translocació (**Taula 4.4**). Aquestes dades van ser calculades a partir dels resultats publicats per Codina-Pascual et al. (2006a) on es valorava la freqüència i distribució de quiasmes en dos individus fèrtils.

Amb aquestes dades es va establir en quins segments s'hi formaria com a mínim un quiasma i per tant sempre quedarien aparellats (**Taula 4.4**; valors en verd), i la probabilitat de que això es donés en els altres segments (**Taula 4.4**; valors en vermell). Les combinacions d'aquestes freqüències van determinar unes configuracions o unes altres i la probabilitat amb que es donarien (**Taula 4.4**). A mode d'exemple: en la reorganització $t(4;7)$ es va establir que es donaria almenys un quiasma en els dos segments centrals (SC) i en un dels segments translocats

(ST). A l'altre ST es va estimar que s'hi formarien 0.9 quiasmes (un quiasma en el 90% dels casos). Això va indicar que aquesta reorganització formaria una configuració tancada (tots els segments units per recombinació) en el 90% dels casos, mentre que en el 10% restant, adoptaria una estructura oberta (tots els segments units menys un). En el cas de la reorganització t(10;13)(p13;p13) es va establir que es donaria >1 quiasma en els dos SC mentre que, en un dels ST no s'hi formaria mai un quiasma, i en l'altre s'hi formaria un quiasma sis de cada deu vegades (0.6 quiasmes). Això va indicar la formació d'un tetravalent obert en el 60% dels casos (tres segments amb recombinació) i una configuració en forma de dos bivalents en el 40% restant (recombinació només en els dos SC).

Taula 4.4- Distribució de quiasmes i configuracions meiótiques esperades de les translocacions recíproques estudiades.

Translocació recíproca	Cr.	Foci/SC	Foci/ST	Configuracions meiótiques			
				IV	II+II	III+I	II+I+I
t(5;8)(q33;q13)	5	2.0	0.7	100%			
	8	1.0	1.2	(70% tancat, 30% obert)			
t(4;7)(q31.1;q32)	4	1.6	1.0	100%			
	7	1.6	0.9	(90% tancat, 10% obert)			
t(5;8)(q35.1;p11.2)	5	2.5	0.2	100%			
	8	1.2	1.0	(20% tancat, 80% obert)			
t(8;14)(q22;q32)	8	1.3	0.9	99%	1%		
	14	1.6	0.1	(9% tancat, 91% obert)			
t(9;19)(q10;p10)	9	1.9	1.3	100%			
	19	1.0	0.9	(90% tancat, 10% obert)			
(6;22)(q13;q13)	6	1.1	1.4	100%			
	22	1.1	0.0	(obert)			
t(5;17)(q31;p13)	5	1.7	0.9	92%	8%		
	17	1.7	0.2	(20% tancat, 80% obert)			
t(11;22)(q23;q11)	11	1.5	0.6	62%	1%	34%	3%
	22	0.2	0.9	(17% tancat, 83% obert)			
t(2;6)(q37;p21)	2	3.1	0.1	100%			
	6	1.5	1.0	(10% tancat, 90% obert)			
t(9;20)(p24;q13.1)	9	1.9	0.3	74%	11%	12%	3%
	20	0.8	0.8	(32% tancat, 68% obert)			
t(1;11)(q12;q13)	1	1.8	1.6	100%			
	11	1.0	1.2	(tancat)			
t(10;13)(p13;p13)	10	1.6	0.6	60%	40%		
	13	1.8	0.0	(Obert)			
t(10;14)(q24;p11.2)	10	1.5	0.7	70%	30%		
	14	1.7	0.0	(Obert)			



SC= Segments cèntrics; ST= Segments translocats.

Verd= Recombinació forçosa (≥1 foci/segment); **Vermell**= Recombinació esporàdica (<1 foci/segment).

Configuracions meiótiques: **IV** = tetravalent (la probabilitat de que presenti una configuració tancada o oberta depèn de la freqüència amb que es doni un quiasma en el segment amb recombinació esporàdica).

II+II = dos bivalents.

III+I = trivalent i univalent.

II+I+I = bivalent i dos univalents.

Els resultats van indicar que la configuració meiòtica preferent en tots els individus era la d'un tetravalent (en forma tancada o oberta). En alguns casos, també es va observar una probabilitat destacable de que es formessin altres configuracions:

- Trivalent + univalent

Les translocacions t(11;22) són les que van mostrar una major tendència a adoptar aquesta configuració (34%), tot i que aquesta també va ser observada amb menor freqüència (12%) en el cas t(9;20).

Pel que fa a la seva classificació, aquests individus van ocupar posicions força properes dins del dendrograma (Grup 1; Subgrup 1.2) (**Figura 4.1**).

- Bivalent + bivalent

Les translocacions t(10;14) i t(10;13) són les que van mostrar una major tendència a adoptar aquesta configuració (30% i 40% respectivament), tot i que el cas t(9;20) també va mostrar certa predisposició a formar aquesta estructura amb una freqüència més baixa (11%).

Mentre que la translocació t(9;20) va ser classificada en el Subgrup 1.2 del dendrograma (veure punt anterior), els portadors de les t(10;13) i t(10;14) van ser els classificats conjuntament en el Grup 2 (**Figura 4.1**).

► Mida dels segments implicats

Es va avaluar la relació entre la producció de gàmetes amb contingut adjacent I i la mida dels segments translocats mitjançant un test de correlació de Pearson. Els resultats van mostrar una correlació significativa ($p=0.0313$; $r=-0.575$) indicant que, les creus amb segments translocats més curts, presentaven major tendència a segregar segons el mode adjacent I (**Figura 4.3**).

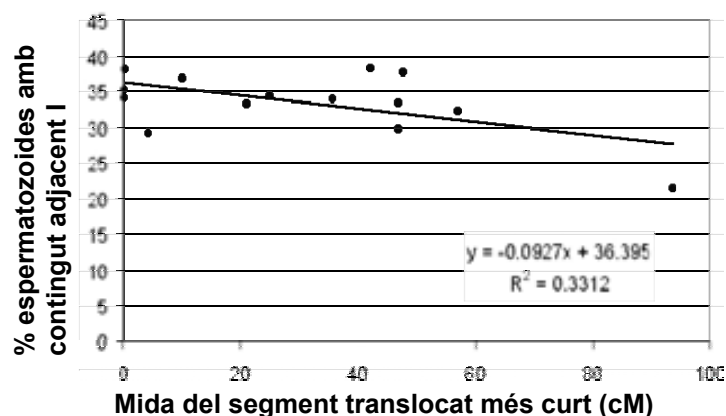


Figura 4.3- Relació lineal entre la producció d'espermatozoides amb contingut adjacent I i la mida del segment translocat més curt.

També es va valorar la influència de segments cèntrics curts en la producció de gàmetes amb contingut adjacent II. En aquest cas no es va observar una correlació significativa (Coeficient de correlació de Pearson $r=0.438$; $p=0.117$), tot i que la línia de regressió va mostrar una progressiva reducció dels productes amb contingut adjacent II amb l'increment de la mida dels segments cèntrics (**Figura 4.4**). En la gràfica obtinguda, la distribució de punts va permetre observar dos grups d'individus amb comportaments diferenciats: aquells casos amb segments cèntrics més curts produïen una quantitat de gàmetes amb contingut adjacent II superior a la dels casos amb segments cèntrics més llargs. La comparació d'aquests dos grups va indicar que eren significativament diferents tant pel que fa a la producció de gàmetes amb contingut adjacent II (Test de Mann-Whitney; $p=0.003$) com per la mida dels segments cèntrics (Test de Mann-Whitney; $p=0.002$) (**Figura 4.4**).

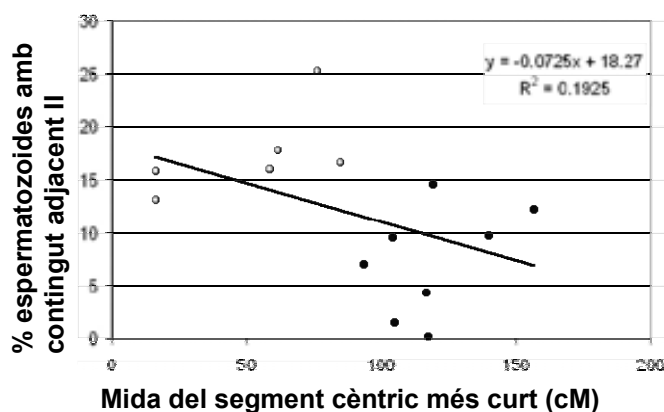


Figura 4.4- Relació entre la producció de gàmetes amb contingut adjacent II i la mida dels segments cèntrics més curts. Els individus representats per un punt blanc (○) presenten diferències significatives en la producció de gàmetes amb contingut adjacent II respecte als individus representats per un punt negre (●).

Tot i així, l'efecte de la mida dels segments en els modes de segregació adjacents no va quedar reflectit en el dendrograma obtingut.

► Característiques dels cromosomes implicats

En les reorganitzacions dels diversos grups del dendrograma es va valorar la presència de:

- Cromosomes amb regions heterocromàtiques polimòrfiques.

Els tres casos que implicaven cromosomes amb heterocromatina polimòrfica (translocacions 1;11, 9;10 i 9;20) estaven agrupats en el Subgrup 1.2, però en extrems força distants.

- Cromosomes acrocèntrics

La seva presència va ser especialment significativa en els dos individus del Grup 2 ja que en ambdues reorganitzacions hi havia un cromosoma acrocèntric implicat. Aquesta característica però, no va ser exclusiva del Grup 2, ja que tres reorganitzacions del Grup 1 també involucraven acrocèntrics (translocacions 8;14, 6;22 i 11;22).

4.2.2- EFECTE INTERCROMOSÒMIC

En tots els portadors de translocacions recíproques es va valorar la presència de diploïdies i d'anomalies numèriques pels cromosomes 18 i sexuals. De forma addicional, en els individus portadors de la translocació t(11;22) també es van valorar les anomalies numèriques pels cromosomes 13 i 21 (**Treball 2**).

Set dels catorze individus analitzats van mostrar increments significatius de gàmetes amb anomalies numèriques (Test de χ^2 ; $p < 0.05$) (**Taula 4.5**). En sis d'ells, els cromosomes sexuals hi estaven implicats de forma única o combinats amb disomies del 18 o diploïdies. Només en un dels individus, els increments van afectar tan sols a la producció de diploïdies (**Taula 4.5**).

No es van observar freqüències incrementades de disomies pels cromosomes 13 i 21 en cap dels individus en que van ser analitzades.

Taula 4.5- Resultats dels estudis d'ICE en portadors de translocacions recíproques i valors de referència de les poblacions control.

		Disomies 13 (%)	Disomies 21 (%)	Total (n)	Disomies 18 (%)	Disomies cr. sexuals (%)	2n (%)	Total (n)
t(9;19)(q10;p10)		---	---	---	0.09	0.17	0.71*	10496
t(1;11)(q12;q13)		---	---	---	0.26*	1.81*	1.02*	3421
t(5;8)(q33;q13)		---	---	---	0.17	1.11*	1.58*	10165
t(4;7)(q31.1;q32)		---	---	---	0.00	0.19	0.12	10328
t(2;6)(q37;p21)		---	---	---	0.04	0.29	0.00	10573
t(8;14)(q22;q32)		---	---	---	0.18*	0.81*	0.91*	10009
t(5;8)(q35.1;p11.2)		---	---	---	0.08	0.88*	0.13	10054
t(5;17)(q31;p13)		---	---	---	0.08	0.24	0.13	10154
t(9;20)(p24;q13.1)		---	---	---	0.09	0.33	0.10	10476
t(10;13)(p13;p13)		---	---	---	0.03	0.28	0.25	10110
t(10;14)(q24;p11.2)		---	---	---	0.11	0.41*	0.62*	10327
t(11;22)(q23;q11)		0.13	0.06	14875	0.03	0.14	0.19	15043
t(11;22)(q23;q11)		0.07	0.08	10193	0.11	0.60*	0.10	10222
t(6;22)(q13;q13)		---	---	---	0.02	0.14	0.08	10115
Controls	A	---	0.37	28044	---	---	---	---
	B	0.10	---	90474	---	---	---	---
	C	---	---	---	0.09	0.37	0.24	51368

A (Blanco et al. 1998b); B (Soares et al. 2001); C (Blanco et al. 1997).

*Diferències significatives respecte la població control ($p < 0.05$).

Els percentatges de gàmetes portadors de diploidies (**Taula 4.5**) no van mostrar diferències significatives respecte als espermatozoides classificats com a 4:0/2n en els estudis de segregació (**Taula 4.3**), indicant una ocurrència pràcticament nul·la del mode 4:0.

4.3- PORTADORS D'INVERSIONS

4.3.1- SEGREGACIÓ

Els percentatges de gàmetes normals/equilibrats observats en els estudis de segregació realitzats en portadors d'inversions (**Treballs 4 i 5**), van ser molt similars i elevats en quatre dels cinc individus analitzats, amb incidències al voltant del 96%. En canvi el portador de la inv(6) va presentar una producció d'espermatozoides normals/equilibrats inferior al 50%, molt més baixa que les altres quatre (**Taula 4.6**).

Taula 4.6- Percentatges de gàmetes normals/equilibrats (N/E) en portadors d'inversions. En cada cas s'especifica la mida (Mbp) i la proporció (%) del segment invertit respecte al cromosoma afectat.

	N/E (%)	Total (n)	Mida inversió (Mpb)	Porporció inversió (%)
inv(2)(p11.2q13)	98.2	5460	29	11.9
inv(4)(p16q21)	96.0	6406	85	44.5
inv(4)(p14p15.3)	97.0	8158	11	5.8
inv(6)(p23q25)	45.7	10049	150	88.2
inv(10)(p13q22.3)	94.0	10723	65	48.2
Mltjana±DE	86.2±22.7		68.0±54.3	39.7±33.1
Rang	45.7-98.2		11-150	5.8-88.2

És important remarcar que la mida del segment invertit era molt desigual en els cinc casos, tant pel que fa a la mida, com per la proporció d'aquest segment dins del cromosoma. Concretament, el cas amb menor producció de gàmetes normals/equilibrats va ser el que presentava la inversió més gran (150 Mpb equivalents al 88% del cromosoma). La resta tenien mides que oscil·laven entre 11-85 Mpb, implicant una proporció del 12-50% del cromosoma.

Per tal de valorar el grau d'influència d'aquests paràmetres en la producció de gàmetes desequilibrats, vam realitzar una anàlisi estadística a partir de tots els casos publicats a la literatura (**Treball 6**). Els percentatges de gàmetes recombinants van ser correlacionats amb la mida (Mpb) de les inversions respectives i amb la proporció de cromosoma invertit mitjançant el Test de

correlació de Pearson, obtenint un resultat significatiu en ambdós casos ($p < 0.01$; $r = 0.884$ i $r = 0.793$ respectivament) (**Figura 4.5**).

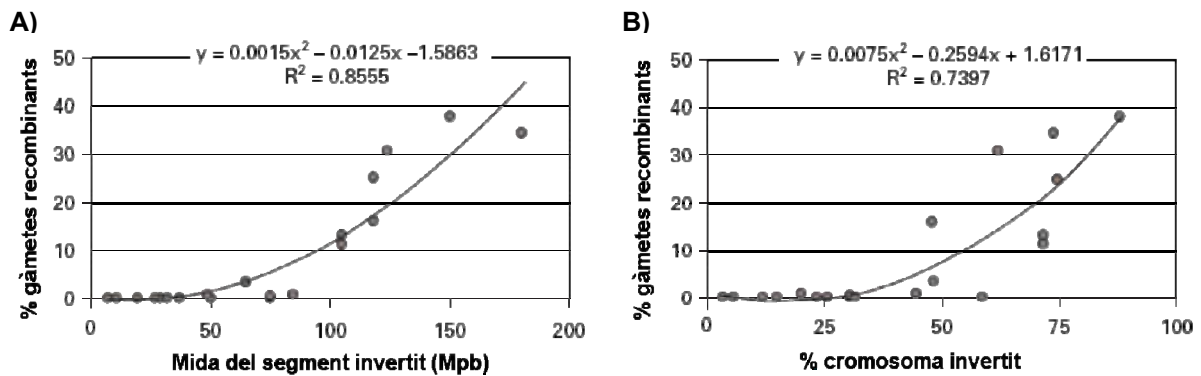


Figura 4.5- Gràfiques que mostren la relació entre: A) mida del segment invertit (Mpb) i percentatge de gàmetes recombinants; B) proporció de cromosoma invertit i percentatge de gàmetes recombinants.

4.3.2- EFECTE INTERCROMOSÒMIC

En quatre dels cinc individus portadors d'inversions es va valorar la presència de diploïdies i de disomies pels cromosomes 13, 18, 21, X i Y (**Taula 4.7**). En el cas del portador de la inv(6), es van analitzar les anomalies numèriques pels cromosomes sexuals i les diploïdies (**Taula 4.7**).

Taula 4.7- Resultats dels estudis d'ICE en portadors d'inversions i valors de referència de les poblacions control.

		Disomies 13 (%)	Disomies 21 (%)	Total (n)	Disomies 18 (%)	Disomies cr. sexuals (%)	2n (%)	Total (n)
inv(2)(p11.2q13)		0.17	0.17	10128	0.00	0.18	0.10	10064
inv(4)(p16q21)		0.09	0.04	5359	0.00	0.08	0.23	10121
inv(4)(p14p15.3), inv(Y)(p11.1q11.23)		0.26*	0.22	10035	0.09	0.92*	0.69*	10163
inv(6)(p23q25)		---	---	---	0.01	0.44	0.24	10007
inv(10)(p13q22.3)		0.07	0.07	10121	0.01	0.15	0.11	10064
Controls	A	---	0.37	28044	---	---	---	---
	B	0.10	---	90474	---	---	---	---
	C	---	---	---	0.09	0.37	0.24	51368

A (Blanco et al. 1998b); B (Soares et al. 2001); C (Blanco et al. 1997)

*Diferències significatives respecte la població control ($p < 0.05$).

Es van detectar increments significatius respecte la població control en el cas 46,XY,inv(4),inv(Y) tant pel que fa a les diploïdies, com per les disomies del cromosoma 13 i dels sexuals (Test de χ^2 ; $p < 0.05$).



5- Publicacions

Els resultats obtinguts durant la realització d'aquest estudi han donat lloc a la publicació de 7 articles en revistes científiques internacionals que queden recollits a continuació:

- Estudis en portadors de translocacions Robertsonianes.
Treball 1- *Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation $t(13;14)(q10;q10)$.*
- Estudis en portadors de translocacions recíproques.
Treball 2- *Preferential alternate segregation in the common $t(11;22)(q23;q11)$ reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers.*
Treball 3- *Reciprocal translocations: tracing their meiotic behaviour.*
- Estudis en portadors d'inversions.
Treball 4- *Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion $inv(6)(p23q25)$ carrier using FISH on decondensed sperm nuclei.*
Treball 5- *Genetic reproductive risk in inversion carriers.*
Treball 6- *Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review.*
- Article d'opinió
Treball 7- *Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers.*

TREBALL 1

Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10).

Human Reproduction 19:1345-1351

ANTON Ester, BLANCO Joan, EGOZCUE Josep, VIDAL Francesca

2004

Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10)

E.Anton, J.Blanco, J.Egozcue and F.Vidal¹

Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: francesca.vidal@uab.es

BACKGROUND: Robertsonian translocation t(13;14) is one of the most common structural reorganization in humans, but meiotic segregation studies in these carriers are still limited. The segregation pattern of the chromosomes involved, the possible influence of the translocated chromosomes on the synapsis and disjunction of other chromosome pairs [interchromosomal effects (ICE)] and the rates of unbalanced spermatozoa produced still deserve attention, not only to obtain a better characterization of the meiotic behaviour of this reorganization, but also to offer carrier couples accurate genetic counselling. **METHODS:** Multicolour fluorescence in-situ hybridization was used to analyse the segregation of chromosomes 13 and 14 and the possible occurrence of ICE (on chromosomes 18, 21, 22, X and Y) in seven male carriers of a t(13;14)(q10;q10). **RESULTS AND CONCLUSIONS:** The individuals analysed showed a homogeneous segregation pattern, with a clear predominance of alternate segregations resulting in the production of normal/balanced spermatozoa (83–88.23%). A significant increase in the disomy rates for the sex chromosomes, which could be considered as a positive ICE, was observed in two of the carriers analysed.

Key words: FISH/interchromosomal effects/meiotic segregation/Robertsonian translocations/spermatozoa

Introduction

Constitutional chromosome abnormalities in humans are known to be directly related to human male infertility (Egozcue *et al.*, 2000). Structural chromosome rearrangements account for ~21% of all chromosome abnormalities (De Braekeleer and Dao, 1991; Pandiyan *et al.*, 1996), and Robertsonian translocations are one of the more common structural reorganizations, with an incidence of 1.23/1000 newborns (Nielsen and Wohlert, 1991), of which ~50% are *de novo* (Shaffer *et al.*, 1992). Among them, the most frequently seen in the general population is t(13;14), with an incidence of 0.97/1000 newborn carriers (Nielsen and Wohlert, 1991), reaching frequencies up to nine times higher in infertile males (De Braekeleer and Dao, 1991).

The cause of the infertility in these individuals has been directly related to the meiotic process. In Robertsonian translocations, pairing of the reorganized chromosomes during prophase I gives rise to a trivalent structure (Vidal *et al.*, 1982; Luciani *et al.*, 1984). It is well known that this meiotic configuration tends to segregate in an alternate way (Sybenga, 1975), resulting in the production of normal or balanced spermatozoa. However, a certain percentage of unbalanced spermatozoa deriving from adjacent segregations are also produced, and could be responsible for the miscarriages or the severely affected aneuploid offspring frequently born to these carriers (Egozcue *et al.*, 2000). Furthermore, the meiotic disturbances (synaptic anomalies) resulting from the behaviour

of the reorganized chromosomes and of other bivalents could lead to different degrees of meiotic arrest, resulting in the oligozoospermia or azoospermia frequently observed in these patients.

Since cytogenetic studies of spermatozoa became possible, several groups have tried to analyse the meiotic behaviour of specific reorganizations and to evaluate the final production of balanced or unbalanced sperm, in order to offer patients accurate reproductive advice. Studies of the segregation products in Robertsonian (13;14) translocation carriers have been carried out since the early 1980s (Table I). The first studies used the human–hamster interspecific fertilization system (Pellestor *et al.*, 1987; Martin, 1988), while Owaga *et al.* (2000) microinjected mouse oocytes with human sperm. In these three cases, the number of metaphases studied was considered low to reach a definitive conclusion (78, 117 and 45, respectively). More recently, using fluorescence in-situ hybridization (FISH), Escudero *et al.* (2000), Frydman *et al.* (2001) and Morel *et al.* (2001) found a percentage of normal or balanced spermatozoa ranging from 73.6% to 91% (Table I) in eight carriers studied.

On the other hand, the possible occurrence of interchromosomal effects (ICE), affecting the normal disjunction of other chromosome pairs not involved in any reorganization, has been a classical topic of discussion since it was suggested by Lejeune (1963). Several studies, including a wide spectrum of chromosome reorganizations, have been carried out to assess

Table I. Results obtained in the previous segregation studies of 13;14 Robertsonian translocation carriers

Translocation	No. spermatozoa scored	Segregation mode (%)					Technique ^a	Reference
		Alternate			Adjacent	3:0 or diploid		
		Normal	Balanced	Total				
t(13;14)(p11;q11)	78	50	42.3	92.3	7.7	0	1	Pellestor <i>et al.</i> (1987)
t(13q;14q)	117	35.9	37.6	73.5	26.5	0	1	Martin (1988)
t(13q;14q)	45	37.77	53.33	91.1	8.9	0	2	Ogawa <i>et al.</i> (2000)
t(13q;14q)	1016			73.6	23.3	0.5	3	Escudero <i>et al.</i> (2000)
t(13q;14q)	1006			77.4	19.1	0.8		
t(13q;14q)	1045			91	9	–	3	Frydman <i>et al.</i> (2001)
t(13q;14q)	1023			90	10	–		
t(13q;14q)	1008			87.1	12.9	–		
t(13q;14q)	2984	38.21	43.13	81.34	18.06	0.6	3	Morel <i>et al.</i> (2001)
t(13q;14q)	1109	40.76	41.84	82.6	16.32	1.08		
t(13q;14q)	1009	44	44.9	88.9	10.08	0.3		

^aTechniques: 1, heterospecific fertilization; 2, sperm injection into mouse oocytes; 3, FISH.

ICE by FISHing decondensed sperm nuclei in inversion carriers (Colls *et al.*, 1997; Blanco *et al.*, 2000; Pellestor *et al.*, 2001; Anton *et al.*, 2002), reciprocal translocations carriers (Van Hummelen *et al.*, 1997; Blanco *et al.*, 1998b; 2000; Martini *et al.*, 1998; Cifuentes *et al.*, 1999; Honda *et al.*, 1999; Estop *et al.*, 2000; Vegetti *et al.*, 2000; Pellestor *et al.*, 2001; Oliver-Bonet *et al.*, 2002), and Robertsonian translocations (Rousseaux *et al.*, 1995; Blanco *et al.*, 2000; Morel *et al.*, 2001; Vegetti *et al.*, 2000; Baccetti *et al.*, 2002). Results supporting or rejecting ICE have been obtained, and arguments about the behaviour of each particular reorganization or even about interindividual differences reported.

Although the information obtained by collecting data from this diversity of chromosomal reorganizations is of interest, the selection of a representative number of each reorganization and the performance of the study in a single laboratory should allow one to reach more solid and homogeneous conclusions regarding the specific segregation behaviour of each structural reorganization and any possible ICE.

In this study, we used multicolour FISH on decondensed sperm nuclei to analyse the segregation of a t(13;14)(q10;q10) in seven male carriers, as well as the possible occurrence of ICE on chromosomes 18, 21, 22, X and Y.

Materials and methods

Patients

Seven unrelated males, carriers of the Robertsonian translocation 45,XY,der(13;14)(q10;q10), consulting for infertility were studied. The patients' age range was 30–37 years. In all cases abnormal seminal parameters were observed (World Health Organization, 1999) (Table II). The patients gave their written informed consent to participate in the study, and the protocol used was approved by our institutional ethics committee.

Semen sample processing

Sperm samples were fixed in methanol:acetic acid (3:1) and spread on a slide. Sperm nuclei were decondensed by slide incubation in 5 mmol/l dithiothreitol, as previously detailed by Vidal *et al.* (1993).

Table II. Characteristics of the seven t(13;14)(q10;q10) carriers analysed

Patient	Age (years)	Sperm count (spermatozoa/ml)	Global semen analysis
1	33	28 000	OAT
2	37	<100 000	OA
3	35	<100 000	OA
4	33	300 000	OAT
5	30	70 000	OAT
6	32	100 000	OAT
7	33	16.8 × 10 ⁶	OA

OAT = oligoasthenoteratozoospermia, OA = oligoasthenozoospermia.

FISH

A dual-colour FISH was used to determine the meiotic segregation of the chromosomes involved in the reorganization. A locus-specific probe for the 13q14 region (LSI 13, RB1, Spectrum Green; Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) plus a subtelomeric probe specific for the 14q region (TelVysion 14q, Spectrum Orange; Vysis Inc.) were used to identify all genotypes resulting from the different segregation modes.

In all patients, the occurrence of ICE for chromosomes 18, 21, 22 and for the sex chromosomes was also evaluated. Chromosomes 21 and 22 were assessed by dual-colour FISH using locus-specific probes for both chromosomes (LSI 21, 21q22.13-q22.2, Spectrum Orange/LSI 22, bcr, 22q11.2, Spectrum Green; Vysis Inc.) and a triple-colour FISH approach was used to analyse chromosomes 18, X and Y (CEP18, D18Z1, Spectrum Aqua/CEPX, DXZ1, Spectrum Green/CEPY, DYZ3, Spectrum Orange; Vysis Inc.).

The protocol for probes and sample denaturation, incubation and detection was as standardized in our laboratory in accordance to manufacturer's instructions (Vysis Inc.), and sperm nuclei were counterstained with DAPI II solution (Vysis Inc.).

Analyses were carried out using an Olympus BX60 epifluorescence microscope equipped with filter sets for FITC, Texas Red, Aqua and DAPI/Texas Red/FITC. Previously described standard assessment criteria were followed for evaluation of the sperm nuclei (Blanco *et al.*, 1996).

Data analysis

Control data for chromosomes 18, 21, 22, X and Y were derived from previously published results from our group (Blanco *et al.*, 1997;

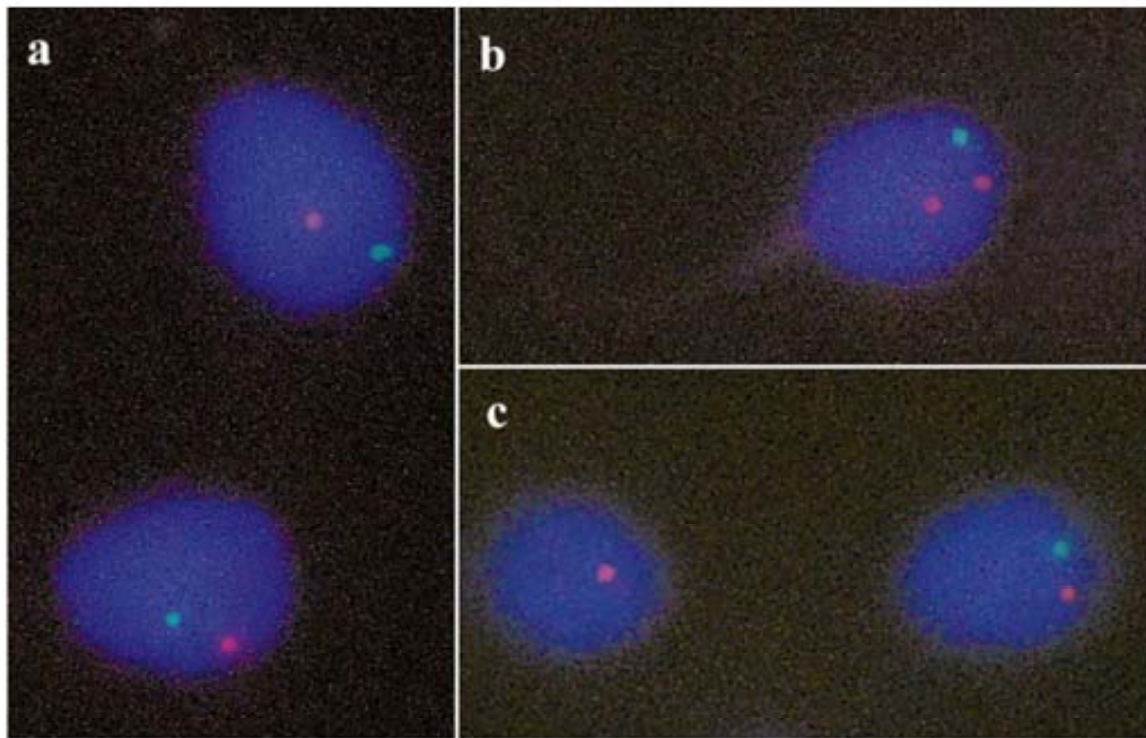


Figure 1. Dual FISH on decondensed sperm nuclei using locus-specific probes (13q14, green) and subtelomeric probes (14q, orange). (A) Normal spermatozoa. (B) Chromosome 14 disomic sperm. (C) Chromosome 13 nullisomic sperm (left) and normal sperm (right).

1998a; Soares *et al.*, 2001). Furthermore, data resulting from the analysis of sperm samples from five normozoospermic men (World Health Organization, 1999) with an age range of 21–25 years, integrated in the control population of our laboratory, were used to assess the efficiency of the probes for the 13q14 region and for the 14q subtelomeric region.

Data obtained were analysed statistically using SigmaStat 2.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) under the advice of the statistical service of the Universitat Autònoma de Barcelona. Differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$.

Results

Hybridization efficiency in sperm nuclei for the probes used in the evaluation of segregation was determined from data obtained from the five normozoospermic control donors. Percentages ranging from 97.99 to 99.44% corresponded to spermatozoa with one signal for each probe used (mean 98.66%) (Figure 1A). Disomy values for chromosome 13 ranged from 0 to 0.19% (mean 0.09%) and for chromosome 14 from 0 to 0.49% (mean 0.13%) (Figure 1B). The nullisomy rates for chromosome 13 ranged from 0.1 to 1.45% (mean 0.57%) (Figure 1C) and for chromosome 14 from 0 to 0.24% (mean 0.29%). A small percentage of diploid spermatozoa were also found with a mean average of 0.27%. The hybridization efficiency value obtained using a conservative approach (Blanco *et al.*, 1996) was 99.35%.

In Robertsonian translocation carriers, segregation analysis was ascertained in a total of 14 450 spermatozoa, ranging from 774 to 6128 cells evaluated per patient. Detailed FISH results are given in Table III.

In these patients, most spermatozoa resulted from a 2:1 alternate meiotic segregation, and the percentage of normal or balanced spermatozoa ranged from 83 to 88.23%. The proportion of unbalanced spermatozoa resulting from adjacent segregations accounted for 11.11 to 14.53% of the cells analysed. Taken as a group, all cases studied showed that the percentage rate of nullisomies for chromosomes 13 and 14 were statistically higher than the respective complementary disomies resulting from the adjacent segregation process ($P < 0.001$) (Table III). Individually, this difference was significant ($P < 0.05$) for chromosome 13 in patients 4, 5 and 6, and for chromosome 14 in patients 3 and 4 (Table III). No statistically significant differences ($P > 0.05$) were observed when comparing the percentages of disomies for chromosome 13 (2.46%) and for chromosome 14 (2.01%). The methodological approach used did not allow to differentiate between 3:0 segregations and diploid spermatozoa (both cases show two hybridization signals for the probes used). Unbalanced spermatozoa bearing this combination of signals accounted for 0–0.44% of the cells analysed. Spermatozoa with an unexpected combination of signals according to the theoretical segregations were classified as ‘other’, and corresponded to 0.52% of the total (range 0.08–2.27%) (Table III).

Table III. Segregation analysis results in the seven Robertsonian translocation carriers t(13;14)(q10;q10) analysed

Segregation mode	Chromosomal constitution	Signals	Patient no.							Total [n (%)]
			1 [n (%)]	2 [n (%)]	3 [n (%)]	4 [n (%)]	5 [n (%)]	6 [n (%)]	7 [n (%)]	
Alternate	13q/14q or der(13q;14q)	GO	1177 (86.48)	2538 (87.49)	840 (83)	847 (84.53)	1121 (88.13)	5407 (88.23)	679 (87.73)	12 609 (87.26)
Adjacent	13q/der(13q;14q)	GGO	39 (2.87)	86 (2.96)	12 (1.19)	25 (2.5) ^a	20 (1.57) ^a	145 (2.37) ^a	28 (3.62)	355 (2.46) ^a
	14q	O	55 (4.04)	122 (4.21)	31 (3.06)	62 (6.19) ^b	65 (5.11) ^b	267 (4.36) ^b	19 (2.45)	621 (4.30) ^b
	14q/der(13q;14q)	GOO	31 (2.28)	61 (2.10)	4 (0.4) ^c	10 (0.99) ^c	23 (1.81)	146 (2.38)	15 (1.94)	290 (2.01) ^c
	13q	G	46 (3.38)	84 (2.90)	100 (9.88) ^d	45 (4.49) ^d	37 (2.91)	123 (2.01)	28 (3.62)	463 (3.20) ^d
			171 (12.56)	353 (12.17)	147 (14.53)	142 (14.17)	145 (11.40)	681 (11.11)	90 (11.63)	1729 (11.97)
3:0 or diploid	13q/14q/der(13q;14q)	GGOO	6 (0.44)	0	2 (0.2)	2 (0.2)	5 (0.39)	19 (0.31)	3 (0.39)	37 (0.26)
Other			7 (0.51)	10 (0.34)	23 (2.27)	11 (1.1)	1 (0.08)	21 (0.34)	2 (0.26)	75 (0.52)
Total			1361	2901	1012	1002	1272	6128	774	14 450

^{a,b}Significant differences between rows ($P < 0.05$).^{c,d}Significant differences between rows ($P < 0.05$).

G = green signal.

O = orange signal.

Table IV. Results of ICE for chromosomes 21 and 22

Patient	Haploid [n (%)]	Disomy 21 [n (%)]	Disomy 22 [n (%)]	Diploidy [n (%)]	Other	Total
1	867 (98.52)	1 (0.11)	0	3 (0.34)	9 (1.02)	880
2	6172 (97.72)	6 (0.1)	6 (0.1)	3 (0.05)	116 (1.84)	6303
3	1476 (98.8)	1 (0.07)	1 (0.07)	1 (0.07)	15 (1)	1494
4	1770 (98.99)	1 (0.06)	3 (0.17)	9 (0.17)	5 (0.28)	1788
5	1597 (98.09)	5 (0.31)	3 (0.18)	5 (0.31)	18 (1.1)	1628
6	1173 (96.86)	8 (0.66)	1 (0.08)	6 (0.5)	21 (1.73)	1209
7	400 (93.24)	1 (0.23)	1 (0.23)	1 (0.23)	26 (6.06)	429
	13 455 (97.99)	23 (0.17)	15 (0.11)	28 (0.2)	210 (1.53)	13 731
Controls	–	91 (0.37) ^a	–	–	–	28 044 ^a
	–	–	57 (0.06) ^b	–	–	90 474 ^b

^aData obtained from Blanco *et al.* (1998a).^bData obtained from Soares *et al.* (2001).

A total of 24 993 spermatozoa were analysed to evaluate the occurrence of ICE. Table IV shows the results from the evaluation of chromosomes 21 and 22, and Table V shows those for chromosomes 18, X and Y. No statistical differences were noted in the aneuploidy rates of chromosomes 18, 21 and 22 compared with controls ($P > 0.05$) (Blanco *et al.*, 1997; 1998a; Soares *et al.*, 2001). Sex chromosome disomies were statistically higher in patients 3 and 6 (0.94 and 1.34%, respectively; $P < 0.001$) than in controls (0.37%) (Blanco *et al.*, 1997). The global results of the group studied reflected a significant increase (0.68%; $P < 0.001$) in the frequency of sex chromosome aneuploidies versus controls (Blanco *et al.*, 1997).

1348

FISH data from ICE studies were also used to evaluate the diploidy frequency. No statistical differences versus controls were noted ($P > 0.05$) (Blanco *et al.*, 1997). Furthermore, percentages of diploid sperm determined through the ICE study were equivalent ($P > 0.05$) to the percentage of spermatozoa scored as 3:0 or 2n (diploid) in the segregation analysis.

Discussion

Despite the high incidence of Robertsonian translocation 13;14 in humans, FISH on decondensed sperm nuclei has previously been carried out in only a low number of patients, and in different laboratories (Table I); therefore, data about the

Table V. Results of ICE for chromosomes 18, X and Y

Patient	Haploid [n (%)]	Sex chromosome disomy [n (%)]	Disomy 18 [n (%)]	Diploidy [n (%)]	Other [n (%)]	Total
1	1279 (99.23)	3 (0.23)	0	2 (0.15)	15 (1.15)	1299
2	1813 (98.48)	8 (0.44)	2 (0.11)	0	18 (0.98)	1841
3	2288 (93.77)	23 (0.94) ^a	3 (0.12)	3 (0.12)	123 (5.04)	2440
4	1063 (99.25)	2 (0.18)	0	2 (0.19)	4 (0.37)	1071
5	2071 (97.92)	10 (0.47)	1 (0.05)	11 (0.52)	22 (1.04)	2115
6	2173 (97.01)	30 (1.34) ^a	0	3 (0.13)	34 (1.52)	2240
7	254 (99.21)	1 (0.39)	0	0	1 (0.39)	256
	10 941 (97.15)	77 (0.68) ^a	6 (0.05)	21 (0.19)	217 (1.93)	11 262
Control ^b	50 210 (97.75)	188 (0.37)	48 (0.09)	126 (0.24)	796 (1.55)	51 368

^aSignificant differences versus control ($P < 0.05$).

^bData obtained from Blanco *et al.* (1997).

meiotic segregation and rates of unbalanced spermatozoa produced are not totally homogeneous and are still limited. To our knowledge this is the first study in which seven male carriers of the Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10) have been analysed, representing the largest population of patients studied so far in the same laboratory.

The general results obtained in this work with a predominance of normal/balanced spermatozoa are in good agreement with previously reported studies (Table I), and also with the well-known configuration preferentially adopted by the reorganized chromosomes in metaphase I favouring an alternate segregation (Sybenga, 1975).

Our data support the existence of a similar meiotic behaviour of the reorganized chromosomes in the seven males analysed, reflected in the small range of spermatozoa resulting from an alternate segregation (83–88.23%) and spermatozoa deriving from adjacent segregations (11.11–14.53%). The wider range (73.6–91%) reported from other laboratories analysing the same reorganization (Escudero *et al.*, 2000; Frydman *et al.*, 2001; Morel *et al.*, 2001) is probably related to technical aspects, such as the characteristics and the combination of the probes used (locus-specific, subtelomeric or whole-chromosome paints) and/or the particular scoring criteria established according the protocols used, rather than to inter-individual differences.

The expected 1:1 proportion in the percentage of disomic versus their complementary nullisomic spermatozoa deriving from adjacent segregations was not observed, and was even statistically different in patients 3, 4, 5 and 6. This discrepancy, also noted by other authors (Frydman *et al.*, 2001; Morel *et al.*, 2001; Honda *et al.*, 1999), could be related to different and not mutually exclusive causes.

(i) First of all, the unavoidable limitations of the FISH technique itself. Certainly, hybridization failures scored as nullisomies could probably be responsible for the observed unexpected combination of signals classified as 'others' (Table III). However, one would expect hybridization failures to randomly affect all combinations of signals evaluated and, taking into consideration that the combination of probes used had a hybridization efficiency of 99.36%, a total of only 0.64% of sperm coming from all groups would be affected by this fact.

Thus, it would not be accurate to attribute the discrepancies between the number of disomic versus their complementary nullisomic spermatozoa exclusively to hybridization failures.

(ii) The possible intervention of meiotic checkpoints should therefore also be considered. As is well known, any factor that delays anaphase (erratic chromosomes, lack of tension, etc.) may produce an arrest of the division cycle leading the cell into apoptosis, as described in male mice carriers of Robertsonian translocation (Eaker *et al.*, 2001). This fact could explain the oligozoospermia present in most carriers of chromosome reorganizations. However, if the cell is capable of completing the division process, the result may be the production of aneuploid or diploid spermatozoa. In these situations, as suggested by Honda *et al.* (1999), cell maturation arrest would be specially stronger against disomic cells, thus resulting in the observed increased proportion of nullisomies versus disomies.

As expected, and taking into consideration the similar size of the chromosomes involved in the reorganization and the theoretical number and location of chiasmata (Laurie and Hultén, 1985), no statistically significant differences were expected in the frequency of disomies for the chromosomes implicated in the reorganization.

As deduced from the data, spermatozoa classified as resulting from 3:0 segregations or as diploid in the segregation analysis must be considered to be 2n, thus confirming that 3:0 segregation rarely occurs, or results in a selective elimination as suggested by our data in Table III.

In the ICE evaluation, the data obtained did not provide any evidence of an ICE for chromosomes 18, 21 or 22. It is well known that some individuals with oligoasthenozoospermia or oligoasthenoteratozoospermia show an increased incidence of sex chromosome disomies. In fact, all seven patients had oligozoospermia, but only patients 3 and 6 showed this effect. It should be noted that in the case of patient 6, the incidence of sex chromosome disomies was higher than that expected in our oligoasthenoteratozoospermic population ($P < 0.05$) (Aran *et al.*, 1999). This fact could support the existence of an ICE on the sex chromosomes.

Previous to our report, two other papers investigating ICE showed an increased frequency of sex chromosome disomies in the spermatozoa of some of the t(13;14) carriers analysed

E.Anton *et al.*

(Vegetti *et al.*, 2000; Morel *et al.*, 2001). Taken together, these results support the occurrence of an ICE on the sex chromosomes in some cases of Robertsonian translocation. Classical meiotic studies and synaptonemal complex studies in Robertsonian translocation carriers have reported a non-random association at prophase I between the trivalent, via the short arm regions of the non-fused chromosomes (which also carry the nuclear organizer regions), and the sex chromosomes in several males analysed (Luciani *et al.*, 1984; Navarro *et al.*, 1991). These reports have also described the presence of prophases with several partially asynaptic bivalents, an anomaly also detected in male mice carriers of Robertsonian translocations (Grao *et al.*, 1989).

Thus, the possible interference of the heterosynapsis (which are a rescue mechanism when anaphase is arrested; Saadallah and Hultén, 1986) with the normal segregation of the XY bivalent could explain the increase of XY disomies observed. Moreover, asynaptic bivalents could induce the malsegregation of other chromosome pairs, not detected by the probes used. Furthermore, the inter-individual variations observed among the carriers studied could be related to specific characteristics of the rearranged chromosomes, for instance the well-known satellite polymorphisms (α -satellite heteromorphism) common in acrocentric chromosomes.

It is of note that carriers of Robertsonian translocations, while producing a high proportion of normal or balanced sperm, also produce very high proportion of abnormal embryos (ESHRE PGD Consortium Steering Committee, 2002; Sermon, 2002). Furthermore, reduced pregnancy rates have been observed in translocation carriers enrolled in preimplantational genetic diagnosis cycles (ESHRE PGD Consortium Steering Committee, 2002) and have been suggested to be linked to cytogenetic abnormalities affecting chromosome pairs that are not routinely analysed in these patients, as has been recently shown in female carriers of Robertsonian translocation 13;14 (Pujol *et al.*, 2003). Whether this could be related to the abnormal segregation of other chromosome pairs (ICE) or to other factors still deserves further investigation, because it is a crucial factor in the reproductive future of these patients.

In conclusion, our results indicate that t(13;14) carriers have an homogeneous segregation pattern with a clearly preferential alternate segregation. However, it should be taken into consideration that certain variability among patients was observed and that the data presented demonstrate that in some carriers the trivalent could interfere with the normal segregation of the sex chromosomes. It would be interesting to follow-up these studies in an ever larger series of Robertsonian translocation carriers for the same reorganization, focusing on the segregation analysis but also on the occurrence of ICE, to shed more light on the meiotic behaviour in these individuals, and its final outcome in the spermatozoa produced.

Acknowledgements

We thank the Servei de Medicina de la Reproducció de l'Institut Universitari Dexeus (Barcelona), Instituto de Reproduccion Asistida CEFER (Barcelona), Instituto Valenciano de Infertilidad (Valencia), Clínica Tambre (Madrid) and Hospital Clínic de Barcelona (Barcelona) for providing the semen samples of the patients studied.

This work was supported by Ministerio de Educación y Cultura (DGESEIC; project no. PM98-0174), Ministerio de Ciencia y Tecnología (DGI; project no. SAF2003-04312) and by a FI/FIAP grant (2001FI/00457) from Direcció General de Recerca (Generalitat de Catalunya, Spain).

References

- Anton E, Blanco J, Egozcue J and Vidal F (2002) Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion inv(6)(p23q25) carrier using FISH on decondensed sperm nuclei. *Cytogenet Genome Res* 97,149–154.
- Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, Egozcue J and 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.
- Baccetti B, Capitani S, Collodel G, Estenoz M, Gambera L and Piomboni P (2002) Infertile spermatozoa in a human carrier of Robertsonian translocation 14;22. *Fertil Steril* 78,1127–1130.
- Blanco J, Egozcue J and 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, Simon C, Egozcue J and 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 and Vidal F (1998a) Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in population with high prevalence of Down syndrome: increased incidence in cases of paternal origin. *Am J Hum Genet* 63,1067–1072.
- Blanco J, Egozcue J, Clusellas N and Vidal F (1998b) FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregational 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 and Vidal F (2000) Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 106,500–505.
- Cifuentes P, Navarro J, Blanco J, Vidal F, Míguez L, Egozcue J and Benet J (1999) Cytogenetic analysis 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 and 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.
- DeBraekeleer M and Dao T-N (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6,245–250.
- Eaker S, Pyle A, Cobb J and Handel MA (2001) Evidence of meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci* 114,2953–2965.
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F and Egozcue J (2000) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 6,93–105.
- Escudero T, Lee M, Carrel D, Blanco J and Munné S (2000) Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,X,Y,t(13;14)(q10;q10) carriers. *Prenat Diagn* 20,599–602.
- ESHRE PGD Consortium Steering Committee (2002) ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Hum Reprod* 17,233–246.
- Estop AM, Cieply K, Munne S, Surti U, Wakin A and Feingold E (2000) Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? Sperm FISH studies. *Hum Genet* 106,517–524.
- Frydman N, Romana S, Le Lor'h M, Vekemans M, Frydman R and Tachdjian G (2001) Assisting reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation. *Hum Reprod* 16,2274–2277.
- Grao P, Coll MD, Ponsa M and Egozcue J (1989) Trivalent behavior during prophase I in male mice heterozygous for three Robertsonian translocations: an electron-microscopic study. *Cytogenet Cell Genet* 52,105–110.
- Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Honda N, Hara T and Ohama K (1999) Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation

Segregation of Robertsonian translocations

- carriers, t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triple-color fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 105,428–436.
- Laurie DA and 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.
- Luciani JM, Guichaoua MR, Mattei A, Morazzani MR (1984) Pachytene analysis of a man with a 13q:14q translocation and infertility. *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.
- Martini E, Von Bergh ARM, Coonen E, Die-Smulders CEM, Ramaekers FCS and Geraedts JPM (1998) 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.
- Morel F, Roux C and Bresson JL (2001) FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype. *Mol Hum Reprod* 7,483–488.
- Navarro J, Vidal F, Benet J, Templado C, Marina S and 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.
- Nielsen J and Wohlert M (1991) Chromosome abnormalities found among 34910 newborn children: results from 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet* 87,81–83.
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Carrera M, Egozcue J and Benet J (2002) Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Mol Hum Reprod* 8,958–963.
- Owaga S, Araki S, Araki Y, Ohono M and Sato I (2000) Chromosome analysis of human spermatozoa from an oligoasthenozoospermic carrier for a 13;14 Robertsonian translocation by their injection into mouse oocytes. *Hum Reprod* 15,1136–1139.
- Pandiyan N and Jequier AM (1996) Mitotic chromosomal anomalies among 1210 infertile men. *Hum Reprod* 11,2604–2608.
- Pellestor F, Sèle B and Jalbert H (1987) Chromosome analysis of spermatozoa from a male heterozygous for a 13;14 Robertsonian translocation. *Hum Genet* 76,116–120.
- Pellestor F, Imbert I, Andréo B and Lefort G (2001) Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization and primed in-situ labelling techniques. *Hum Reprod* 16,1155–1164.
- Pujol A, Durban M, Benet J, Boiso I, Calafell JM, Egozcue J and Navarro J (2003) Multiple aneuploidies in the oocytes of balanced translocation carriers: a preimplantation genetic diagnosis study using first polar body. *Reproduction* 126,701–711.
- Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Delafontaine D and 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.
- Saadallah N and Hultén M (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.
- Sermon K (2002) Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. *Hum Reprod Update* 8,11–20.
- Shaffer LG, Jackson-Cook CK, Stasiowski BA, Spence JE and Brown JA (1992) Parental origin determination in thirty de novo Robertsonian translocations. *Am J Med Genet* 43,957–963.
- Soares SR, Templado C, Blanco J, Egozcue J and Vidal F (2001) Numerical chromosome abnormalities in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 of paternal origin: generalised tendency to meiotic non-disjunction. *Hum Genet* 108,134–139.
- Sybenga J (1975) Chromosome structural variants. In J.Sybenga (ed) *General Cytogenetics*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands, pp. 165–212.
- VanHummelen P, Manchester D, Lowe X and 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.
- Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I and Van Steirteghem A (2000) Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 15,351–365.
- Vidal F, Templado C, Navarro J, Marina S and Egozcue J (1982) Meiotic and synaptonemal complexes studies in a 14/21 translocation carrier. *Int J Androl* 5,21–26.
- Vidal F, Moragas M, Català V, Torelló MJ, Santaló J, Calderón G, Giménez C, Barri PN, Egozcue J and 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.
- World Health Organization (1999) *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. 4th edn, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Submitted on February 12, 2004; accepted on February 22, 2004

TREBALL 2

Preferential alternate segregation in the common t(11;22)(q23;q11) reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers.

RBM-Online 9(6):637-644

ANTON Ester, VIDAL Francesca, EGOZCUE Josep, BLANCO Joan

2004

Article

Preferential alternate segregation in the common t(11;22)(q23;q11) reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers



Bachelor in Biological Science since 2000, Ester Anton is a member of the Unitat de Biologia Cel·lular of the Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, where she is writing her thesis under the direction of Drs J Blanco and F Vidal. Her particular research is focused on the detection of the incidence and origin of chromosome abnormalities in human spermatogenesis in high-risk populations, and their implications for male infertility. In the last 3 years she has published some meiotic segregation and ICE studies on reciprocal and Robertsonian translocation and inversion carriers.

Ester Anton

Ester Anton, Francesca Vidal, Josep Egozcue, Joan Blanco¹
Unitat de Biologia Cel·lular, Edifici C (Facultat de Ciències), Universitat Autònoma de Barcelona. 08193, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Spain

¹Correspondence: Tel: +34 93 5812781; Fax: +34 93 5812295; e-mail: joan.blanco@uab.es

Abstract

Segregation behaviour studies in t(11;22) carriers have reported controversial results. Whereas some authors have detected a preponderance of 3:1 products, no evidence of such prevalence was found by others. This study reports a fluorescence in-situ hybridization (FISH) segregation analysis on decondensed spermatozoa in two brothers, carriers of the same t(11;22)(q23;q11) rearrangement. Data revealed a similar meiotic segregation pattern in both carriers, 2:2 Alternate segregation being the most frequent (42.94 and 45%), while 3:1 genotypes were the least frequent in both patients, with percentages around 10%. The production of three chiasmata, based on the presence of G-light bands along the translocated segments and the presence of recombination sites at 11q and 22q distal regions, are proposed as the cause of a preponderance of the Alternate segregation. Interchromosomal effects involving chromosomes 13, 18, 21, X and Y were also evaluated. An increased frequency of sex chromosome disomies was detected in one patient. Reviewing the literature, a relationship between this phenomenon and the involvement of acrocentric chromosomes in the reorganization is suggested. FISH segregation and interchromosomal effects studies in spermatozoa are encouraged to gather information to establish the best approach for preimplantational genetic diagnosis in reorganization carriers.

Keywords: FISH, interchromosomal effects, reciprocal translocation, segregation analysis, spermatozoa

Introduction

Reciprocal translocations have a high incidence on the general human population (0.14%; Nielsen and Wohler, 1991). As a result of the combination of different chromosomes and breakpoints, most of them have only been observed once. t(11;22) is the most frequent, with preferential breakpoints at 11q23 and 22q11 (Boué and Gallano, 1984). Its recurrence is widely recognized (Aurias *et al.*, 1978; Boué and Gallano, 1984; Daniel *et al.*, 1989; Youings *et al.*, 2004) and has been associated to the presence of palindromic AT-rich repeats in the affected breakpoints promoting instability (Kurahashi *et al.*, 2000).

Heterozygous carriers produce a certain percentage of chromosomal unbalanced gametes as a result of different

modes of segregation, which can lead to recurrent abortion or produce offspring with an abnormal karyotype (Fraccaro *et al.*, 1980; Iselius *et al.*, 1983; Lockwood *et al.*, 1989; Simi *et al.*, 1992; Tachdjian *et al.*, 1992; Soler *et al.*, 1993; Petkovic *et al.*, 1996; Shaikh *et al.*, 1999).

Chromosome segregation of translocation carriers can be inferred from gamete analysis through techniques such as chromosome studies after fertilization of zona pellucida-free hamster eggs or, more recently, by fluorescence in-situ hybridization (FISH). A preferential alternate segregation has been described both in Robertsonian (Rousseaux *et al.*, 1995a; Escudero *et al.*, 2000; Frydman *et al.*, 2001; Morel *et al.*, 2001a; Baccetti *et al.*, 2002; Anton *et al.*, 2004) and reciprocal translocation carriers (Rousseaux *et al.*, 1995b; Van Hummelen *et al.*, 1997; Blanco *et al.*, 1998a, 2000; Estop *et*

al., 1998, 2000; Martini *et al.*, 1998; Cifuentes *et al.*, 1999; Giltay *et al.*, 1999; Honda *et al.*, 1999; Rives *et al.*, 2003; Morel *et al.*, 2004), producing a majority of normal or balanced gametes.

However, in t(11;22) controversial segregation results have been described since the very early studies undertaken. Whereas Martin *et al.* (1984) reported similar frequencies of the different segregation modes through the analysis of sperm chromosomes, Estop *et al.* (1999) and Van Assche *et al.* (1999) found a preponderance of 3:1 genotypes by FISH (40.1 and 34.6% respectively). A meiotic study in testicular material from a t(11;22) translocation carrier (Armstrong *et al.*, 2000) did not find any evidence of a preferential 3:1 anaphase I segregation. These authors suggested that the observed high frequency of 3:1 unbalanced offspring was the consequence of a post-zygotic selection against other unbalanced products rather than a preferential 3:1 meiotic disjunction.

Although interindividual differences could in part explain the discrepancy among authors, other possibilities related to methodological analysis (DNA probes used, assessment criteria, sample size) cannot be ruled out.

On the other hand, there is a lack of information about possible epigenetic effects in the meiotic behaviour of chromosomal reorganizations. The small number of papers reporting segregation analysis in several family-related carriers of the same reorganization (Estop *et al.*, 1992; Rousseaux *et al.*, 1995b; Çora *et al.*, 2002; Morel *et al.*, 2004) and the difficulty of finding the same reorganization in non-family-related carriers are the cause of the scarce information available.

Finally, the concept of interchromosomal effects (ICE), that is, the association between a balanced translocation and increases in chromosome aneuploidy for chromosomes not involved in the translocation is a matter of debate and certainly far more controversial. Several authors have carried out epidemiological studies to detect the possible existence of ICE in different types of chromosomal reorganizations such as reciprocal translocation (Aurias *et al.*, 1978; Lindenbaum *et al.*, 1985; Couzin *et al.*, 1987), Robertsonian translocation (Mikkelsen, 1971) or inversions (Serra *et al.*, 1990). 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.

To shed more light on these subjects, a multicolour segregation FISH analysis was performed on decondensed sperm nuclei in two brothers, carriers of a t(11;22)(q23;q11) reciprocal translocation. The occurrence of a possible interchromosomal effect (ICE) involving chromosomes 13, 18, 21, X and Y has been also analysed, with the aim of contributing more data about this much-discussed phenomenon.

Materials and methods

Semen samples were obtained from two brothers, carriers of the same 46,XY,t(11;22)(q23;q11) reorganization (Figure 1). They were 34 and 35 years old and had normal seminal parameters (World Health Organization, 1999).

The patients were enrolled to participate in this study after consulting for infertility. The protocol was approved by the institutional Ethics Committee and the patients gave their informed consent in writing.

FISH

Samples were fixed in methanol:acetic acid (3v:1v) and processed for FISH analysis. Sperm chromatin was decondensed by slide incubation in a 5 mmol/l dithiothreitol (DTT) and 1% Triton X-100 solution. Details of sperm fixation, nuclear decondensation and FISH processing of the sample have been described previously (Vidal *et al.*, 1993).

Chromosome content and segregation patterns were inferred from FISH-signal evaluation after triple-colour FISH using a locus-specific probe for chromosome 22 (LSI 22, bcr, 22q13.1, Spectrum Green; Vysis Inc.; Downers Grove, IL, USA), a subtelomeric probe specific for the 11q region (TelVysion 11q, Spectrum Orange; Vysis) and a centromeric probe for chromosome 11 (CEP 11, Spectrum Aqua; Vysis). Probe hybridization efficiency, obtained through the analysis of 5366 lymphocytes from two control donors, was 99.97, 99.93 and 98.92% for probes LSI 22, Tel 11q and CEP 11 respectively.

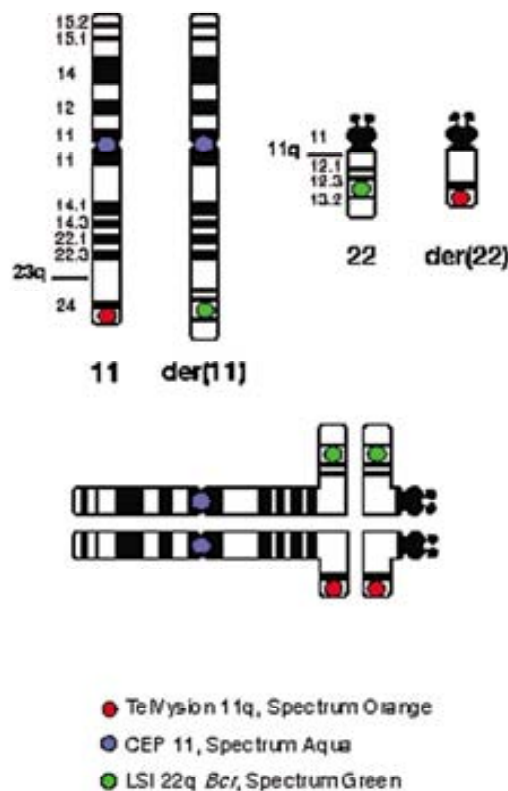


Figure 1. Idiograms of the chromosomes (upper part) and tetraivalent configuration (lower part) of the t(11;22)(q23;q11). Details about DNA probes are also indicated.

As shown in **Figure 1**, the four chromosomes involved in the translocation displayed a different combination of signals allowing the identification of the segregation products. Spermatozoa containing the normal or the balanced chromosomes could not be distinguished. Moreover, any recombination event in the interstitial segment between the centromere and the translocation breakpoint makes it impossible to discriminate between alternate and ADJACENT I products. Nevertheless, these crossovers would result in equal numbers of converted gametes in the alternate and Adjacent I genotypes.

The occurrence of ICE for chromosomes 13, 18, 21, X and Y was also evaluated. Chromosomes 13 and 21 were assessed by dual-colour FISH using locus-specific probes (LSI 13, 13q14, Spectrum Green and LSI 21, 21q22.13-q22.2, Spectrum Orange; Vysis). A triple-colour FISH approach using centromeric DNA probes was applied to analyse chromosomes 18, X and Y (CEP18, D18Z1, Spectrum Aqua; CEPX, DXZ1, Spectrum Green and CEPY, DYZ3, Spectrum Orange; Vysis).

For both hybridizations, the protocol for probes and sample denaturation, incubation and detection was as standardized in the laboratory in accordance to the manufacturer's instructions (Vysis).

Signal and data analysis

Analyses were carried out using an Olympus BX60 epifluorescence microscope equipped with filter sets for FITC, Texas Red, Aqua and DAPI/Texas Red/FITC. Standard assessment criteria, previously described by Blanco *et al.* (1996), were followed for the evaluation of the sperm nuclei.

The number of scored cells was established under the advice of the Statistical Service of the Universitat Autònoma de Barcelona. A minimum of 3500 and 10,000 spermatozoa per patient were evaluated in segregation and in ICE studies respectively.

Data obtained were analysed using SigmaStat 2.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA) and differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$.

Results

In the segregation analysis, a total of 3596 and 4058 spermatozoa were evaluated for patient 1 (P1) and patient 2 (P2) respectively (**Table 1**). In both cases, a preferential alternate segregation mode was observed (42.94 and 45.00%). Adjacent I products were the second more frequent genotypes (33.34 and 29.84%), followed by Adjacent II (13.18

Table 1. Segregation analysis results.

Segregation	Chromosome constitution	Signals ^a	P1 [n (%)]	P2 [n (%)]	
2:2 Alternate	n				
		1,3,2	1544 (42.94)	1826 (45.00)	
2:2 Adjacent I	n,-11,-22,+der(11),+der(22)	3,3,2	589 (16.38)	602 (14.83)	
	n,-11,+der(11)		610 (16.96)	609 (15.00)	
	n,-22,+der(22)	1,1,2			
Sub-total			1199 (33.34) ^b	1211 (29.84) ^b	
2:2 Adjacent II	n,-11,+der(22)	1,3	247 (6.87)	361 (8.90)	
	n,-22,+der(11)	1,3,2,2	113 (3.14)	138 (3.40)	
	n,-11,+22 ^f	3,3	35 (0.97)	50 (1.23)	
	n,-11,-22,+der(22),+der(22) ^f	1,1	20 (0.56)	44 (1.08)	
	n,-22,+11 ^f	1,1,2,2	34 (0.95)	34 (0.84)	
	n,-11,-22,+der(11),+der(11) ^f	3,3,2,2	25 (0.69)	20 (0.49)	
	Sub-total			474 (13.18) ^c	647 (15.94) ^d
	3:1	n,+der(22)	1,1,3,2	23 (0.64)	14 (0.34)
n,-11,-22,+der(11)		2,3	116 (3.22)	101 (2.49)	
n,+der(11)		1,3,3,2,2	2 (0.05)	3 (0.07)	
n,-11,-22,+der(22)		1	20 (0.56)	31 (0.76)	
n,-22,+der(11),+der(22)		1,1,3,2,2	0	3 (0.07)	
n,-11		3	24 (0.67)	23 (0.57)	
n,-11,+der(11),+der(22)		1,3,3,2	28 (0.78)	28 (0.69)	
n,-22		2,1	139 (3.87)	145 (3.57)	
Sub-total				352 (9.79)	348 (8.57)
4:0 or Diploid	2n	1,1,3,3,2,2	5 (0.14)	6 (0.15)	
Other			22 (0.61)	20 (0.49)	
Total no. spermatozoa			3596	4058	

^{a/b, c/d} Statistical differences between individuals ($P < 0.05$).

^e1, 2, 3: these numbers correspond to the colored markers in Figure 1 – red, blue, green respectively, i.e. TelVysion 11q-Spectrum Orange (1, red); CEP 11, Spectrum Aqua (2, blue); LSI 22q Br, Spectrum Green (3, green).

^fChromosome complements resulting from the presence of interstitial chiasmata.

Table 2. Interchromosomal effect (ICE) results.

Chromosomal constitution	P1 [n (%)]	P2 [n (%)]	Control ^b [n (%)]
Sex chromosome disomy	21 (0.14)	61 (0.60) ^a	188 (0.37)
Disomy 18	4 (0.03)	11 (0.11)	48 (0.09)
Diploidy	28 (0.19)	10 (0.10)	126 (0.24)
Total spermatozoa analysed (n)	15 043		10 222
Disomy 13	20 (0.13)	7 (0.07)	93 (0.10)
Disomy 21	9 (0.06)	8 (0.08)	91 (0.37)
Diploidy	43 (0.30)	3 (0.03)	126 (0.24)
Total spermatozoa analysed (n)	14 875		10 193

^aSignificant difference versus control ($P < 0.05$; Blanco *et al.* 1997).

^bData obtained from Blanco *et al.* (1997) (disomy 18, sex chromosomes disomy and diploidy), Blanco *et al.* (1998b) (disomy 21) and Soares *et al.* (2001) (disomy 13).

and 15.94%). 3:1 was the least frequent segregation in both patients, with percentages close to 10%.

As a consequence of the methodological approach, 4:0 segregation and diploid spermatozoa were indistinguishable (two hybridization signals for every single probe; **Table 1**). Unbalanced spermatozoa bearing this combination of signals represented 0.14% for P1 and 0.15% for P2.

In both patients, complementary products were significantly different ($P < 0.05$) for Adjacent II (without the presence of interstitial chiasmata) and 3:1 segregation modes. In these groups, partial nullisomies were observed more frequently than their complementary genotype (**Table 1**).

In spite of the apparent similarity in the segregation pattern in both patients (**Table 1**), statistically significant differences were observed in the whole inter-individual comparison ($P = 0.001$) due to the significant differences noted in Adjacent I and II products.

To evaluate the possible occurrence of ICE, a total of 29,918 spermatozoa in P1 and 20,415 spermatozoa in P2 were analysed (**Table 2**). No increase of disomies for autosomes 13, 18, 21 and diploidy was found, compared with controls (**Table 2**). A positive ICE for the sex chromosomes ($P < 0.05$) was observed in P2 (**Table 2**).

Diploidy rates found in the ICE studies were compared with the percentages of spermatozoa scored as diploid/4:0 in the segregation study and no significant differences were observed.

Discussion

Segregation pattern

A preferential production of normal or balanced gametes was observed in both brothers, indicating a predominant 2:2 Alternate meiotic segregation. These results are equivalent to the segregation pattern distribution found in most reciprocal translocations (reviewed by Shi and Martin, 2001) but disagree with the two previously published sperm FISH studies undertaken in t(11;22) carriers, where a prevalent 3:1 segregation was reported (Estop *et al.*, 1999; Van Assche *et al.*, 1999). This discrepancy could be explained by two non-

mutually exclusive causes. First, there is a technical aspect related to the fact that a high percentage of 3:1 products mainly corresponded to partial nullisomies (35.17% in Estop's study and 31% in Van Assche's study). Although a negative selection against partial disomies could explain these results, as has been suggested (Honda *et al.*, 2000; Anton *et al.*, 2004), the high percentage of nullisomies could also include a pool of combinations of signals generated by hybridization failures or overlapped spots. The second factor is related to the breakpoints involved in the reorganization: whereas the breakpoints involved in the t(11;22) studied by Estop *et al.* (1999) had the same breakpoints as ours, the breakpoints of the translocation studied by Van Assche *et al.* (1999) were different, producing a quadrivalent with a much shorter 11q translocated segment than the one shown in **Figure 1**. This configuration could have remarkably different meiotic implications (see below).

More recently, a meiotic study carried out on testicular material from a t(11;22)(q23;q11) carrier (Armstrong *et al.*, 2000), combining synaptonemal complex analysis and the evaluation of chromosome pairing and chromosome segregation in spermatocytes by FISH, reported no evidence of a preferential 3:1 segregation. Although some of the meiosis II configurations could be attributed to either Alternate or Adjacent I segregation, and it was not possible to determine the exact percentage of each segregation mode, the study provided an estimated production of 38.52% normal/balanced gametes, which is mostly consistent with the present findings.

It has become generally accepted that a chiasma formation failure within the short 22q segment (Korduru and Chaganti, 1989) would be responsible for a preferential 3:1 first meiotic segregation in t(11;22) carriers. Going more deeply into t(11;22) cytogenetic characteristics, the presence of large G-light bands along the translocated segments (**Figure 1**) should favour the presence of chiasmata (Ashley, 1988), thus assisting proper chromosome disjunction. The presence of at least one chiasma in the 11q and the 22q arms would be supported by studies of chiasma distribution in human diakinesis/metaphase I cells, as described by Laurie and Hultén (1985). Moreover, by combining immunofluorescence and multi-colour FISH techniques, Sun *et al.* (2004) have recently demonstrated a prevalent distribution of recombination sites at the 11q and 22q distal regions, within the estimated chromosomal segments translocated in t(11;22)

carriers (15% for chromosome 11 and 60% for chromosome 22). Although chiasma formation in the non-translocated segment of chromosome 22 would not be expected (it is a small heterochromatic region; **Figure 1**), the production of at least one chiasma in each of the other tetravalent arms would be quite possible, leading to the formation of zigzag-chain configuration. As a result, in both cases the four chromosomes would be kept together and a balanced orientation of the centromeres would favour a 2:2 segregation.

In fact, a similar meiotic mechanism could be responsible for the high percentage of 3:1 genotypes described by Van Assche *et al.* (1999); chiasma formation would rarely occur within the very short 11q translocated segment and the 22 interstitial segment. Thus, the presence of only two chiasmata in their tetravalent would result in the formation of a trivalent plus a univalent (Sybenga, 1975) and, in consequence, 3:1 segregation would be favoured.

Meiotic segregation outcome in the offspring

Several studies have reported a high percentage of unbalanced live-born offspring with partial trisomies of chromosome 22 from t(11;22) carriers (Fraccaro *et al.*, 1980; Iselius *et al.*, 1983; Stene and Stengel-Rutkowski, 1988; Shaikh *et al.*, 1999). The results argue in favour of a negative selection against other unbalanced genotypes that could be more related to the high frequency of these genotypes rather than a preferential 3:1 segregation. In fact, data obtained from pre-implantation genetic diagnosis (PGD) on embryos from t(11;22) male carriers (Van Assche *et al.*, 1999; Munné *et al.*, 2000; Mackie Ogilvie and Scriven, 2002; Vidal *et al.*, unpublished data) revealed a major percentage of normal/balanced embryos (47.9%). Even more, among unbalanced diagnosed embryos, genotypes from 3:1 segregations were not preponderant.

Interchromosomal effect

An increased frequency of sex chromosome disomies was found in P2. Although the presence of a positive ICE has been related to characteristics of every single reorganization (chromosomes involved and translocated segment size), discrepant results have been described in carriers of the same reorganization. A study of seven t(13;14)(q10;q10) Robertsonian translocation carriers revealed a positive ICE for sex chromosomes in only two of them (Anton *et al.*, 2004). Morel *et al.* (2004) evaluated a possible ICE in two brothers, carriers of the same t(7;8)(q11.21;cen) reciprocal translocation, and found an increased frequency of Y disomies in only one brother.

For a long time, ICE has been related to the presence of heterochromatic regions (NOR sequences) in acrocentric chromosomes (Stahl *et al.*, 1975). This hypothesis is supported by the strong tendency of heterochromatic regions to stick together (Schmid *et al.*, 1983) or pair with other unpaired regions through heterosynapsis (Guichaoua *et al.*, 1991). These regions are usually involved in several human polymorphisms. In translocation carriers, the non-translocated acrocentric chromosomes (22 in the present case) could be different with regard to the possible presence of a

polymorphism in the short arms (even in family-related carriers there is a 50% chance of having a different parental origin). Whether these differences could interfere in the segregation of other chromosome pairs is still an unsolved question.

Interestingly, there seems to be a correlation between acrocentric chromosomes and interchromosomal effects. Reviewing the published results, it is noticeable that the occurrence of a positive ICE is higher in reciprocal translocation carriers when at least one of the translocated chromosomes is acrocentric (four of eight cases; 50%) (Rousseaux *et al.*, 1995b; Giltay *et al.*, 1999; Blanco *et al.*, 2000; Estop *et al.*, 2000; Morel *et al.*, 2001b; Oliver-Bonet *et al.*, 2002; Baccetti *et al.*, 2003) than in non-acrocentric reciprocal translocation carriers (seven of 21 cases; 33.33%) (Lu *et al.*, 1994; Rousseaux *et al.*, 1995b; Van Hummelen *et al.*, 1997; Blanco *et al.*, 1998a; Martini *et al.*, 1998; Cifuentes *et al.*, 1999; Honda *et al.*, 1999; Estop *et al.*, 2000; Oliver-Bonet *et al.*, 2001, 2002; Rives *et al.*, 2003; Morel *et al.*, 2004). In fact, ICE is also very frequent in Robertsonian translocations where both chromosomes implicated are always acrocentric (five of 13 cases; 38.46%) (Rousseaux *et al.*, 1995a; Blanco *et al.*, 2000; Morel *et al.*, 2001a; Acar *et al.*, 2002; Anton *et al.*, 2004).

In this sense, sex chromosome segregation is considered one of the most susceptible to be affected by unrelated chromosomal reorganizations, due to the presence of unpaired non-homologous regions at pachytene (Vidal *et al.*, 1982; Luciani *et al.*, 1984; Gabriel-Robez *et al.*, 1986; Johannisson *et al.*, 1987). Several papers have previously described an increased frequency of sex chromosome disomies associated with the presence of reciprocal translocations (Oliver-Bonet *et al.*, 2001, 2002; Morel *et al.*, 2004), Robertsonian translocations (Morel *et al.*, 2001a; Anton *et al.*, 2004) and inversions (Amiel *et al.*, 2001), but it should be noted that sex chromosomes are not the only ones affected by ICE (Rousseaux *et al.*, 1995a, 1995b; Mercier *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 2000, 2003; Morel *et al.*, 2001a,b; Amiel *et al.*, 2001; Oliver-Bonet *et al.*, 2001, 2002; Baccetti *et al.*, 2003; Morel *et al.*, 2004).

Finally, evaluating the segregation profiles in these two patients, the similar segregation pattern displayed becomes evident. Significant differences indicated through the statistical analysis are mostly attributable to the high resolution power of the study performed.

Similar segregation profiles have also been reported by other authors analysing family-related translocation carriers (Estop *et al.*, 1992; Rousseaux *et al.*, 1995b; Çora *et al.*, 2002; Morel *et al.*, 2004). Although it is still an open question whether epigenetic factors could affect the meiotic process, it seems clear that the chromosomes and breakpoints implicated in a given reorganization are critical in determining some features of the meiotic behaviour of the reorganization. These features could also predispose for a positive ICE, but they would not be decisive, and individual characteristics might interfere (e.g. heterochromatic DNA sequences in acrocentric chromosomes). Therefore, the number of abnormal gametes for chromosomes unrelated to the reorganization itself could represent a substantial percentage in these individuals. This

fact could explain, in part, the lower-than-expected pregnancy rates obtained in PGD cycles from reciprocal translocation carriers (ESHRE PGD Consortium Steering Committee, 2002; Findikli *et al.*, 2003) and the incorporation of screening of aneuploidies for chromosomes unrelated to the reorganization in PGD cycles in affected couples (Gianaroli *et al.*, 2002). Although after a PGD cycle prenatal diagnosis is usually recommended, PGD could allow accurate selection of chromosomally normal embryos reducing significantly the chance of miscarriage or affected fetuses (Kuliev and Verlinsky, 2002). It seems advisable that preliminary sperm-FISH screening studies (segregation and interchromosomal effects evaluation) should also be incorporated in couples oriented to PGD, to gather information addressed to establish the best diagnostic approach.

At the risk of repetition, it is considered that further studies analysing the correlation between chromosome rearrangements, chromosomally abnormal spermatozoa produced, ICE and the resulting incidence of specific chromosome abnormalities in PGD-derived embryos should be addressed and encouraged.

Acknowledgements

This work was funded by the project SAF2003-04312 (DGI, Ministerio de Ciencia y Tecnología). EA is a recipient of a FI/FIAP grant (2001FI/00457, Direcció General de Recerca de la Generalitat de Catalunya, Spain). The authors thank Dr JM Calafell (Unitat de Reproducció Assistida, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona) for providing the semen samples.

References

- Acar H, Yildirim MS, Çora T *et al.* 2002 Evaluation of segregation patterns of 21;21 Robertsonian translocation along with sex chromosomes and interchromosomal effects in sperm nuclei of carrier by FISH technique. *Molecular Reproduction and Development* **63**, 232-236.
- Amiel A, Sardos-Albertini F, Feijgin MD 2001 Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv9) and C-heterochromatin. *Journal of Human Genetics* **46**, 245-250.
- Anton E, Blanco J, Egozcue J *et al.* 2004 Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Human Reproduction* **19**, 1345-1351.
- Armstrong SJ, Goldman ASH, Speed RM *et al.* 2000 Meiotic studies of the common translocation, t(11;22), suggest postzygotic selection rather than preferential 3:1 MI segregation as the cause of liveborn offspring with unbalanced translocation. *American Journal of Human Genetics* **67**, 601-609.
- Ashley T 1988 G-band position effects on meiotic synapsis and crossing-over. *Genetics* **118**, 307-317.
- Aurias A, Prieur M, Dutrillaux B *et al.* 1978 Systematic analysis of 95 reciprocal translocations of autosomes. *Human Genetics* **45**, 259-282.
- Baccetti B, Capitani S, Collodel G *et al.* 2002 Infertile spermatozoa in a human carrier of Robertsonian translocation 14;22. *Fertility and Sterility* **78**, 1127-1130.
- Baccetti B, Bruni E, Collodel G *et al.* 2003 10,15 reciprocal translocation in an infertile man: ultrastructural and fluorescence in-situ hybridization sperm study: case report. *Human Reproduction* **18**, 2302-2308.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F 1996 Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Human Reproduction* **11**, 722-726.
- Blanco J, Rubio C, Simon C *et al.* 1997 Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XXX male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Human Genetics* **99**, 413-416.
- Blanco J, Egozcue J, Clusellas N *et al.* 1998a FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregational effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenetics and Cell Genetics* **83**, 275-280.
- Blanco J, Gabau E, Gómez D *et al.* 1998b Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in population with high prevalence of Down syndrome: increased incidence in cases of paternal origin. *American Journal of Human Genetics* **63**, 1067-1072.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F 2000 Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Human Genetics* **106**, 500-505.
- Blanco J, Ferreras A, Egozcue J *et al.* 2003 Meiotic behavior of the sex chromosomes in a 45,X/46,X,t(Y)/46,X,dic t(Y) patient whose semen was assessed by fluorescence in situ hybridization. *Fertility and Sterility* **79**, 913-918.
- Boué A, Gallano P 1984 A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses. *Prenatal Diagnosis* **4**, 45-67.
- Cifuentes P, Navarro J, Blanco J *et al.* 1999 Cytogenetic analysis in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) by in situ hybridisation. *European Journal of Human Genetics* **7**, 231-238.
- Çora T, Hasan A, Kaynak M 2002 Molecular cytogenetic detection of meiotic segregation patterns in sperm nuclei of carriers of 46,XY,t(15;17)(q21;q25). *Journal of Andrology* **23**, 793-798.
- Couzin DA, Watt JL, Stephen GS 1987 Structural rearrangements in the parents of children with primary trisomy 21. *Journal of Medical Genetics* **24**, 280-282.
- Daniel A, Hook EB, Wulf G 1989 Risks of unbalanced progeny at amniocentesis to carriers of chromosome rearrangements: data from United States and Canadian laboratories. *American Journal of Medical Genetics* **33**, 14-53.
- Escudero T, Lee M, Carrel D *et al.* 2000 Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13;14)(q10;q10) carriers. *Prenatal Diagnosis* **20**, 599-602.
- ESHRE PGD Consortium Steering Committee 2002 ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Human Reproduction* **17**, 233-246.
- Estop AM, Levinson F, Cieply K *et al.* 1992 The segregation of a translocation t(1;4) in two male carriers heterozygous for the translocation. *Human Genetics* **89**, 425-429.
- Estop AM, Cieply KM, Wakim A *et al.* 1998 Meiotic products of two reciprocal translocations studied by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* **83**, 193-198.
- Estop AM, Cieply KM, Munné S *et al.* 1999 Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of the spermatozoa of male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Human Genetics* **104**, 412-417.
- Estop A, Cieply K, Munné S *et al.* 2000 Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? Sperm FISH studies. *Human Genetics* **106**, 517-524.
- Findikli N, Kahraman S, Kumtepe Y *et al.* 2003 Embryo development characteristics in Robertsonian and reciprocal translocations: a comparison of results with non-translocation cases. *Reproductive BioMedicine Online* **7**, 563-71.
- Fracarro M, Lindsten J, Ford CE *et al.* 1980 The 11q;22q translocation: A European collaborative analysis of 43 cases. *Human Genetics* **56**, 21-51.
- Frydman N, Romana S, Le Lore'h M *et al.* 2001 Assisting reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation. *Human Reproduction* **16**, 2274-2277.
- Gabriel-Robez O, Ratomponirina C, Dutrillaux B *et al.* 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). *Cytogenetics and Cell*

- Genetics* **43**, 154–160.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP et al. 2002 Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Human Reproduction* **17**, 3201–3207.
- Giltay JC, Kastrop PM, Tienemssen CH et al. 1999 Sperm analysis in a subfertile male with a Y;16 translocation, using four-color FISH. *Cytogenetics and Cell Genetics* **84**, 67–72.
- Guichaoua MR, de Lanversin A, Cataldo C et al. 1991 Three dimensional reconstruction of human pachytene spermatocyte nuclei of a 17;21 reciprocal translocation carrier: study of XY-autosome relationships. *Human Genetics* **87**, 709–715.
- Honda H, Miharu N, Ohashi Y et al. 1999 Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers, t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triple-color fluorescence in situ hybridization. *Human Genetics* **105**, 428–436.
- Iselius L, Lindsten J, Aurias A et al. 1983 The 11q;22q translocation: A collaborative study of 20 new cases and analysis of 110 families. *Human Genetics* **64**, 343–355.
- Johannisson R, Löhrs U, Wolff HH, Schwinger E 1987 Two different XY-quadrivalent associations and impairment of fertility in men. *Cytogenetics and Cell Genetics* **45**, 222–230.
- Koduru PR, Chaganti RS 1989 Meiotic chromosome segregation in human t(11;22)(q23;q11) carriers: a theoretical consideration. *Genome* **32**, 24–29.
- Kuliev A, Verlinsky Y 2002 Current features of preimplantation genetic diagnosis. *Reproductive BioMedicine Online* **5**, 294–299.
- Kurahashi H, Shaikh TH, Hu P et al. 2000 Regions of genomic instability on 22q11 and 11q23 as the etiology for the recurrent constitutional t(11;22). *Human Molecular Genetics* **9**, 1665–1670.
- Laurie DA, Hultén MA 1985 Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Annals of Human Genetics* **49**, 189–201.
- Lindenbaum RH, Hultén M, McDermott et al. 1985 The prevalence of translocations in parents of children with regular trisomy 21: a possible interchromosomal effect? *Journal of Medical Genetics* **22**, 24–28.
- Lockwood DH, Farrier A, Hecht F et al. 1989 Not all chromosome imbalance resulting from the 11q;22q translocation is due to 3:1 segregation in first meiosis. *Human Genetics* **83**, 287–288.
- Lu PY, Hammit DG, Zinsmeister AR et al. 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). *Fertility and Sterility* **62**, 394–399.
- Luciani JM, Guichaoua MR, Mattei A et al. 1984 Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. *Cytogenetics and Cell Genetics* **38**, 14–22.
- Mackie Ogilvie C, Scriven PN 2002 Meiotic outcomes in reciprocal translocation carriers ascertained in 3-day human embryos. *European Journal of Human Genetics* **10**, 801–806.
- Martin RH 1984 Analysis of human sperm chromosome complements from a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Clinical Genetics* **25**, 357–361.
- Martini E, Von Bergh ARM, Coonen E et al. 1998 Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3;11)(q27.3;q24.3) by triple FISH. *Human Genetics* **102**, 157–165.
- Mercier S, Morel F, Fellman F et al. 1998 Molecular analysis of the chromosomal equipment in spermatozoa of a 46,XY,t(7;8)(q11.21;cen) carrier using fluorescence in situ hybridization. *Human Genetics* **102**, 446–451.
- Mikkelsen M 1971 Down's syndrome. Current stage of cytogenetic research. *Humangenetik* **12**, 1–28.
- Morel F, Roux C, Bresson JL 2001a FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype. *Molecular Human Reproduction* **7**, 483–488.
- Morel F, Fellmann F, Roux C, Bresson JL 2001b Meiotic segregation analysis by FISH investigation of spermatozoa of a 46,Y,der(X)(X;Y)(qter→p22::q11→qter) carrier. *Cytogenetics and Cell Genetics* **92**, 63–68.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Roux C et al. 2004 Meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21;cen) translocation in two carrier brothers. *Fertility and Sterility* **81**, 682–685.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T et al. 2000 Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertility and Sterility* **73**, 1209–1218.
- Nielsen J, Wohler M 1991 Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Human Genetics* **87**, 81–83.
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M et al. 2001 Meiotic segregation analysis in a t(4;8) carrier: comparison of FISH methods on sperm chromosome metaphases and interphase sperm nuclei. *European Journal of Human Genetics* **9**, 395–403.
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Carrera M, Egozcue J, Benet J 2002 Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Molecular Human Reproduction* **8**, 958–963.
- Petkovic I, de Capoa A, Giancotti P et al. 1996 Unusual segregation of t(11;22) resulting from crossing-over followed by 3:1 disjunction at meiosis I. *Clinical Genetics* **50**, 515–519.
- Rives N, Jarnot M, Mousset-Simeon N et al. 2003 Fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis of chromosome segregation and interchromosomal effect in spermatozoa of a reciprocal translocation t(9;10)(q11;p11.1) carrier. *Journal of Human Genetics* **48**, 535–540.
- Rousseaux S, Chevret E, Monteil M et al. 1995a Sperm nuclei analysis of a Robertsonian t(14q21q) carrier, by FISH, using three plasmids and two YAC probes. *Human Genetics* **96**, 655–660.
- Rousseaux S, Chevret E, Monteil M et al. 1995b Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocation: analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* **71**, 240–246.
- Schinzl AA, Adelsberger PA, Binker F et al. 1992 No evidence for a paternal interchromosomal effect from analysis of the origin of nondisjunction in Down syndrome patients with concomitant familial chromosome rearrangements. *American Journal of Human Genetics* **50**, 288–293.
- Schmid M, Grunert D, Haaf T et al. 1983 A direct demonstration of somatically paired heterochromatin of human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* **36**, 554–561.
- Serra A, Brahe C, Millington-Ward A et al. 1990 Pericentric inversion of chromosome 9: prevalence in 300 Down syndrome families and molecular studies of nondisjunction. *American Journal of Medical Genetics* **7**, 162–168 (suppl.).
- Shaikh TH, Budarf ML, Celle L et al. 1999 Clustered 11q23 and 22q11 breakpoints and 3:1 meiotic malsegregation in multiple unrelated t(11;22) families. *American Journal of Human Genetics* **65**, 1595–1607.
- Shi Q, Martin RH 2001 Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Journal of Reproduction and Fertility* **121**, 655–666.
- Simi P, Ceccarelli M, Barachini A et al. 1992 The unbalanced offspring of the male carriers of the 11q;22q translocation: nondisjunction at meiosis II in a balanced spermatocyte. *Human Genetics* **88**, 482–483.
- Soares SR, Templado C, Blanco J et al. 2001 Numerical chromosome abnormalities in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 of paternal origin: generalised tendency to meiotic non-disjunction. *Human Genetics* **108**, 134–139.
- Soler A, Carrio A, Perez-Vidal T et al. 1993 Unusual segregation for 11q;22q parental translocation in a triplet pregnancy: prenatal diagnosis in chorionic villi and amniotic fluid. *Prenatal Diagnosis* **13**, 137–141.
- Stahl A, Luciani JM, Devictor M et al. 1975 Constitutive heterochromatin and micronucleoli in the human oocyte at the diplotene stage. *Humangenetik* **26**, 315–327.
- Stene J, Stengel-Rutkowski S 1988 Genetics risks of familial reciprocal and Robertsonian translocation carriers. *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. Liss, New York, pp. 3–73.

Article - Reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers - E Anton *et al.*

- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T *et al.* 2004 Human male recombination maps for individual chromosomes. *American Journal of Human Genetics* **74**, 521–531.
- Sybenga J 1975 *General Cytogenetics*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands, pp. 359.
- Tachdjian G, Muti C, Gaudelus J *et al.* 1992 Unbalanced karyotype due to Adjacent 1 segregation of t(11;22)(q23.3;q13.2). *Annales de Genetique* **35**, 231–233.
- Uchida I, Freeman V 1986 Trisomy 21 Down syndrome. II. Structural chromosome rearrangements in the parents. *Human Genetics* **72**, 118–122.
- Van Assche E, Staessen C, Vegetti W *et al.* 1999 Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in-situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Molecular Human Reproduction* **5**, 682–690.
- Van Hummelen P, Manchester D, Lowe X *et al.* 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. *American Journal of Human Genetics* **61**, 651–659.
- Vidal F, Templado C, Navarro J *et al.* 1982 Meiotic and synaptonemal complexes studies in a 14/21 translocation carrier. *International Journal of Andrology* **5**, 21–26.
- Vidal F, Moragas M, Català V *et al.* 1993 Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. *Human Reproduction* **8**, 1740–1743.
- World Health Organization 1999 *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 138.
- Youngs S, Ellis K, Ennis S *et al.* 2004 A study of reciprocal translocations and inversions detected by light microscopy with special reference to origin, segregation, and recurrent abnormalities. *American Journal of Medical Genetics* **126A**, 46–60.

Received 21 September 2004; refereed 11 October 2004; accepted 15 October 2004.

TREBALL 3

Reciprocal translocations: tracing their meiotic behavior.

(Acceptat a Genetics in Medicine)

ANTON Ester, VIDAL Francesca, BLANCO Joan

Acceptat, juny de 2008

TITLE

Reciprocal translocations: tracing their meiotic behavior.

RUNNING TITLE

Tracing the meiotic behavior of rcp

AUTHORS

Ester ANTON, Francesca VIDAL and Joan BLANCO ✉

Unitat de Biologia Cel·lular (Facultat de Biociències). Universitat Autònoma de Barcelona. 08193-Bellaterra. Spain.

✉ To whom correspondence should be addressed:

Dr. Joan Blanco

Unitat de Biologia Cel·lular (Facultat de Biociències). Universitat Autònoma de Barcelona. 08193-Bellaterra. Spain.

Fax number: +34 93 581 22 95

Phone number: +34 93 581 37 28

e-mail address: joan.blanco@uab.cat

ABSTRACT

Purpose

Segregation and interchromosomal effect (ICE) studies have been performed in reciprocal translocation carriers by sperm-FISH reporting a great heterogeneity. The divergences have been attributed to the particular cytogenetic characteristics of each rearrangement. Nevertheless, there is no consensus in the factors which are responsible for such variability. The purpose of this study was to determine which cytogenetic features influence in the segregation and ICE outcome.

Methods

Segregation and interchromosomal effects analyses were performed in 14 reciprocal translocation carriers, selected because they presented very different cytogenetic features regarding the tetravalent pairing geometry. In each segregation study, a customized combination of probes was used to identify all the segregation products. In the interchromosomal effect study, we used a triple-color FISH for chromosomes X, Y and 18.

Results

A preferential segregation pattern with a gradually decreasing production of alternate, adjacent I, adjacent II and 3:1 segregation was observed in the segregation analysis. Some specific features have been observed to influence this distribution: size of the translocated and centric segments, and the presence of centromeres from acrocentric chromosomes in the centre of the cross. Aneuploidy/diploidy screening revealed increased frequencies of numerical anomalies in seven carriers.

Conclusions

Our data suggest that reciprocal translocations display a more homogeneous behavior than the described in the literature. The interchromosomal effects represent an additional source of imbalances in these carriers.

KEYWORDS

FISH; ICE; meiotic behavior; Reciprocal translocation; Segregation pattern

INTRODUCTION

Reciprocal translocations are one of the most common structural chromosome reorganizations in humans, with an incidence of approximately 0.14% in newborn ¹. In these rearrangements, usually two chromosomes are involved, each one of them having a breakpoint which generates two distal segments that are interchanged.

The numerous possibilities of breakpoints and chromosomes that can be combined give rise to the formation of almost singular reorganizations although it has been seen that not all of the bands are equally involved ², and some specific characteristics can promote the occurrence of reciprocal translocations with a higher recurrence ³⁻⁵.

In reciprocal translocations, the two derivative chromosomes produced as a consequence of the interchange of the distal segments are partly homologous to the respective original partner and partly to the donor chromosome. During meiosis, both derivative chromosomes plus their respective normal homologues can pair, forming a structure called "tetraivalent", which allows complete homosynapsis among the chromosomes involved. In the absence of interstitial chiasmata within this structure, the balanced delivering of the chromosomes in the daughter cells would only be accomplished by the occurrence of an alternate segregation (the two normal chromosomes to one pole and the derivatives to the other) whereas any other segregation mode would lead to the production of unbalanced gametes.

Sperm segregation studies published in the literature (around 70 reciprocal translocation carriers) report ranges of normal/balanced gametes from 19%-81% ⁶. According to such variability, it has been assumed that the proportion of normal/balanced gametes

produced is specific in each case ⁷. The main variables proposed to influence the segregation behavior of reciprocal translocations are the length of the translocated and interstitial segments, the position of the centromere and the presence/absence of heterochromatic regions ⁸. Altogether, these are the major factors that affect the distribution and frequency of chiasmata within the tetraivalent. Variations in any of these aspects could somehow influence the way of delivering the four chromosomes involved in the tetraivalent and thus determine the different patterns of segregation that have been observed in reciprocal translocation carriers.

In this way, the reproductive competence of these carriers and the risk of transmitting chromosome abnormalities to the offspring will also be greatly related to these features. The reduced fertility of these patients is the cause that most of them enquire for reproductive advice. The understanding of the behavior of these rearrangements and the features that can influence the production of normal/balanced gametes in these patients is of substantial importance for their clinical guidance.

In this work, sperm FISH studies have been performed on 14 reciprocal translocations carriers to evaluate the segregation behavior of their respective rearrangements. This population represents the largest series of reciprocal translocations analyzed so far in the same laboratory. These 14 cases were selected from a larger population of reciprocal translocation carriers recruited in our laboratory because they presented very different cytogenetic characteristics. This selection was performed with the aim of including as much variability as possible in the population analyzed, and thus to reflect any existent variation in the segregation patterns displayed. The results obtained have

been statistically analyzed and then discussed according to the cytogenetic features of the rearrangements.

An aneuploidy screening for chromosomes 18, X and Y was also performed in the sperm samples of these carriers. This study was focused on shedding more light on the controversial existence of an interchromosomal effect⁹, a phenomenon that has been described to be a consequence of interferences produced by the rearrangements in the segregation of other chromosome pairs. In this sense, the wide range of reciprocal translocations analyzed with their different configurations allows for an extensive vision of the distribution of this effect.

MATERIAL AND METHODS

Patients

This study was carried on 14 reciprocal translocation carriers that sought advice for infertility (Table 1). This population was formed by including the cases recruited in our laboratory, which brought more heterogeneity to the group regarding the cytogenetic characteristics of the rearrangement. Among them are cases with fairly symmetric tetravalents (P1, P2, P3 and P4), cases with a very small translocated segment (P5, P6, P7 and P8), cases with both translocated segments being very small (P9, P10 and P11) and cases with one of the translocated segments and one of the non-translocated segments being very small (P12, P13 and P14). Partial data from cases P3, P12 and P13 have already been published^{10,11}.

The age range of the patients was 22-54 years and their seminal parameters were established according to the criteria of the World Health Organization¹² (Table 1).

Patients gave their informed consent in writing to participate in the study and the protocol used

was approved by our Institutional Ethics Committee.

Semen sample processing

Sperm samples were fixed in methanol:acetic acid (3:1), and sperm nuclei were decondensed by slide incubation in 5 mM dithiothreitol (DTT) as detailed elsewhere¹³.

Fluorescent in situ hybridization

As detailed in Table 2, specific combinations of 3 or 4 probes were used in the segregation study to identify the segregation products of each reciprocal translocation (Table 2).

In all patients, the occurrence of interchromosomal effects for chromosomes 18, X and Y was also evaluated by a triple-color FISH approach (CEP18, D18Z1, Spectrum Aqua / CEPX, DXZ1, Spectrum Green / CEPY, DYZ3, Spectrum Orange; Vysis Inc.).

The protocol for probes and sample denaturation, incubation and detection was standardized in our laboratory in accordance to the manufacturer's instructions (Vysis Inc., Downers Grove, IL; Qbiogene, Inc., Irvine, CA). Between 600-10000 spermatozoa per patient were analyzed for the segregation study (Table 3), and 3000-10000 for the ICE evaluation (Table 4). Analyses were done using an Olympus BX60 epifluorescence microscope equipped with filter sets for FITC, Texas Red, Aqua and DAPI/Texas Red/FITC using standard assessment criteria¹⁴.

Statistical analysis

Data obtained were statistically analyzed using SPSS 13.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA) under the advice of the Statistical Service of the Universitat Autònoma de Barcelona. A Hierarchical Conglomerates analysis was used to group the cases according to the similarity of the segregation patterns displayed. The non-parametric Mann-Whitney Test was used to evaluate the existence of significant differences

in the production of the diverse segregants between the main groups.

Percentages of adjacent I and adjacent II segregants were statistically analyzed in relation to the length of translocated and centric segments, respectively, using the Pearson's Correlation Coefficient. Differences between individuals with large centric segments and short centric segments regarding their production of adjacent II segregants, were evaluated using the Mann-Whitney Test.

The frequencies of aneuploidies detected in the ICE study were compared to control values using a Chi-square Test. This control population was previously analyzed in our laboratory using the same protocol and scoring criteria¹⁵. Different parameters that could be related to a possible promotion of those aneuploidies in the analyzed population were evaluated: seminogram, chromosomes involved in the rearrangement and age of the patients. A Pearson's Correlation Coefficient was used to evaluate this last factor, and results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Data obtained in the segregation analysis of the 14 reciprocal translocations (Table 3) showed a main occurrence of the alternate segregation mode with a production of normal/balanced gametes ranging from 37.1% to 61.8%, with an average \pm SD of 46.4 ± 6.5 . Regarding the production of unbalanced gametes, the adjacent I segregation mode was the most frequent (range 21.8%-38.3%) with an average \pm SD of 33.6 ± 4.4 , followed by adjacent II (range 0.2%-25.4%, with an average \pm SD of 11.7 ± 6.9) and finally, the 3:1 segregation mode (range 2.3%-13.6%, with an average \pm SD of 6.8 ± 3.5). In the segregation study, the methodological approach did not allow us to differentiate between 4:0

segregations and diploid spermatozoa, which accounted for 0% to 1.9%.

In the statistical processing of data, the percentages obtained from each individual for these four segregation modes were evaluated using an Analysis of Hierarchical Conglomerates that established different groups. The classification obtained has been presented in a dendrogram (Figure 1) that allows one to easily see the clusters formed. In this diagram, the cases are grouped at a certain distance level that goes from 0 (maximum similarity) to 25 (less correspondence). As we can see in Figure 1, most of the individuals appeared grouped in a major cluster (Cluster 1) at a distance=10, which indicated a considerable resemblance among them. At the same time, this group contained two smaller clusters:

- Cluster 1.1 (Figure 1) included cases P3, P4, P7 and P6 which were characterized by having a high production of alternate segregation gametes closely followed by adjacent I with averages \pm SDs of 44.9 ± 2.5 and 36.5 ± 1.9 , respectively (Figure 2). The production of adjacent II was small and similar to the 3:1 segregation gametes (around 8%).

- Cluster 1.2 (Figure 1) comprised the major part of the individuals (P1, P2, P5, P8, P9, P12, P13 and P14). Compared to Cluster 1.1, these individuals presented an increased adjacent II segregation mode describing a more staggered distribution of all the segregation modes. Within this group, these individuals were distributed as follows:

- Cases P1, P14 and P8 were grouped together (Cluster 1.2.1; Figure 1) and showed a reduced 3:1 segregation mode (average \pm SD = 3.8 ± 0.8), which was noticeably distant to their respective adjacent II segregation mode (average \pm SD of 16.1 ± 1.6) (Figure 2). The remaining segregation modes were

similar to those observed in Cluster 1.1 (average \pm SD of 45.1 \pm 1.6 for alternate segregation and 34.3 \pm 2.5 for adjacent I segregation).

- Cases P12, P13 and P5 (Cluster 1.2.2; Figure 1) were characterized by having a close production of adjacent II and 3:1 segregants (Figure 2), but with higher percentages than Cluster 1.1 (13.8 \pm 1.2 and 10.7 \pm 2.6, respectively).

- And, finally, cases P2 and P9 were classified separately. Case P2 due to its high proportion of adjacent II segregation products (25.4%) and Case P9 due to its low proportion of adjacent I segregation products (21.8%).

Apart from this major group, another cluster was created at a very distant level (distance = 25) which included the individuals P10 and P11 (Cluster 2; Figure 1). The principal features that made these two cases so distinct from the rest were the nearly total absence of products resulting from adjacent II and 3:1 segregation. Regarding the rest of the segregation modes, these 2 cases showed a significantly increased production of alternate segregation gametes when compared to the rest of the reciprocal translocation carriers analyzed ($p < 0.028$; Mann-Whitney Test), whereas adjacent I segregation gametes presented similar frequencies ($p = 0.201$; Mann-Whitney Test).

To better ascertain the occurrence of adjacent I and adjacent II segregations in the different cases, the percentages obtained for these two segregation modes were correlated with the length of the shortest translocated segment of the translocation and the length of the shortest centric segment, respectively (Pearson's Correlation Coefficient). A statistically significant correlation was found in the first case ($r = -0.575$; $p = 0.0313$) (Figure 3) but not in the other

($r = 0.438$; $p = 0.117$) (Figure 4). Nevertheless, in this last case, a clear tendency of the individuals with shorter centric segments to produce higher amounts of adjacent II segregants was observed in the descriptive statistics (Figure 4), whereas individuals with large centric segments appeared to produce lower adjacent II segregants. The dissimilarity between these two groups was analyzed using the non-parametrical Mann-Whitney Test, and significant differences were obtained for both parameters: the production of adjacent II segregants ($Z = -2.969$; $p = 0.003$) and the length of the centric segment ($Z = -3.102$; $p = 0.002$).

Concerning the evaluation of the interchromosomal effect, 7 of the 14 cases showed statistically significant increases in the aneuploid frequencies obtained for some of the chromosomes analyzed when compared to the control population ($p < 0.05$)¹⁵ (Table 4): cases P2, P3, P6, P7, P11 and P13 presented increased sex-chromosome disomies. Moreover, cases P2 and P6 also presented an increased frequency of chromosome 18 disomies. Diploidy rates did not appear to be significantly different from the percentages of spermatozoa scored as diploid/4:0 in the segregation study, thus indicating a low or null occurrence of the 4:0 segregation mode. The percentages of diploid gametes appeared to be significantly increased in cases P1, P2, P3, P6 and P11 when compared with the control population ($p < 0.05$)¹⁵.

Regarding the evaluation of the other parameters considered of interest for the influence in the occurrence of aneuploidies, we could not find any preference in the distribution of the seminal parameters among the individuals that presented a positive ICE (the seminograms of those individuals varied from normozoospermia to oligoasthenoterato-

zoospermia; Table 1). The chromosomes involved in the rearrangements associated to a positive ICE included all kinds of morphological variables (metacentrics, submetacentrics, acrocentrics). And we could not find a statistical correlation between the percentages of aneuploidies and the age of the individuals analyzed ($p=0.336$).

DISCUSSION

General behavior

Segregation patterns displayed by reciprocal translocations show a great complexity due to the numerous segregation products that can be generated. However, these products are mostly distributed among four segregation modes which can display variable frequencies.

In the 14 cases presented in this study, a clear prevalence of the alternate segregation mode was observed, closely followed by adjacent I segregation. This pattern is in agreement with the cytogenetic behavior classically associated with reciprocal translocations¹⁶, which describes an enhanced tendency of homologous centromeres to migrate to opposite poles. This behavior has also been observed in most of the previously published sperm FISH segregation studies performed in reciprocal translocation carriers^{6, 11, 17-21}.

From a cytogenetic point of view, the distribution of the chromosomes by adjacent II segregation can be considered equivalent to what happens in a non-disjunction (the homologous centromeres involved in the tetravalent segregate to the same pole). For this reason, this segregation mode has been classically considered to be more unlikely than the previous ones. Nevertheless, in the literature, Escudero et al.²² and Brugnon et al.¹⁷ described frequencies of adjacent II higher than alternate or adjacent I. Those same studies together with

Martini et al.²³, Rives et al.²⁴, Van Assche et al.²⁵, Estop et al.²⁶ and Geneix et al.²⁷, also described high frequencies of 3:1 segregation products, a kind of segregation which in our population appeared to be the least frequent. Regarding that point, we think that it is important to note that segregation studies in reciprocal translocation carriers involve a greatly complicated methodological approach which, as has been discussed elsewhere²⁸, can result in an overestimation of some specific types of unbalanced gametes. For this reason, we must be very cautious in the interpretation of the results obtained in reciprocal translocation segregation studies as it is very difficult to rule out the possibility that such unusual segregation patterns with such high rate of gametes with a combination of few signals do not involve misinterpreted hybridization failures.

Cytogenetic features predisposing segregation

In our population, despite the fact that most of the analyzed individuals displayed a general tendency of behaving according to the classical pattern described, the statistical analysis of the data obtained for all of the segregation patterns revealed the existence of slight variations in the previously pointed-out scaled distribution of the four segregation modes (Figure 2). Within Cluster 1, the differences among the sub-clusters could not be associated with any of the cytogenetic features of the individuals that formed each group, neither when we looked at the symmetry of the cross nor when we analyzed the sizes of the translocated and non-translocated segments. The position of the centromeres and, thus, the size of the interstitial segments were also very different within the groups, but we could not find a preferential implication of specific chromosomes or heterochromatic blocks in the different groups. Still we can not discard the fact that a potential

interindividual variation in the occurrence and distribution of recombination events²⁹⁻³² could influence this differential behavior.

On the other hand, the individuals included in Cluster 2 (P10 and P11) who displayed a much different segregation behavior compared to Cluster 1 (increased frequencies of alternate and adjacent I gametes to the detriment of adjacent II and 3:1 segregation), were carriers of a kind of reciprocal translocation that shared very similar features: very short translocated segments (according to the Généthon map, 0 cM for the shortest translocated segment in both cases and <50 cM for the largest translocated segment) and the presence of centromeric heterochromatin in the center of the cross (see idiograms in Table 1). These specific cytogenetic characteristics would have a negative effect on recombination since they would make difficult the occurrence of chiasmata within the translocated segments and in the central region of the cross (pericentromeric region). Without recombination in those regions, no structures would maintain the four chromosomes paired after prophase I³³ and the chromosomes would reach the metaphase I plate as two independent bivalents. This atypical circumstance would explain the observed segregation outcome of the two translocations: each one of the two bivalents would behave independently at anaphase I and, thus, the segregation products generated would be equivalent to those obtained by either an alternate or an adjacent I segregation mode (adjacent II and 3:1 segregation would imply the occurrence of a double non-disjunction and a single non-disjunction event, respectively).

Nevertheless, the formation of a "standard" tetravalent by these two singular reciprocal translocations can not always be discarded. In the case that the largest translocated segments

would also host a chiasma, the four chromosomes would display a zigzag-chain configuration. In this situation, we would expect a prevalent alternate segregation as well, followed by adjacent I and then, adjacent II and 3:1 segregation. That could explain the small number of sperm detected with an adjacent II and 3:1 content.

Even though the tetravalent configuration of cases P10 and P11 is not very usual, another reciprocal translocation with those same cytogenetic features has been reported in the literature¹⁷. This carrier, with karyotype 46,XY,t(2;22)(q33;p11), displayed a segregation pattern very similar to that observed in cases P10 and P11 (53.9% alternate; 43.8% adjacent I; 0.3% adjacent II; 2% 3:1), concurring with the possible influence of the cytogenetic features mentioned in the described behavior.

Among the other reciprocal translocation carriers analyzed herein, the case P9 also presented small translocated segments (39 and 18 cM) but none of these segments were as short as in cases P10 and P11. This case did not present a centromere in the central region of the cross either. For these reasons, a prevalent formation of a complete tetravalent by this rearrangement could be expected, which would segregate in a similar way to that observed in the other reciprocal translocation carriers.

Besides the implication of the cytogenetic features described for cases P10 and P11, other characteristics have been previously proposed by some authors to have a direct influence on the meiotic behavior of the chromosomes involved in a reciprocal translocation. Faraut et al.³⁴ described a predisposition for the adjacent I segregation mode in those cases with short translocated segments. We analyzed this parameter in our population and we also found a statistically significant correlation between the

percentages of adjacent I segregation products and the lengths (cM) of the shortest translocated segment (Figure 3).

Notwithstanding, Faraut et al. (2000) also presented a significant correlation between the presence of short centric segments and the production of gametes with an adjacent II content, but this correlation was not statistically significant in our population (Figure 4). Nevertheless, two groups of individuals with a clearly different behavior were observed: those cases with one of the centric segments shorter than 90 cM presented a production of adjacent II segregants between 13%-25% (individuals represented by a white dot; Figure 4) whereas those with larger centric segments (>90cM) had a lower production of this segregation mode (0%-15%) (individuals represented by a black dot; Figure 4).

Interchromosomal effect

Regarding the evaluation of ICE in our population, 7 out of the 14 cases (50%) presented increased frequencies of aneuploidies and/or diploidies for the analyzed chromosomes. To further delve into the occurrence of this phenomenon, other factors that could be associated with those increases were analyzed:

- Concerning the morphological features of the chromosomes involved in the rearrangements, we considered those aspects that could interfere with the synaptic process. Firstly, the influence of acrocentric chromosomes was discarded, as they were equally involved in the cases with a positive ICE as well as with a negative ICE. On the other hand, asymmetric tetravalents did not present a preferential predisposition in causing aneuploid increases. And, finally, chromosomes with large blocs of heterochromatin (i.e. 1, 9 and 16) were present either in carriers with manifested ICE and in carriers without ICE.

- Alternatively, the presence of abnormal seminal parameters was also considered since an association between low semen quality and increased tax of aneuploid sperm has been described^{24, 35-37}. In this sense, a recent study (Sarrate et al. unpublished results) has revealed a 14% incidence of this phenomenon in individuals with altered seminal parameters and a normal karyotype. Nevertheless, in the population of reciprocal translocation carriers analyzed in this work, the frequency of cases with increased percentages of aneuploidies rose to 50%. Such a difference could only be explained by the existence of other sources than the ones existing in a general infertile population²⁸.

- And, eventually, the influence of age in the production of aneuploid gametes was also evaluated. Some previously published works described an increasing production of gametes with numerical abnormalities according to the age of the individuals whereas others have not³⁸. Although limited because of the sample size and the range of ages of the males studies, we did not find a statistical correlation between the percentages of aneuploidies and diploidies observed and the age of the patients, suggesting that this parameter was not determinant in the ICE results.

Altogether, and despite the divergences of opinion about the origin of such aneuploidies in structural reorganization carriers, it appears to be very plausible that this kind of reorganization has a direct influence in the production of additional numerical abnormalities for other chromosomes than those involved in the rearrangement. The distribution of this phenomenon among reciprocal translocation carriers appears to be random. And the chromosomes that might be affected could be others than those analyzed in this work since

other studies report significant increases for chromosomes 1, 15, 16 and 21^{11, 18, 20, 39-40}.

To conclude, from the results obtained in the reciprocal translocation analyzed, we can observe a preferential segregation pattern with a gradually decreasing production of alternate, adjacent I, adjacent II and 3:1 segregation. This is especially important when considering that the population analyzed was created by selecting those reciprocal translocation carriers that included more variability in the sample regarding the configuration of the rearrangements. Consequently, it would be plausible that those cases with cytogenetic resemblances to the ranges described would also display similar segregation patterns than those observed.

Still, it seems that some specific cytogenetic features can influence the segregation behavior of reciprocal translocations, modifying this pattern (the shortness of the translocated segments could promote adjacent I segregation which, combined with the location of centromeres in the centre of the tetravalent, could result in a drastic reduction of adjacent II and 3:1 segregation). In this sense, and according to the observation of singular models of behavior among reciprocal translocations, segregation studies with an elaborate, strict scoring criterion in large series of reciprocal translocations that bring more heterogeneity than the recruited in this study could help to clarify the remaining unknown factors about the cytogenetic behavior of these reorganizations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Project 2005SGR-00437 (*Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca de la Generalitat de Catalunya, SPAIN*) and Project 180034 (*Universitat Autònoma de Barcelona, SPAIN*). EA was the recipient of an FI/FIAP grant (2001FI/00457, *Direcció General de Recerca de la Generalitat de Catalunya, SPAIN*). We also wish to thank Mercedes Campillo for her assistance in the data analysis.

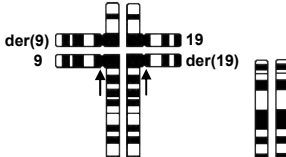

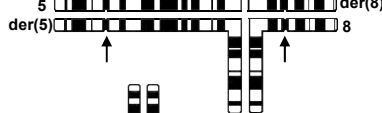
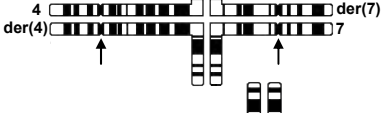
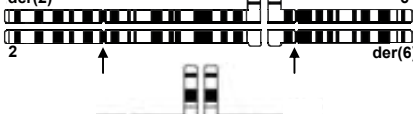
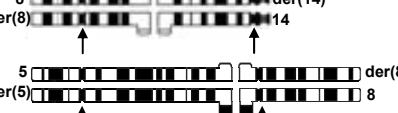
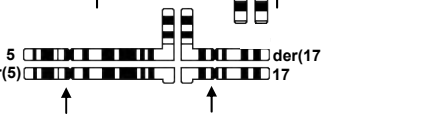

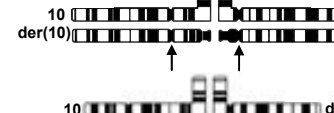


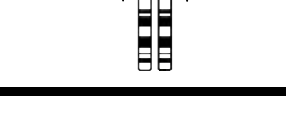
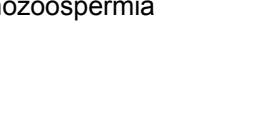

REFERENCES

1. Nielsen J, Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet* 1991;87:81-83.
2. Benn PA, Benn MJ. Recurrent breakpoints in balanced autosomal translocations in man. *Proceedings of the 54th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics* 2004;865/F863:173.
3. Kurahashi H, Shaikh T, Takata M, Toda T et al. The constitutional t(17;22): another translocation mediated by palindromic AT-rich repeats. *Am J Hum Genet* 2003;72:733-738.
4. Kato T, Inagaki H, Yamada K, Kogo H et al. Genetic variation affects de novo translocation frequency. *Science* 2006;311:971.
5. Kurahashi H, Shaikh TH, Hu P, Roe BA et al. Regions of genomic instability on 22q11 and 11q23 as the etiology for the recurrent constitutional t(11;22). *Hum Mol Genet* 2000;9:1665-1670.
6. Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C et al. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:281-290.
7. Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction* 2001;121:655-666.
8. Jalbert P, Sele B, Jalbert H. Reciprocal translocations: a way to predict the mode of imbalanced segregation by pachytene-diagram drawing. *Hum Genet* 1980;55:209-222.
9. Lejeune J. Autosomal Disorders. *Pediatrics* 1963;32:326-337.
10. Blanco J, Egozcue J, Clusellas N, Vidal F. FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and interchromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenet Cell Genet* 1998;83:275-280.
11. Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J. Preferential alternate segregation in the common t(11;22)(q23;q11) reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers. *Reprod Biomed Online* 2004;9:637-644.
12. World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th ed ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1999.
13. Vidal F, Moragas M, Catala V, Torello MJ et al. Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. *Hum Reprod* 1993;8:1740-1743.

14. Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1996;11:722-726.
15. Blanco J, Rubio C, Simon C, Egozcue J et al. Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XYY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Hum Genet* 1997;99:413-416.
16. Sybenga J. General cytogenetics. Amsterdam, The Netherlands.: North-Holland Publishing Company, 1975.
17. Brugnion F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B et al. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod* 2006;21:685-693.
18. Midro AT, Wiland E, Panasiuk B, Lesniewicz R et al. Risk evaluation of carriers with chromosome reciprocal translocation t(7;13)(q34;q13) and concomitant meiotic segregation analyzed by FISH on ejaculated spermatozoa. *Am J Med Genet A* 2006;140:245-256.
19. Yakut T, Ercelen N, Acar H, Kimya Y et al. Meiotic segregation analysis of reciprocal translocations both in sperms and blastomeres. *Am J Med Genet A* 2006;140:1074-1082.
20. Kekesi A, Erdei E, Torok M, Dravucz S et al. Segregation of chromosomes in spermatozoa of four Hungarian translocation carriers. *Fertil Steril* 2007;88:212 e215-211.
21. Nishikawa N, Sato T, Suzumori N, Sonta S et al. Meiotic segregation analysis in male translocation carriers by using fluorescent in situ hybridization. *Int J Androl* 2008;31:60-66.
22. Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M, Munne S. Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertil Steril* 2003;79:1528-1534.
23. Martini E, von Bergh AR, Coonen E, de Die-Smulders CE et al. Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3;11)(q27.3;q24.3) by triple FISH. *Hum Genet* 1998;102:157-165.
24. Rives N, Jarrot M, Mousset-Simeon N, Joly G et al. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis of chromosome segregation and interchromosomal effect in spermatozoa of a reciprocal translocation t(9,10)(q11;p11.1) carrier. *J Hum Genet* 2003;48:535-540.
25. Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, Bonduelle M et al. Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in-situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Mol Hum Reprod* 1999;5:682-690.
26. Estop AM, Cieply KM, Munne S, Feingold E. Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of the spermatozoa of a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Hum Genet* 1999;104:412-417.
27. Geneix A, Schubert B, Force A, Rodet K et al. Sperm analysis by FISH in a case of t(17; 22) (q11; q12) balanced translocation: case report. *Hum Reprod* 2002;17:325-331.
28. Anton E, Vidal F, Blanco J. Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod* 2007;22:2088-2092.
29. Hassold T, Judis L, Chan ER, Schwartz S et al. Cytological studies of meiotic recombination in human males. *Cytogenet Genome Res* 2004;107:249-255.
30. Codina-Pascual M, Campillo M, Kraus J, Speicher MR et al. Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and effects on human male meiosis. *Mol Hum Reprod* 2006;12:123-133.
31. Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Campillo M et al. Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum Reprod* 2005;20:2133-2139.
32. Sun F, Trpkov K, Rademaker A, Ko E et al. Variation in meiotic recombination frequencies among human males. *Hum Genet* 2005;116:172-178.
33. Petronczki M, Siomos MF, Nasmyth K. Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 2003;112:423-440.
34. Faraut T, Mermet MA, Demongeot J, Cohen O. Cooperation of selection and meiotic mechanisms in the production of imbalances in reciprocal translocations. *Cytogenet Cell Genet* 2000;88:15-21.
35. Miharuru N. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:347-351.
36. Machev N, Gosset P, Viville S. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:352-357.
37. Burrello N, Vicari E, Calogero AE. Chromosome abnormalities in spermatozoa of patients with azoospermia and normal somatic karyotype. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:363-365.
38. Buwe A, Guttenbach M, Schmid M. Effect of paternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:213-228.

TABLES

Table 1- Detailed characteristics of the cases studied.

Case	Karyotype	Tetavalent	Age	Seminal parameters
P1	46,XY,t(9;19)(q10;p10)		34	n.r.
P2	46,XY,t(1;11)(q12;q13)		37	OAT
P3	46,XY,t(5;8)(q33;q13)		42	N
P4	46,XY,t(4;7)(q31.1;q32)		40	N
P5	46,XY,t(2;6)(q37;p21)		37	n.r.
P6	46,XY,t(8;14)(q22;q32)		39	n.r.
P7	46,XY,t(5;8)(q35.1;p11.2)		54	A
P8	46,XY,t(5;17)(q31;p13)		34	N
P9	46,XY,t(9;20)(p24;q13.1)		22	OA
P10	46,XY,t(10;13)(p13;p13)		36	OA
P11	46,XY,t(10;14)(q24;p11.2)		40	OA
P12	46,XY,t(11;22)(q23;q11)		35	N
P13	46,XY,t(11;22)(q23;q11)		34	N
P14	46,XY,t(6;22)(q13;q13)		34	n.r.

O- Oligozoospermia; N- Normozoospermia; A- Astenozoospermia

n.r.- Not recorded in the clinical history

(↑) arrows indicate the position of the centromeres

Table 2- Probes used in the segregation studies.

Reorganization	Probes
t(9;19)(q10;p10)	LSI 9q34 Aqua TelVysion 19q Orange TelVysion 19p Green
t(1;11)(q12;q13)	CEP 11 Aqua TelVysion 1q Orange TelVysion 1p Green
t(5;8)(q33;q13)	CEP 8 Green CEP 8 Orange LSI 8q24 C-myc Orange LSI 5p15.2 Green
t(4;7)(q31.1;q32)	CEP 4 Aqua TelVysion 4q Orange TelVysion 7p Green
t(2;6)(q37;p21)	CEP 6 Aqua TelVysion 2q Orange TelVysion 2p Green
t(8;14)(q22;q32)	CEP 8 Aqua TelVysion 14q Orange TEL 8q ⁺ Green
t(5;8)(q35.1;p11.2)	CEP 8 Aqua LSI 8q24 C-myc Green LSI 8p22 Orange LSI 5p15.2 Green
t(5;17)(q31;p13)	CEP 17 Aqua Tel 5q Orange TelVysion 17p Green
t(9;20)(p24;q13.1)	LSI 9q34 Aqua TelVysion 20q Orange TelVysion 20p Green
t(10;13)(p13;p13)	CEP 10 Aqua LSI 13q14 Orange TelVysion 10p Green
t(10;14)(q24;p11.2)	CEP 10 Aqua TelVysion 10q Orange TEL 14q ⁺ Green
t(11;22)(q23;q11)	CEP 11 Aqua TelVysion 11q Orange LSI 22-bcr Green
t(11;22)(q23;q11)	
t(6;22)(q13;q13)	CEP 6 Aqua Tel 6q Orange LSI 22-bcr Green

All probes were from Vysis Inc. except (*), which were from QBiogene Inc.

Table 3- Results obtained from the segregation study.

Case	Reorganization	Segregation modes (%)					Other	Total (n)
		Alt	Adj I	Adj II	3:1	4:0/Dipl		
P1	t(9;19)(q10;p10)	43.5	32.4	17.8	4.7	1.2	0.4	1054
P2	t(1;11)(q12;q13)	51.2	21.8	16.7	8.0	1.9	0.5	648
P3	t(5;8)(q33;q13)	45.1	38.3	7.0	6.6	1.2	1.8	9994
P4	t(4;7)(q31.1;q32)	45.3	38.0	9.8	6.1	0.1	0.4	1046
P5	t(2;6)(q37;p21)	39.5	33.8	12.2	13.6	0.2	0.6	1005
P6	t(8;14)(q22;q32)	41.5	35.3	4.4	12.3	1.7	4.8	641
P7	t(5;8)(q35.1;p11.2)	47.7	34.5	9.6	7.0	0.1	1.2	2531
P8	t(5;17)(q31;p13)	45.1	37.0	14.6	3.2	0.1	0.0	1453
P9	t(9;20)(p24;q13.1)	37.1	29.5	25.4	7.1	0.2	0.8	1006
P10	t(10;13)(p13;p13)	61.8	34.4	0.2	2.5	0.5	0.8	1054
P11	t(10;14)(q24;p11.2)	56.7	38.3	1.4	2.3	0.6	0.4	1051
P12	t(11;22)(q23;q11)	42.9	33.3	13.2	9.8	0.1	0.6	3596
P13	t(11;22)(q23;q11)	45.0	29.8	15.9	8.6	0.2	0.5	4058
P14	t(6;22)(q13;q13)	46.7	33.5	16.0	3.4	0	0.4	1163
Average		46.4	33.6	11.7	6.8	0.6	0.9	
±SD		±6.5	±4.4	±6.9	±3.5	±0.6	±1.2	

Table 4- Results obtained from the ICE study.

Case	Reorganization	Total (n)	Haploid (%)	Sex Chr. Disomy (%)	Chr. 18 Disomy (%)	Diploidy (%)	Other (%)
P1	t(9;19)(q10;p10)	10496	99.0	0.17	0.09	0.71^a	0.09
P2	t(1;11)(q12;q13)	3421	96.8	1.81^a	0.26^a	1.02^a	0.15
P3	t(5;8)(q33;q13)	10165	96.4	1.11^a	0.17	1.58^a	0.75
P4	t(4;7)(q31.1;q32)	10328	99.7	0.19	0	0.12	0.04
P5	t(2;6)(q37;p21)	10573	99.3	0.29	0.04	0	0.34
P6	t(8;14)(q22;q32)	10009	97.4	0.81^a	0.18^a	0.91^a	0.70
P7	t(5;8)(q35.1;p11.2)	10054	97.5	0.88^a	0.08	0.13	1.36
P8	t(5;17)(q31;p13)	10154	99.5	0.24	0.08	0.13	0.50
P9	t(9;20)(p24;q13.1)	10476	99.3	0.33	0.09	0.10	0.23
P10	t(10;13)(p13;p13)	10110	99.3	0.28	0.03	0.25	0.17
P11	t(10;14)(q24;p11.2)	10327	98.8	0.41^a	0.11	0.62^a	0.12
P12	t(11;22)(q23;q11)	15043	99.6	0.14	0.03	0.19	0.03
P13	t(11;22)(q23;q11)	10222	97.5	0.65^a	0.11	0.10	1.68
P14	t(6;22)(q13;q13)	10115	99.4	0.14	0.02	0.08	0.37

^a Significant differences versus control ($P < 0.05$)¹⁵.

FIGURES

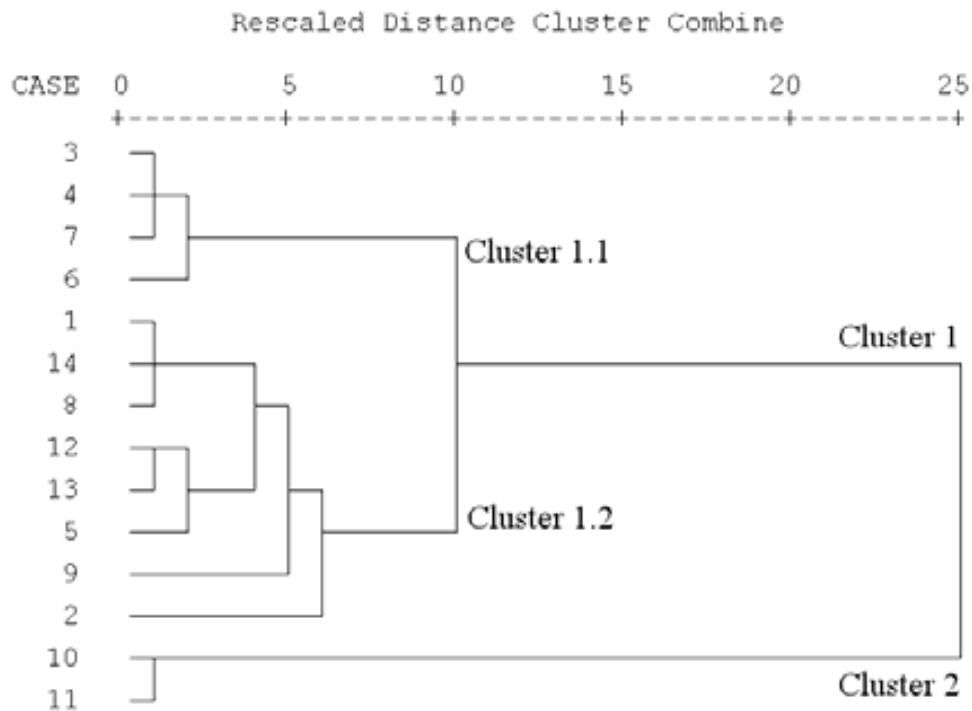


Figure 1 - Dendrogram obtained in the Hierarchical Cluster analysis using the Ward Method.

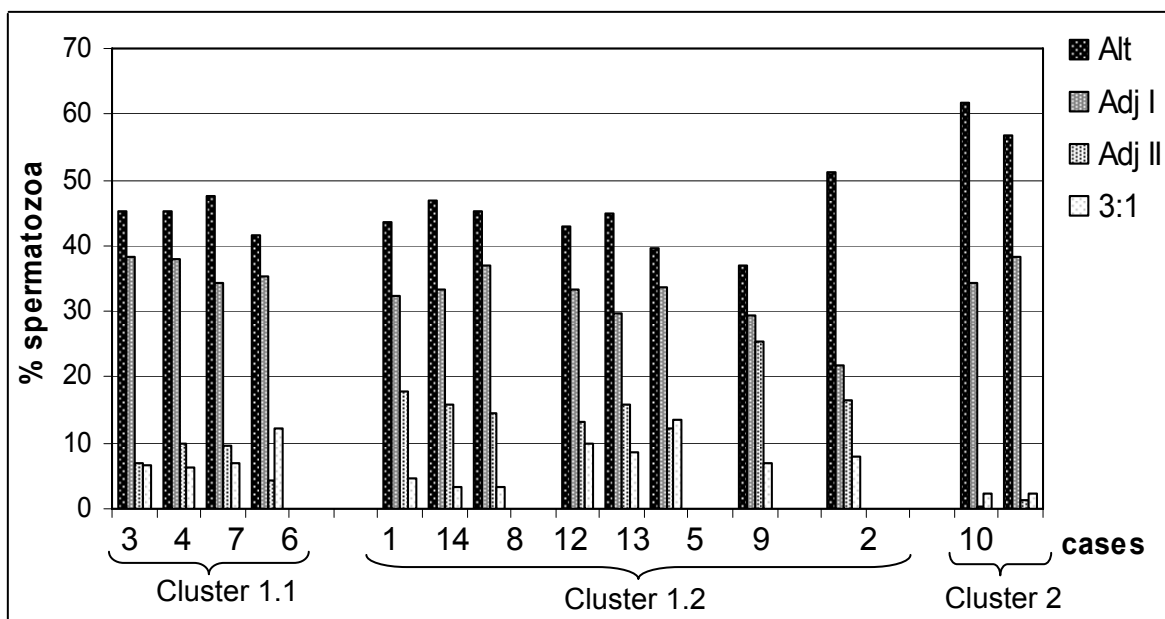
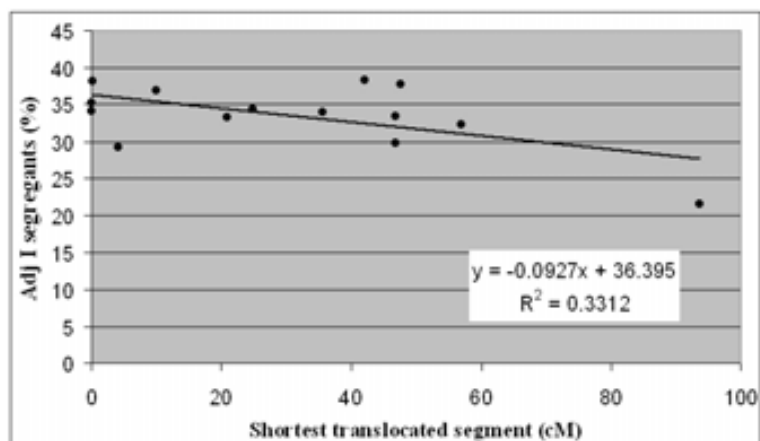


Figure 2 - Graphic representation of the segregation patterns obtained and grouped according to the Hierarchical Cluster analysis.



$r = -0.575$
 Pearson's Correlation Coefficient = 0.575
 P value = 0.031

Figure 3 - Representation of the Pearson's Correlation between the size of the shortest translocated segment of the 14 individuals and their production of gametes with an Adjacent I content.



$r = -0.439$
 Pearson's Correlation Coefficient = 0.438
 P value = 0.117

Figure 4 – Representation of the Pearson's Correlation between the size of the shortest centric segment of the 14 individuals and their production of gametes with adjacent II content.

Individuals represented by a white dot (○) display significant differences for the production of adjacent II segregants (Z from Mann-Whitney=-2.969; $p=0.003$) and the length of the centric segment (Z from Mann-Whitney=-3.102; $p=0.002$), with respect to individuals represented by a black dot (●).

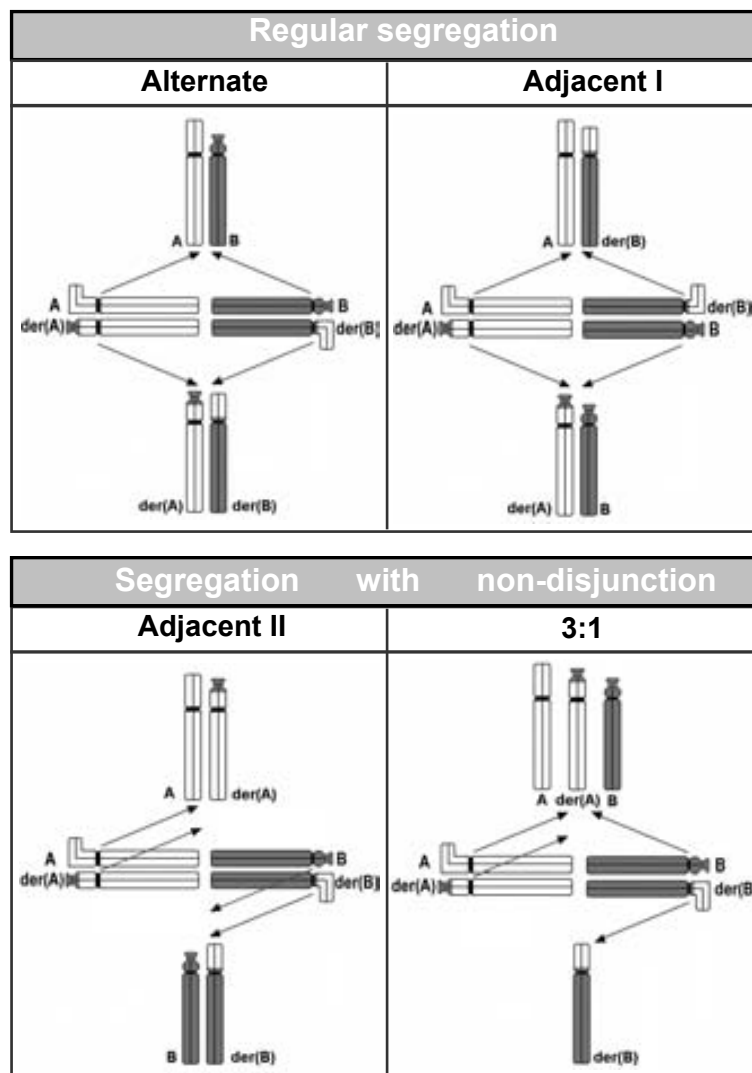


Figure 5 – Potential segregation behavior at anaphase I of a reciprocal translocation which reaches the metaphase plate as two independent bivalents.

TREBALL 4

Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion inv(6)(p23q25) carrier using FISH on decondensed sperm nuclei.

Cytogenetics and Genome Research 97:149-154

ANTON Ester, BLANCO Joan, EGOZCUE Josep, VIDAL Francesca

2002

Original Article

Cytogenet Genome Res 97:149–154 (2002)
DOI: 10.1159/000066603

Cytogenetic and
Genome Research

Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion *inv(6)(p23q25)* carrier using FISH on decondensed sperm nuclei

E. Anton, J. Blanco, J. Egozcue and F. Vidal

Unitat de Biologia Cel·lular, Edifici C (Facultat de Ciències), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès) (Spain)

Abstract. Fluorescent in situ hybridization (FISH) in decondensed sperm nuclei has been used to determine the percentage of normal/balanced or unbalanced spermatozoa produced by an *inv(6)(p23q25)* carrier, and the possible interchromosomal effect (ICE) of the reorganized chromosomes on other chromosome pairs. A dual color FISH with specific subtelomeric probes for the 6p and 6q regions was performed to determine the segregation pattern of the inverted chromosome. ICE on chromosomes 18, X and Y was assessed using a triple color FISH assay. In the segregation analysis 10,049 spermatozoa were analyzed, and only 45.7% of them were normal/balanced. The high number of unbalanced gametes in our carrier could be the consequence of the large size of the inverted segment. This situation could facilitate the formation of an inversion loop,

where formation of an odd number of chiasmata (usually one) result in the production of 50% normal and 50% unbalanced sperm. Furthermore, an increase in the disomy rate for chromosome 6 was also observed. In the screening for ICE, 10,007 spermatozoa were analyzed. The disomy rate for the sex chromosomes and chromosome 18 were not significantly different from those found in our controls, suggesting no evidence of interchromosomal effects in this patient. The use of FISH in decondensed sperm nuclei has proved once more to be an accurate approach to determine the chromosome anomalies in sperm and could help to better establish a reproductive prognosis.

Copyright © 2002 S. Karger AG, Basel

Pericentric inversions are chromosomal reorganizations which, in humans, are found with a frequency of 1–2% (de la Chapelle et al., 1974; Kaiser, 1984). Although many of them affect short heterochromatic regions and are considered as population polymorphisms, the meiotic behavior in euchromatic pericentric inversions (involving longer intermediate non polymorphic segments) can result in unbalanced spermatozoa and produce spontaneous abortions or viable chromosomally abnormal offspring. For this reason the frequency of this reorgani-

zation detected in infertile patients is about 13 times higher than in the general population (De Braekeleer and Dao, 1991).

The meiotic behavior of each inversion depends on the length of the inverted region and the morphological characteristics of the chromosome involved (Kaiser, 1984). In general, short inversions are seen as asynaptic regions in the affected bivalent, while long inversions give rise to the formation of an inversion loop that allows pairing of the inverted region with its normal homologue. The process of formation of an inversion loop involves asynapsis of the inverted region followed by twisting and folding of the bivalent to allow homologous pairing (Saadallah and Hultén, 1986; Chandley et al., 1987; Martínez-Flores et al., 2001). The presence of chiasmata within the loop can give rise to the production of unbalanced gametes, containing different combinations of duplications and deficiencies involving the segment outside of the inversion, and this may result in reduced fertility.

Although until a few years ago the results of the meiotic behavior of chromosome reorganizations were analyzed using

Supported by Ministerio de Educación y Cultura (DGESEIC; PM98-0174). E. Anton is supported by a FI/FIAP grant (2001FI/00457) from DURSI (Direcció General de Recerca, Generalitat de Catalunya, Spain).

Received 10 June 2002; manuscript accepted 16 July 2002.

Request reprints from Dra. Francesca Vidal, Unitat de Biologia Cel·lular Edifici C (Facultat de Ciències), Universitat Autònoma de Barcelona 08193, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès) (Spain)
telephone: +34 93 581 27 81; fax: +34 93 581 22 95;
e-mail francesca.vidal@uab.es

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2002 S. Karger AG, Basel
0301-0171/02/0974-0149\$18.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/cgr

the hamster test (reviewed by Templado et al., 1996), more recently the development of new probes (locus-specific and subtelomeric) and their application on decondensed sperm heads has allowed a more accurate study of the segregation patterns of different types of chromosome reorganizations during meiosis (Van Hummelen et al., 1997; Blanco et al., 1998). However, in inversion carriers this methodology has been limited to the study of only two carriers (Jaarola et al., 1998) previously analyzed in sperm chromosome preparations (Martin, 1993; Martin et al., 1994).

The use of FISH also allows us to determine whether a given chromosome reorganization may have an influence on the segregation of other chromosome pairs. This phenomenon called interchromosomal effect (Lejeune, 1963), may result from the presence of asynaptic regions in some bivalents (Vidal et al., 1982) or the formation of heterosynapses between unpaired regions of the reorganized chromosomes and other bivalents within the same cell, specially the sex chromosomes in the male. In fact, heterosynapsis is one of the strategies to rescue meiosis (Saadallah and Hultén, 1986; Guitart et al., 1987) and avoid apoptosis.

In this work, we have analyzed the segregation pattern and the occurrence of possible ICE involving the sex chromosomes and chromosome 18 in a male carrier of a pericentric inversion *inv(6)(p23q25)* using multicolor FISH procedures.

Materials and methods

A 37 year-old male, carrier of an *inv(6)(p23q25)* was the subject of this study. The patient was ascertained when consulting for medical help due to recurrent miscarriage. Our institutional ethics committee approved the protocol, and the patient gave his informed consent in writing.

A semen sample with normal seminal parameters (WHO, 1992) was obtained by masturbation. The sample was fixed in metanol:acetic acid (3:1) and processed for FISH. 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 described previously (Vidal et al., 1993).

Dual-color FISH was performed to determine the meiotic segregation of chromosome 6. The following combination of probes was used: a subtelomeric probe specific for the 6p region (TelVysion 6p, Spectrum Green, Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) and a subtelomeric probe specific for the 6q region (TelVysion 6q, Spectrum Orange) (Fig. 1). Pairing of the inverted region with formation of one or more chiasmata within the loop could give rise to different combinations of duplications and deficiencies (Fig. 2).

The possible interchromosomal effects on the sex chromosomes and chromosome 18, and the percentage of diploid sperm were also evaluated, using a triple-color FISH assay with a combination of centromeric probes for chromosome 18 (CEP 18, Spectrum Aqua, Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA), chromosome X (CEP X, Spectrum Green), and chromosome Y (CEP Y, Spectrum Orange).

Both FISH protocols were performed according to manufacturer's instructions (Vysis) and analyses were done using an Olympus BX60 epifluorescence microscope equipped with a triple-band pass filter for DAPI/Texas Red/FITC and single-band pass filters for FITC, Texas Red and Aqua. Standard assessment criteria, previously described by us (Blanco et al., 1996), were followed for the evaluation of chromosome 18, X and Y signals. In the segregation analysis, scoring criteria were partially modified in order to objectively correlate the number and the distribution of the subtelomeric hybridization signals with the genotype (see Discussion).

Data were statistically analyzed using InStat 3.05 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) and the statistic Chi-square test.

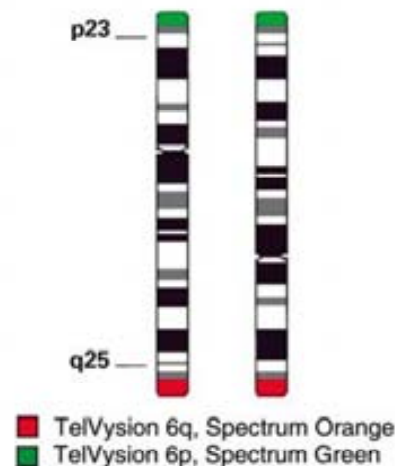


Fig. 1. Characteristics of the *inv(6)(p23q25)* and probes used. Left: normal chromosome. Right: inverted chromosome.

Table 1. Results of two color FISH using subtelomeric probes 6p and 6q.

Chromosomal constitution	Signals	n (%)
Normal or inverted	● ●	4592 (45.7)
dup(6q)/del(6p)	● ●	1876 (18.67)
dup(6p)/del(6q)	● ●	1927 (19.18)
Total		3803 (37.85)
del(6p)	●	395 (3.93)
del(6q)	●	350 (3.48)
dup(6q)	● ● ●	208 (2.07)
dup(6p)	● ● ●	139 (1.38)
dup(6q)/del(6p) + 6q	● ● ● ●	132 (1.31)
dup(6p)/del(6q) + 6p	● ● ● ●	132 (1.31)
Total		1356 (13.48)
Diploid or disomic	● ● ● ● ● ●	75 (0.75)
	● ● ● ● ● ●	6 (0.06)
	● ● ● ● ● ●	13 (0.13)
	● ● ● ● ● ●	18 (0.18)
	● ● ● ● ● ●	28 (0.28)
Total		140 (1.4)
Nullisomies or hybridization failures		158 (1.57)

Results

A total of 20,056 sperm were analyzed. Of these, 10,049 were used to determine the meiotic segregation of the inversion and the other 10,007 were examined to evaluate the possible ICE on chromosomes 18, X and Y, and the percentage of diploid sperm. Hybridization efficiency for both combinations of probes was over 99%.

Table 1 shows the result from segregation studies. Only 45.7% of spermatozoa were normal or balanced (Fig. 3A) while the remaining (52.73%) showed different types of duplications

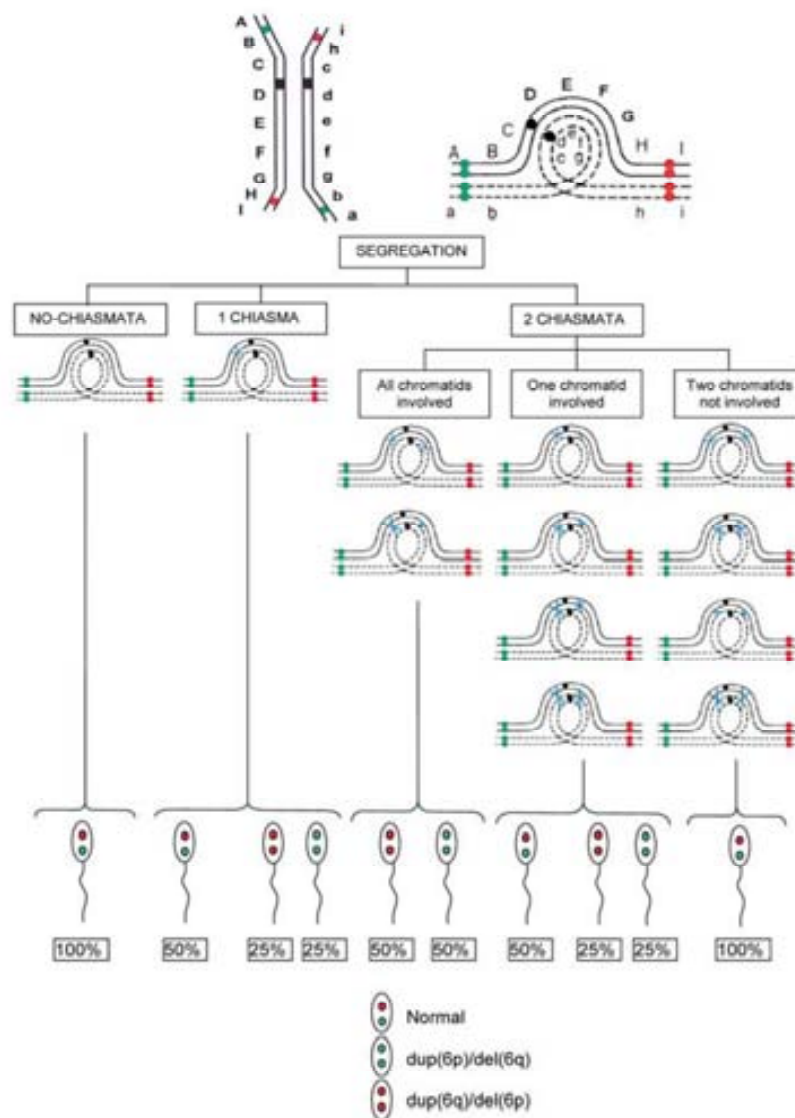


Fig. 2. Meiotic origin of the combinations of FISH signals and theoretical proportions expected. Chromatid and chiasma interference would probably prevent the formation of two chiasmata within the loop. The proportion of sperm of each type does not take into consideration the possible loss of acentric fragments at anaphase I or the consequences derived from the anaphase I bridge produced at anaphase I by the dicentric chromatid.

and/or deficiencies for chromosome 6. In the group of abnormal spermatozoa, most sperm (37.85%) had a duplication with its complementary deletion (two Green signals or two Red signals) (Fig. 3B). The proportion of these two groups followed the expected 1:1 distribution ($p > 0.05$).

On the other hand, we also observed sperm with only one Red signal (3.93%) or one Green signal (3.48%), as well as sperm with different possible combinations of these hybridization signals (RRG, Fig. 3C; GGR; RRR; GGG). As a whole, these spermatozoa corresponded to 13.48% of the total.

In 1.4% of the sperm analyzed we found different combinations of four hybridization signals (Table 1). These could correspond to diploid sperm or to sperm with a disomy for chromo-

some 6 (resulting from non-disjunction events at either meiosis I or meiosis II).

The frequency of sperm disomic for the sex chromosomes (0.44%) or for chromosome 18 (0.01%) were no different ($p > 0.05$) from the frequencies found in our control population (0.37% and 0.10% respectively; Blanco et al., 1997). The percentage of diploid sperm (0.24%) was no different ($p > 0.05$) from that found in our control population (0.24%; Blanco et al., 1997).

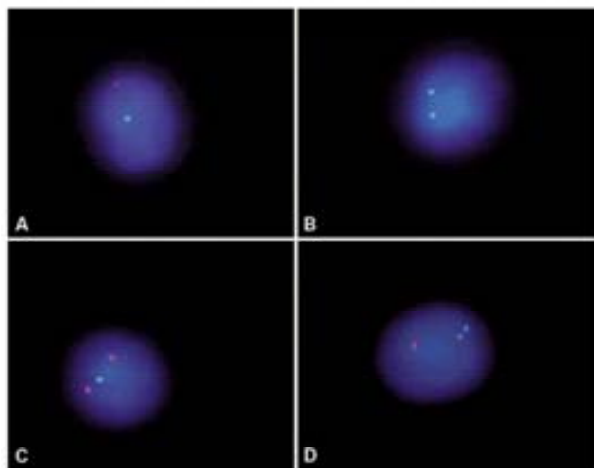


Fig. 3. Dual-color FISH on sperm nuclei: (A) Normal or inversion carrier, (B) dup(6p)/del(6q), (C) dup(6q), (D) Sperm with a dup(6p). Note the proximity of the two 6p green signals.

Discussion

The results obtained in this work underline once more the accuracy and the importance of the analysis of the segregation of chromosome reorganizations using FISH on decondensed sperm heads.

The inversion studied by us (Fig. 1) was the longest of all those reported in the literature (Table 2). As previously indicated, the length of the inverted segment (Kaiser, 1984) and also the location of the breakpoints (G-light band or G-dark band) (Ashley, 1988) are important to determine the behavior of the chromosomes implicated during meiosis. A long inversion and two G-light band breakpoints (as in our carrier) would, in principle, facilitate the recognition of homology and the formation of an inversion loop, with at least one chiasma. Theoretically, this would produce 50% of normal or inverted chromosomes and 50% of recombination aneusomies. On the other hand, it was also expected that chromatid and chiasma interference would prevent the formation of a second chiasma within the loop. The results obtained correspond to those expected from the formation of a single chiasma within the inversion loop, with a proportion of normal or inverted chromosomes similar to the proportion of recombination aneusomies.

In many of the sperm chromosome studies in inversion carriers (Table 2) the proportion of abnormal sperm was nil (Balkan et al., 1983; Jenderny et al., 1992; Martin et al., 1994; Colls et al., 1997). In others, the percentage of abnormal sperm was much lower than the one observed in our study (Martin, 1991; Navarro et al., 1993; Jaarola et al., 1998). In the only study in which two inversion carriers were analyzed using FISH (Jaarola et al., 1998), the percentage of abnormal sperm in one of them was also low (0.67%). It should be noted, however, that the inversions studied so far were much shorter than the one analyzed in this work, a situation that would favor pairing of

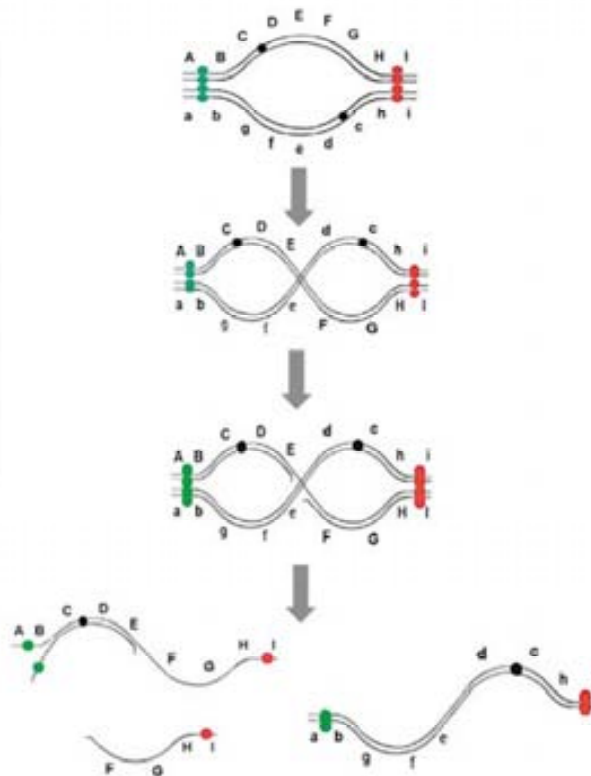


Fig. 4. Example of a possible chromatid break. The segregation of the resulting chromosomes and chromosome fragments could explain some of the genotypes observed in our study.

the homologous segments over pairing of the inverted segment, and produced basically balanced sperm. The longest inversions (Martin, 1991, 1993; Navarro et al., 1993; Jaarola et al., 1998) produced 30.8%, 11.4%, 25% and 16.7% abnormal sperm respectively, which is much lower than the 52.73% found in our patient.

In our study most abnormal sperm (37.85%) corresponded to short arm duplications/long arm deletions or vice versa (Fig. 2) which is the result to be expected from the formation of a single chiasma within the inversion loop. Complementary genotypes did not differ from the expected 1:1 proportion. Thus, at least in our case no genotypic selection seems to exist; this is in contrast with the results obtained in some reciprocal translocations where some segregations are observed more frequently than others (Van Hummelen et al., 1997).

Pairing configuration (Van Hummelen et al., 1997; Durban et al., 2001) and gene defects (Blanco et al., 1998) have been proposed as the mechanisms involved in translocation carriers for the genotypic selection. Since in inversions only one chromosome pair is involved, it is to be expected that any configuration will always produce complementary genotypes. Moreover, in the case analyzed the regions involved in the duplications/

Table 2. Results of chromosome segregation in pericentric inversion carriers reported by different authors

Reference	Inversion	Method ^a	No. sperm	% Non-recombinant
Balkan et al., 1983	inv(3)(p11q11)	SC	111	100
Martin, 1991	inv(3)(p25q21)	SC	144	69.2
Martin, 1993	inv(8)(p23q22)	SC	166	88.6
Jenderny et al., 1992	inv(20)(p13q11.2)	SC	26	100
Navarro et al., 1993	inv(7)(p13q36)	SC	140	75
Martin et al., 1994	inv(1)(p31q12)	SC	159	100
Colls et al., 1997	inv(9)(p11q13)	SC	314	100
Jaarola et al., 1998	inv(1)(p31q12)	FISH	6006	99.33
	inv(8)(p23q22)	FISH	3168	86.30
Our study	inv(6)(p23q25)	FISH	10049	45.7

^a SC = Sperm chromosomes; FISH = Fluorescence in situ hybridization.

deficiencies are so small that the excess/defect of genetic information probably cannot be considered as a selective factor.

As indicated, sperm with only a single hybridization signal or with three signals were also observed. Their origin is more difficult to explain. Initially, the absence of a signal could be considered as a hybridization failure. However, since our hybridization efficiency was very high, another possible explanation would be the production of chromatid breaks in some of the cells. The process of loop formation, as described in chicken (Bitgood et al., 1982) and rats (Martínez-Flores et al., 2001), involves the formation of a loop and its twisting around the middle point to produce a structure that can be folded on its own. At some time during this process (Fig. 4) the mechanical tension to which the chromosomes are subjected (Martínez-Flores et al., 2001) could produce chromatid breaks that, if unrepaired, could result in the loss of the acentric fragment by lagging. The centric fragment could segregate correctly or remain paired after meiosis II resulting in one cell with two Green signals and one Red signal (if it affected the normal chromosome as in the example of Fig. 4) or a cell with two Red signals and one Green signal (if it affected the inverted chromosome).

In our study, we found about 10% of sperm with a bipartite signal as illustrated in Fig. 3D. In principle, and according to the strict criteria used by most authors (Egozcue et al., 1997; Downie et al., 1997), for two signals to be considered as such they must be of the same size and intensity, and be separated by a distance equal or longer than their diameter. In our case, the signals were always of the same size and intensity, but were seen very close to each other. Although in this case they could not strictly be considered as two signals, their high percentage, their excellent definition and the fact that in peripheral blood lymphocytes in G₂ (two chromatids; current experience in our lab) the signals have the same aspect as the ones considered here, led us to the conclusion that each one corresponded to a telomeric dominion of chromosome 6 (two chromatids), and the signals were considered to be representative of each telomere. We would like to note that this phenomenon could affect many other segregation analyses using telomeric probes, resulting in an underestimation of the percentage of unbalanced

gametes. This could explain in part, the increased number of chromosome abnormalities observed in embryos from affected couples compared to the incidence described in spermatozoa (Van Assche et al., 1999; ESHRE PGD, Consortium Steering Committee, 2002).

In the dual hybridization experiment we also found a certain percentage of sperm (1.4%) with four signals. Since each pair of signals corresponded to one chromosome 6, the sperm were at least disomic. To determine whether these sperm were in fact disomic or diploid, we carried out a triple FISH analysis and the patient did not show an increased diploidy rate as compared to controls (Blanco et al., 1997). Thus, the same analysis allowed us to determine that a high percentage of sperm with four signals (~ 1.1%) were in fact disomic for chromosome 6.

This frequency is much higher than the one found in controls (Blanco et al., 1996) and its contribution to the patient infertility should not be underrated. The origin of disomic sperm may be a reduction of recombination or an increase of recombination between the two chromosomes involved. According to Laurie and Hultén (1985) the mean number of chiasmata for chromosome 6 is three. The simultaneous presence of three chiasmata and of a complex configuration could prevent the correct disjunction of the bivalent (Lamb et al., 1996) and produce disomic secondary spermatocytes. On the other hand, a reduction in the number of chiasmata or their absence, as could be expected if the inverted regions remained unpaired in a chromosome pair with very short homologous regions, could also result in non-disjunction events (Sybenga, 1975).

No evidence of interchromosomal effects was observed. Taking into account that our data seem to indicate the formation of an inversion loop (homosynapsis) and that ICE has been mainly related to asynapsis or to the existence of heterosynapses between unpaired regions, this result was as expected.

Gamete cytogenetic analyses in reorganization carriers are of help for reproductive counseling in these patients. This study illustrates once more the usefulness of sperm FISH analyses to accurately determine the frequency of chromosomally abnormal gametes produced. The results obtained in this inversion carrier correlate closely with the ones to be expected from a theoretical model of pairing and segregation. In this case, taking into consideration the very high frequency of abnormal sperm produced and the reproductive history of the couple, preimplantation genetic diagnoses (PGD) was advised. In the first PGD cycle, three of seven embryos diagnosed as normal/balanced were transferred resulting in the birth of a healthy boy (unpublished results).

At present, sperm FISH studies cannot be necessarily considered as the most reliable analysis to predict the risk of transmission of chromosome anomalies. However, the information obtained in the study of carriers of structural reorganizations is not superfluous and can contribute to a more accurate reproductive counseling and to a better understanding of the meiotic behavior of chromosomal reorganizations.

Acknowledgements

We thank Servei de Medicina de la Reproducció de l'Institut Universitari Dexeus (Barcelona) for providing the semen sample of the patient.

References

- Ashley T: G-band position effects on meiotic synapsis and crossing-over. *Genetics* 118:307–317 (1988).
- Balkan W, Burns K, Martin RH: Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 3. *Cytogenet Cell Genet* 35:295–297 (1983).
- Bitgood JJ, Shoffner RN, Otis JS, Wang N: Recombinant inversion chromosomes in phenotypically normal chickens. *Science* 215:409–411 (1982).
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F: Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 11:722–726 (1996).
- Blanco J, Rubio C, Simon C, Egozcue J, Vidal F: Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XYY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Hum Genet* 99:413–416 (1997).
- Blanco J, Egozcue J, Clusellas N, Vidal F: FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and interchromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenet Cell Genet* 83:275–280 (1998).
- Chandley AC, McBeath S, Speed RM, Yorston L, Hargreave TB: Pericentric inversion in human chromosome 1 and the risk for male sterility. *J med Genet* 24:325–334 (1987).
- de la Chapelle A, Schröder J, Stenström K, Fellman J, Herva R, Saarni M, Anttolainen I, Tallila I, Tervilä L, Husa L, Tallqvist G, Robson EB, Cook PJL, Sanger R: Pericentric inversions of human chromosomes 9 and 10. *Am J hum Genet* 26:746–766 (1974).
- Colls P, Blanco J, Martínez-Pasarell O, Vidal F, Egozcue J, M rquez C, Guitart M, Templado C: Chromosome segregation in a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(9)(p11q213), analyzed by using sperm karyotyping and two-color fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 99:761–765 (1997).
- De Brackeleer M, Dao T-N: Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6:245–250 (1991).
- Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD: Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 3:585–598 (1997).
- Durban M, Benet J, Boada M, Fernández E, Calafell JM, Lailla JM, Sánchez-García JF, Pujol A, Egozcue J, Navarro J: PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis. *Hum Reprod Update* 7:591–602 (2001).
- Egozcue J, Blanco J, Vidal F: Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 3:441–452 (1997).
- ESHRE PGD, Consortium Steering Committee: ESHRE preimplantation genetic diagnosis consortium: data collection III (May 2001). *Hum Reprod* 17:233–46 (2002).
- Guitart M, Ponsà M, Coll MD, Egozcue J: New data on the synaptic process of *Mesocricetus auratus*: connecting fibers, telomere association and heterosynapsis. *Genetica* 74:105–112 (1987).
- Jaarola M, Martin RH, Ashley T: Direct evidence for suppression of recombination within two pericentric inversions in humans: a new sperm-FISH technique. *Am J hum Genet* 63:218–224 (1998).
- Jenderny J, Gebauer J, Röhrborn G, Rüter A: Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 20. *Hum Genet* 89:117–119 (1992).
- Kaiser P: Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics. *Hum Genet* 68:1–47 (1984).
- 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, Mikelsen M, Hassold TJ, Sherman SL: Susceptible chiasmate configurations of chromosomes 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nature Genet* 14:400–405 (1996).
- Laurie DA, Hultén MA: Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann Hum Genet* 49:189–201 (1985).
- Lejeune J: Autosomal disorders. *Pediatrics* 32:326–337 (1963).
- Martin RH: Cytogenetic analysis of sperm from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(3)(p25q21). *Am J hum Genet* 48:856–861 (1991).
- Martin RH: Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(8)(p23q22). *Cytogenet Cell Genet* 62:199–202 (1993).
- Martin RH, Chernos JE, Lowry RB, Pattinson HA, Barclay L, Ko E: Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 1. *Hum Genet* 93:135–138 (1994).
- Martínez-Flores I, Egozcue J, Cabero LI, García M: Synaptic behaviour of some structural and numerical chromosome anomalies in female and male rats (*Rattus norvegicus*). *Histol Histopathol* 16:701–706 (2001).
- Navarro J, Benet J, Martorell MR, Templado C, Egozcue J: 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 (1993).
- Saadallah N, Hultén M: 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 (1986).
- Sybenga J: The Analysis of Crossing-over, in: *Meiotic Configurations*, pp 165–212 (Springer, Berlin-Heidelberg 1975).
- Templado C, Márquez C, Munné S, Colls P, Martorell MR, Ciepły K, Benet J, Van Kirk V, Navarro J, Estop AM: An analysis of human sperm chromosome aneuploidy. *Cytogenet Cell Genet* 74:194–200 (1996).
- Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, Bonduelle M, Vandervorst M, Van Steirteghem A, Liebaers I: 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 (1999).
- Van Hummelen P, Manchester D, Lowe X, Wyrobek AJ: 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 (1997).
- Vidal F, Templado C, Navarro J, Marina S, Egozcue J: Meiotic and synaptonemal complex studies in a 14/21 translocation carrier. *Int J Androl* 5:21–26 (1982).
- Vidal F, Moragas M, Catalá V, Torelló MJ, Santaló J, Calderón G, Giménez C, Barri PN, Egozcue J, Veiga A: Sphadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. *Hum Reprod* 8:1740–1743 (1993).
- World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 3rd ed (Cambridge University Press, Cambridge 1992).

TREBALL 5

Genetic reproductive risk in inversion carriers.

Fertility and Sterility 85(3):661-666

ANTON Ester, **VIDAL** Francesca, **EGOZCUE** Josep, **BLANCO** Joan

2006

Genetic reproductive risk in inversion carriers

Ester Anton, M.Sc., Francesca Vidal, Ph.D., Josep Egozcue, M.D., Ph.D., and Joan Blanco, Ph.D.

Unitat de Biologia Cel·lular (Facultat de Ciències), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Objective: To evaluate the risk of four inversion carriers for producing unbalanced gametes.

Design: Prospective analysis of sperm nuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH).

Setting: Universitat Autònoma de Barcelona.

Patient(s): Four inversion carriers.

Intervention(s): A semen sample from each patient was collected and prepared for FISH.

Main Outcome Measure(s): The segregation outcome of each inversion was analyzed. The presence of interchromosomal effects (ICE) on chromosomes 13, 18, 21, X, and Y was also evaluated.

Result(s): A variable production of unbalanced gametes, which implies a heterogeneous behavior of the inversions, was detected. This variability seems to be directly related to the size of the inversion, indicating that the production of recombinant gametes in inversion carriers would not be relevant when the inverted segment is smaller than 100 Mbp.

Conclusion(s): Inversions have a well-defined reproductive effect on carriers. Carriers of inversions up to 100 Mbp have a low genetic reproductive risk and would not usually benefit from preimplantation genetic diagnosis. (Fertil Steril® 2006;85:661–6. ©2006 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: FISH, spermatozoa, inversions, recombinant products, ICE

For a long time it has been known that the presence of structural chromosomal abnormalities is associated with fertility problems in reorganization carriers. In affected couples, it is possible to estimate the risk of producing offspring affected by chromosomal abnormalities derived from the meiotic behavior of the reorganized chromosomes.

In male carriers, sperm fluorescence in situ hybridization (FISH) studies to evaluate the production of abnormal gametes allow counselors to offer patients better reproductive genetic advice. Segregation studies have related the percentage of unbalanced spermatozoa to the characteristics of the reorganization: reciprocal translocation carriers produce a high proportion of unbalanced spermatozoa (around 50%) in most cases, although some studies have reported percentages further distanced from this value (1). This variability has been directly related to the chromosomes and breakpoints involved (2). Robertsonian translocation analyses have revealed a homogeneous behavior, with the production of 10% to 15% unbalanced gametes (3). Although not as numerous as in translocation carriers, sperm studies in inversion carriers have described a wide variability in the production of recombinant gametes, with cases where no recombinant products were observed and others with percentages reaching 38% (4). This variability highlights the divergent effect

that inversions can have on the reproductive fitness of the couples.

To achieve a better characterization of the meiotic behavior of inversions, multicolor FISH on decondensed sperm nuclei was used to analyze the segregation products in four cases: three carriers of pericentric inversions [46,XY,inv(2)(p11.2q13); 46,XY,inv(4)(p16q21); 46,XY,inv(10)(p13q22.3)] and the carrier of a paracentric and a pericentric inversion [46,XY,inv(4)(p14p15.3),inv(Y)(p11.1q11.23)].

Other than segregation studies, the possible influence of inversions on the meiotic segregation of other chromosome pairs (interchromosomal effects) (5) was also evaluated for chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. The incidence of this phenomenon in inversion carriers still deserves attention because it has been detected in some cases (6) but not in others (7, 8).

The final aim of our study was to determine the usefulness of sperm FISH studies in inversion carriers to help reproductive counselors offer more accurate genetic counseling to these couples.

MATERIALS AND METHODS

Four patients aged between 29 and 55 years were enrolled in the study. Seminal parameters are detailed in Table 1 (9). Protocols used were approved by our institutional ethics committee, and the patients gave their informed consent in writing.

Semen samples were obtained by masturbation and were subsequently fixed with methanol/acetic acid (3:1). Sperm

Received May 31, 2005; revised and accepted September 7, 2005.

This work was funded by Project SAF2003-04312, DGI, Ministerio de Ciencia y Tecnología. E.A. was the recipient of FI/FIAP grant 2001FI/00457 from the Direcció General de Recerca Generalitat de Catalunya, Spain.

Reprint requests: Dr. Joan Blanco, Unitat de Biologia Cel·lular (Facultat de Ciències), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Spain (FAX: +34-93-581-22-95; E-mail: joan.blanco@uab.es).

0015-0282/06/\$32.00

doi:10.1016/j.fertnstert.2005.09.023

Fertility and Sterility® Vol. 85, No. 3, March 2006

Copyright ©2006 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.

661

TABLE 1

Characteristics of the patients studied.		
Karyotype	Age (y)	Semenogram
Case 1 46,XY,inv(2)(p11.2q13)	38	OA
Case 2 46,XY,inv(4)(p16q21)	36	OA
Case 3 46,XY,inv(4)(p14p15.3),inv(Y)(p11.1q11.23)	29	OA
Case 4 46,XY,inv(10)(p13q22.3)	55	N

Anton. Inversions size and genetic reproductive risk. Fertil Steril 2006.

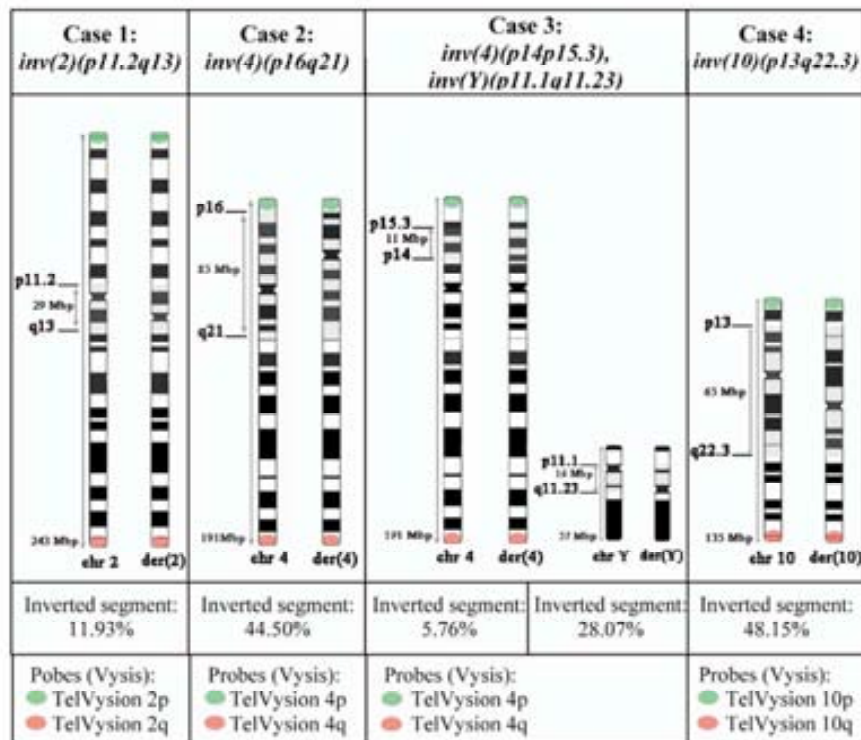
nuclei were decondensed by slide incubation in 5 mM dithiothreitol (DTT) and 1% Triton X-100 and processed for FISH analysis (10).

Segregation studies were performed using a specific dual-color FISH approach according to the following combination of probes (Fig. 1):

- *Case 1*, 46,XY,inv(2)(p11.2q13): TelVysion 2p, Spectrum Green (Vysis Inc.; Downers Grove, IL) and TelVysion 2q, Spectrum Orange (Vysis).
- *Case 2*, 46,XY,inv(4)(p16q21): TelVysion 4p, Spectrum Green (Vysis) and TelVysion 4q, Spectrum Orange (Vysis).
- *Case 3*, 46,XY,inv(4)(p14p15.3),inv(Y)(p11.1q11.23): Segregation study of inv(4)(p14p15.3) using the same probes as in case 2; Y-chromosome segregation evaluated by triple-color FISH for chromosomes 18, X, and Y.
- *Case 4*, 46,XY,inv(10)(p13q22.3): TelVysion 10p, Spectrum Green (Vysis) and TelVysion 10q, Spectrum Orange (Vysis).

FIGURE 1

Ideograms of the reorganized chromosomes from the four cases analyzed. Details about breakpoints, size and percentage of the inverted segment, and DNA probes used are also indicated.



Anton. Inversions size and genetic reproductive risk. Fertil Steril 2006.

TABLE 2**Results obtained in segregation studies.**

Inversion	Normal n (%)	Recombinant n (%)	Diploid/disomic ^a n (%)	Total spermatozoa
Case 1 inv(2)(p11.2q13)	5,364 (98.24)	0	4 (0.07)	5,460
Case 2 inv(4)(p16q21)	6,154 (96.07)	50 (0.78)	9 (0.14)	6,406
Case 3 inv(4)(p14p15.3)	7,917 (97.04)	3 (0.03)	91 (1.12) ^b	8,158
Case 4 inv(10)(p173q22.3)	10,085 (94.05)	366 (3.41)	13 (0.12)	10,723

^a For the chromosome implicated in the inversion studied.

^b Statistically significant difference versus control ($P < .05$) (Blanco et al. 1997).

Anton. Inversions size and genetic reproductive risk. Fertil Steril 2006.

The incidence of numerical chromosomal anomalies for chromosomes 13, 18, 21, X, and Y was evaluated using a dual-color FISH assay for chromosomes 13 (LSI 13q14, Spectrum Green; Vysis) and 21 (LSI 21q22, Spectrum Orange; Vysis) and a triple-color FISH assay with a combination of centromeric probes for chromosomes 18 (CEP 18, Spectrum Aqua; Vysis), X, (CEP X, Spectrum Green; Vysis) and Y (CEP Y, Spectrum Orange; Vysis).

The protocol for probes and sample denaturation, incubation, and detection was as standardized in our laboratory in accordance to the manufacturer's instructions (Vysis). Analyses were carried out using an Olympus BX60 epifluorescence microscope equipped with a triple-band pass filter for DAPI/Texas Red/FITC and single-band pass filters for FITC, Texas Red and Aqua. Standard assessment criteria were followed, as previously described by elsewhere (11).

Data were statistically analyzed under the advice of the statistics service of the university with the chi-square test. $P < .05$ was considered statistically significant.

RESULTS

In the segregation analysis, from 5460 to 10,723 spermatozoa were analyzed per patient. A high prevalence of spermatozoa with a combination of signals corresponding to normal or inverted chromosomes was observed in all cases (94% to 98.24%) (Table 2; column 2).

Recombination products were absent in case 1, whereas cases 2, 3, and 4 showed percentages of 0.78%, 0.03%, and 3.41%, respectively (see Table 2; column 3). Diploid/disomic sperm were indistinguishable using this experimental approach (see Table 2; column 4). This value increased in a statistically significant manner ($P < .05$) in case 3 (1.12%) as compared with the percentage of diploid sperm described in controls (0.24%) (12).

Diploidy frequencies were more precisely assessed by the interchromosomal effects (ICE) evaluation (Tables 3 and 4). No statistically significant differences were observed in cases 1, 2, or 4 as compared with controls (0.24%) (12), whereas case 3 displayed a statistically significant diploidy

TABLE 3**Results obtained in the study of aneuploidies for chromosomes 13 and 21.**

Inversion	Chromosome 13 disomy n (%)	Chromosome 21 disomy n (%)	Diploidy n (%)	Sperm evaluated
Case 1 inv(2)(p11.2q13)	17 (0.17)	17 (0.17)	11 (0.11)	10,128
Case 2 inv(4)(p16q21)	5 (0.09)	2 (0.04)	6 (0.11)	5,359
Case 3 inv(4)(p14p15.3)	26 (0.26) ^b	22 (0.22)	83 (0.83) ^b	10,035
inv(Y)(p11.1q11.23)				
Case 4 inv(10)(p13q22.3)	7 (0.07)	7 (0.07)	15 (0.15)	10,121
	93 (0.10)	—	—	90,474
Controls ^a	—	91 (0.37)	—	28,044
	—	—	126 (0.24)	51,368

^a Data from Blanco et al. 1997 (diploidy), Blanco et al. 1998 (disomy 21), and Soares et al. 2001 (disomy 13).

^b Statistically significant difference versus control ($P < .05$).

Anton. Inversions size and genetic reproductive risk. Fertil Steril 2006.

TABLE 4**Results obtained in the study of aneuploidies for chromosomes 18, X, and Y.**

Inversion	Sex chromosome disomy n (%)			Total	Chromosome 18 disomy n (%)	Diploid n (%)	Total sperm evaluated
	XX	YY	XY				
Case 1 inv(2)(p11.2q13)	1 (0.01)	3 (0.03)	14 (0.14)	18 (0.18)	0	10 (0.10)	10,064
Case 2 inv(4)(p16q21)	1 (0.01)	3 (0.03)	4 (0.04)	8 (0.08)	0	23 (0.23)	10,121
Case 3 inv(4)(p14p15.3)	17 (0.17)	23 (0.23)	54 (0.54) ^b	94 (0.92) ^b	9 (0.09)	70 (0.69) ^b	10,163
inv(Y)(p11.1q11.23)							
Case 4 inv(10)(p13q22.3)	4 (0.04)	8 (0.08)	3 (0.03)	15 (0.15)	1 (0.01)	11 (0.11)	10,064
Controls ^a	49 (0.10)	83 (0.16)	56 (0.11)	188 (0.37)	48 (0.09)	126 (0.24)	51,368

^a Data from Blanco et al. 1997.^b Statistically significant differences versus control ($P < .05$).Anton. Inversions size and genetic reproductive risk. *Fertil Steril* 2006.

increase both in the triple-color FISH evaluation for chromosomes 18, X, and Y (0.69%; $P < .05$) and in the dual-color FISH evaluation for chromosomes 13 and 21 (0.83%; $P < .05$). These values were also statistically significantly lower than the percentage of diploid/disomic spermatozoa obtained in the segregation study (see Table 2: 1.12%, $P < .05$).

Regarding aneuploidy evaluation, no statistically significant differences for chromosomes 13, 18, 21, X, and Y as compared with controls (12–14) were observed in cases 1, 2, and 4. A statistically significant increase of chromosome 13 disomies (0.26%; see Table 3), XY disomies (0.54%; see Table 4), and total sex-chromosome disomies (0.92%; see Table 4) were detected in case 3 ($P < .05$).

DISCUSSION

Sperm FISH studies of reorganization carriers allow for an accurate, fast, and specific analysis of the meiotic behavior of different types of chromosomal rearrangements. The convenience of their use previous to a preimplantation genetic diagnosis cycle is a matter of discussion in the literature regarding the usefulness of the information obtained for genetic counseling. In this sense, the study of the meiotic behavior of inversions would be an important source of information on the utility of sperm FISH studies of inversion carriers for a better assessment of the affected couples.

Results obtained showed the production of almost no unbalanced gametes in two cases where inversions were very small (case 1 and case 3: 29 and 11 Mbp in length, respectively), whereas few recombinant products were detected in case 2 (inverted segment: 85 Mbp in length) and case 4 (65 Mbp in length) (see Fig. 1). The shorter inversions also corresponded to smaller proportions of the chromosomes implicated (11.93% in case 1 and 5.76% in case 3); but in cases 2 and 4 the inversion corresponded to almost half of the total chromosome length (44.5% and 48.14%, respectively).

Besides these cases, another sperm FISH study was previously performed by our group in a larger inversion carrier who carried a 180-Mbp inversion on chromosome 6 (around 88.24% of total length of the chromosome) (7). In this case, a much higher amount of recombinant gametes (37.85%) was detected.

These studies are representative of the heterogeneous behavior of inversions. Nevertheless, from these data and others published in the literature (4), a nonrandom distribution of the percentages of recombinant gametes produced becomes evident: no recombinant gametes are expected in carriers of small inversions (inverted segments shorter than 50 Mbp, which correspond to up to 40% of the chromosome), few recombinant gametes in inversion carriers of segments around 50 Mbp in length (corresponding to 40% to 50% of chromosome length), and finally, a high number of recombinant gametes in large inversion carriers (inverted

segments longer than 100 Mbp and involving at least 50% of the chromosome). Therefore, the genetic risk of inversion carriers would be clearly related to the size of each inverted segment, and only inversions of a certain length (more than 100 Mbp long) would have a significant effect on the reproductive fitness of the carrier.

On the other hand, the reproductive fitness of the inversion carriers could also be compromised by the occurrence of ICE events. This phenomenon did not appear to have any significant consequences in cases 1, 2, and 4, but a statistically significant increase of disomies for sex chromosomes and chromosome 13 was detected in case 3. This case also showed significantly increased diploidy rates, which, when compared with the percentage of spermatozoa classified as diploid/disomic in the segregation study, revealed a high frequency of chromosome 4 disomies.

In the literature, several sperm segregation studies in carriers of inversions ranging from 7 to 180 Mbp also evaluated the occurrence of ICE as an alternative source of chromosomal abnormalities, but none of them found significant results (7–8, 15–23). Only the study performed by Amiel et al. (6) in a heterozygous *inv(9qh+)* carrier detected statistically significant increased frequencies of aneuploidies for the chromosomes analyzed; they speculated about the relation of this phenomenon with the presence of a great difference between both polymorphic heterochromatic regions.

Hence, from all of these data, it seems that ICE would not be directly related to the size of the inverted segments. In our case, the ICE detected in case 3 could be related to several factors. First, it is noteworthy that the inversion reorganized the Y chromosome, placing the centromere next to the Yq13 heterochromatic region. Position effects on gene expression by heterochromatization have been clearly demonstrated (i.e., eye color in *Drosophila*). If a similar phenomenon could affect the capacity of orientation of the centromere of the Y chromosome, it would be an open question that could explain the presence of sex-chromosome aneuploidies.

Second, it is also important to note that the Yq region is an area rich in genes related to spermatogenesis (24). It has been observed that 5% to 10% of infertile men with idiopathic oligozoospermia have deletions of Yq sequences (25). Chromosomal reorganizations affecting the Yq region could increase the probability of disruption of these genes, resulting in a variation of the microtesticular environment and the production of meiotic disturbances. Furthermore, infertile men with abnormal seminal parameters have a higher incidence of aneuploidies than in the general population (26). These data show that not all cases with increased aneuploidy frequencies reflect an interchromosomal effect related to a reorganization; other individual factors could also cause aneuploidy. In case 3, the high frequency of aneuploidies could be more related to the genetic characteristics of the patient than to the classic interpretation of ICE.

From these facts, ICE appears to be an extra source of aneuploidies to be taken into account in the genetic counseling of infertile patients requesting information concerning their infertility.

Finally, data obtained in this work regarding the production of unbalanced recombinant gametes in inversion carriers underline the usefulness of genetic advice in these cases, based on the size of the inversion. Because no recombinant products are expected in small inversion carriers (inverted segments up to 100 Mbp), it appears that this group of patients would not benefit much from a reproductive assessment through preimplantational genetic diagnosis. Nevertheless, sperm studies in carriers of inversion of different sizes will help to elucidate this topic further.

Acknowledgments: The authors thank the Instituto Valenciano de Infertilidad (Valencia), Centro de Patología Celular y Diagnóstico Prenatal (Barcelona), Institut Marquès (Barcelona), and Hospital Clínic de Barcelona (Barcelona) for providing the semen samples of the patients studied.

REFERENCES

- Sarrate Z, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Egozcue J, Vidal F. FISH studies of chromosome abnormalities in germ cells and its relevance in reproductive counseling. *Asian J Androl* 2005;7:227–36.
- Sybenga J. Meiotic configurations. A source of information for estimating genetic parameters. New York: Springer-Verlag, 1975.
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod* 2004;19:1345–51.
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:297–304.
- Lejeune J. Autosomal disorders. *Pediatrics* 1963;32:326–37.
- Amiel A, Sardos-Albertini F, Feijgin MD, Sharony R, Diukman R, Bartoov B. Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (*inv9*) and C-heterochromatin. *J Hum Genet* 2001;46:245–50.
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion *inv(6)(p23q25)* carrier using FISH on decondensed sperm nuclei. *Cytogenet Genome Res* 2002;97:149–54.
- Mikhaail-Philips MM, Ko E, Chernos J, Greene C, Rademaker A, Martin RH. Analysis of chromosome segregation in sperm from a chromosome 2 inversion heterozygote and assessment of an interchromosomal effect. *Am J Med Genet* 2004;127A:139–43.
- World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
- Vidal F, Moragas M, Català V, Torelló MJ, Santaló J, Calderón G, et al. Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. *Hum Reprod* 1993;8:1740–3.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1996;11:722–6.
- Blanco J, Rubio C, Simon C, Egozcue J, Vidal F. Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XXX male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Hum Genet* 1997;99:413–6.
- Blanco J, Gabau E, Gómez D, Baena N, Guitard M, Egozcue J, Vidal F. Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in a population with high prevalence of Down syndrome: increased incidence in cases of paternal origin. *Am J Hum Genet* 1998;63:1067–72.

14. Soares SR, Templado C, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Numerical chromosome abnormalities in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 of paternal origin: generalised tendency to meiotic non-disjunction. *Hum Genet* 2001;108:134–9.
15. Balkan W, Burns K, Martin RH. Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 3. *Cytogenet Cell Genet* 1983;35:295–7.
16. Martin RH. Sperm chromosome analysis in a man heterozygous for a paracentric inversion of chromosome 7 (q11q22). *Hum Genet* 1986;73:97–100.
17. Martin RH. Cytogenetic analysis of sperm from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(3)(p25q21). *Am J Hum Genet* 1991;48:856–61.
18. Martin RH. Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(8)(p23q22). *Cytogenet Cell Genet* 1993;62:199–202.
19. Martin RH. Sperm chromosome analysis in a man heterozygous for a paracentric inversion of chromosome 14 (q24.1q32.1). *Am J Hum Genet* 1999;64:1480–4.
20. Jendery J, Gebauer J, Röhrborn G, Rüger A. Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 20. *Hum Genet* 1992;89:117–9.
21. Navarro J, Benet J, Martorell MR, Templado C, Egozcue J. Segregation analysis in a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 7 (p13;q36) by sperm chromosome studies. *Am J Hum Genet* 1993;53:214–9.
22. Martin RH, Chernos JE, Lowry RB, Pattinson HA, Barclay L, Ko E. Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 1. *Hum Genet* 1994;93:135–8.
23. Colls P, Blanco J, Martínez-Pasarell O, Vidal F, Egozcue J, Márquez C, Guitard M, Templado C. 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* 1997;99:761–5.
24. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996;5:933–43.
25. Gazvani MR, Wilson ED, Richmond DH, Howard PJ, Kingsland CR, Lewis-Jones DI. Evaluation of the role of mitotic instability in karyotypically normal men with oligozoospermia. *Fertil Steril* 2000;73:51–5.
26. Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *J Reprod Fertil* 2001;121:655–66.

TREBALL 6

Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review.

Cytogenetics and Genome Research 111(3-4):297-304

ANTON Ester, BLANCO Joan, EGOZCUE Josep, VIDAL Francesca

2005

Analysis of Human Germ Cells in Individuals with Somatic Chromosome Abnormality

Cytogenet Genome Res 111:297–304 (2005)
DOI: 10.1159/000086903

Cytogenetic and
Genome Research

Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review

E. Anton, J. Blanco, J. Egozcue, F. Vidal

Unitat de Biologia Cel·lular, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona (Spain)

Manuscript received 15 October 2004; accepted in revised form for publication by R. Martin, 22 February 2005.

Abstract. The risk of producing unbalanced gametes in heterozygous inversion carriers mostly depends on the occurrence of recombination events within the inverted segment. Recombination determines the possibility of producing chromosomes with duplications/deficiencies (pericentric inversions) or with duplications/deficiencies which furthermore appear as dicentric and acentric fragments (paracentric inversions). In this work, a general description of the close relationship between the occurrence of crossovers in pericentric and paracentric inversions and the final segregation outcome is presented. After this introduction, a compilation of inversion segregation data and interchromosomal effect results from previously published sperm studies have been reviewed. Segregation results indicate a great heterogeneity in the percentage of unbalanced gametes,

from 0 to 37.38%. The size of the inverted segments and their proportion in the chromosome are two parameters closely related with the incidence of recombination ($P < 0.0001$; using a quadratic model and Pearson's correlation test). These results suggest that the production of a significant level of unbalanced gametes would require a minimum inversion size of 100 Mbp and the inversion of at least 50% of the chromosome. Interchromosomal effects are seldom observed in chromosomal inversions. Finally, implications of the meiotic behavior of the inversions in the progeny of the carriers and the incorporation of sperm FISH segregation analysis for reproductive genetic counseling are discussed.

Copyright © 2005 S. Karger AG, Basel

Inversions are structural intrachromosomal reorganizations, resulting after two breaks in the same chromosome and an exchange of the distal fragments between the proximal fragments before repair of the naked ends. According to the position of the centromere in the reorganized chromosome, inversions are classified as pericentric (centromere located within the inverted segment) or paracentric (centromere placed outside of the inverted segment).

In humans, pericentric inversions are found with a frequency of 1–2% (de la Chapelle et al., 1974; Kaiser, 1984) although most of them affect chromosome 2 or the heterochromatic

regions of chromosomes 1, 9, 16 and Y and are considered as polymorphisms. The incidence of paracentric inversions is much lower, with values ranging from 0.002 to 0.049% (Van Dyke et al., 1983; Ferguson-Smith and Yates, 1984; Warburton, 1984; Fryns et al., 1986; Jacobs et al., 1992).

Generally, reorientation of a chromosome region in the opposite direction does not alter the function of the genes involved; thus, inversion carriers do not usually show any phenotypic alteration. Only when a critical gene is disrupted or when its relative position to other regulation genes or imprinting centers is substantially changed, the relocation could lead to pathological consequences (Greger et al., 1997; Concolino et al., 2002; Saito-Ohara et al., 2002).

Nevertheless, the reproductive capacity of the heterozygous carriers can be compromised as a consequence of meiotic disturbances generated by the reorganization, which can lead to spermatogenic failure and/or to the production of chromosomally unbalanced gametes. Actually, De Brackeleer and Dao (1991) detected a 13-times higher frequency of inversion carriers among infertile men than in the general population.

Supported by Project SAF2003-04312 (DGI, Ministerio de Ciencia y Tecnología). E.A. is a recipient of a FI/FIAP grant (2001FI/00457, Direcció General de Recerca Generalitat de Catalunya, Spain).

Request reprints from Prof. Francesca Vidal, Unitat de Biologia Cel·lular Edifici C (Facultat de Ciències), Universitat Autònoma de Barcelona ES-08193-Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona (Spain) telephone: +34 93 581 27 81; fax: +34 93 581 22 95 e-mail: francesca.vidal@uab.es

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2005 S. Karger AG, Basel
1424-8581/05/1114-0297\$22.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/cgr

Outline of the meiotic behavior of inversions

The cytogenetic characteristics of each inversion will determine the synaptic behavior of the homologs involved, thus conditioning the meiotic process and the production of recombinant gametes.

During meiosis, heterozygote inversion-pairing mostly depends on the length of the inverted segment (Kaiser, 1984) and this feature is determinant for the configuration adopted by the bivalent. Short inversions usually have difficulties for aligning homologous regions and often remain as asynaptic "balloons" (Fig. 1.1) or resolve this situation by heterosynapsis (Winsor et al., 1978). Otherwise, the homologous pairing of the whole inverted chromosome with its normal homolog requires the formation of a structure called inversion loop which implies a major length of the inverted segment. The inversion loop configuration aligns all the homologous regions by twisting and folding of the inverted segment (Fig. 1.2). Such structures have been observed in several meiotic studies in the pachytene stage either in humans (Guichaoua et al., 1985; Saadallah and Hultén, 1986; Chandley et al., 1987; Gabriel-Robez and Rumppler, 1994; Cheng et al., 1999) or in other species (Ashley et al., 1981; Poorman et al., 1981; Chandley, 1982; Tease and Fisher, 1986; Rumppler et al., 1995; Martínez-Flores et al., 2001). When the inverted region is very long and involves most of the chromosome length, synapsis of the inversion with its homologous non-inverted segment prevails over pairing of the terminal segments. In these cases, the terminal noninverted segments can remain unpaired (Fig. 1.3) or aligned through heterosynapsis and no inversion loop is formed.

Furthermore, other factors such as the location of the breakpoints involved in the rearrangement (G-light band or G-dark band) and chromatin packaging seem to affect the chance of the loop formation (Ashley, 1988; de Perdigo et al., 1989). Since breaks in G-dark bands result in the production of large asynaptic regions, they would prevent the formation of chiasmata in hot spots located in the vicinity of the break.

Homologous synapsis is necessary for recombination events. In inversions, the formation of chiasmata within the inverted segment determines the possibility of producing chromosomes with duplications/deficiencies (pericentric inversions) or with duplications/deficiencies which furthermore appear as dicentric and acentric fragments (paracentric inversions) and, therefore, unbalanced gametes. When homosynapsis does not take place, the occurrence of crossing-over is inhibited and no unbalanced recombinant gametes are produced. Alternatively, asynapsis can obstruct a proper bivalent disjunction, thus favoring aneuploidy production (so-called interchromosomal effect) or even causing meiotic failure (Miklos, 1974; Chaganti et al., 1980). Synaptic adjustment appears to be a rescue mechanism characterized by resolving asynapsis by nonhomologous synapsis, to prevent meiotic arrest and avoid apoptosis (Saadallah and Hultén, 1986; Guitart et al., 1987).

To sum up from all of these assumptions, we could expect that during gametogenesis, consequences of inversions would be reflected as a risk of producing meiotic failure, unbalanced recombinant gametes or aneuploidy for the chromosomes not involved in the reorganization.

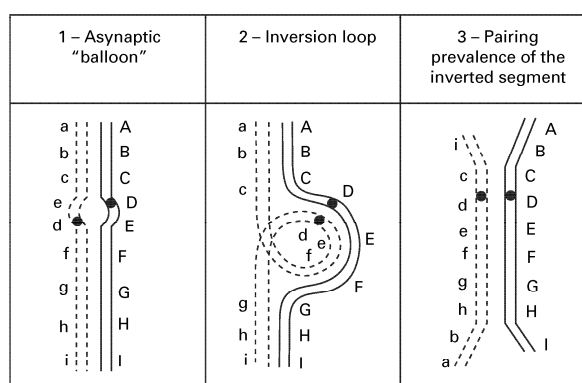


Fig. 1. Pairing possibilities of an inversion depending on the length of the inverted segment.

Recombination and the formation of unbalanced gametes

The production of balanced/unbalanced gametes depends on the number and position of crossovers inside the pairing loop:

Pericentric inversions (Fig. 2). In this kind of rearrangement recombination gives rise to the production of chromosomes with duplications and deficiencies:

a) The formation of one or more chiasmata outside the loop does not have any effect on the bivalent resolution, even when other chiasmata are present in the inverted loop.

b) If a single chiasma is formed within the inversion loop, the two nonimplicated chromatids would lead to a normal and an inverted product, whereas the other two would carry duplications and deficiencies (Fig. 2.1).

c) The products generated by the formation of more than one chiasma within the loop would depend on the chromatids involved: If two chiasmata involve the same two chromatids, one would cancel the other and only normal/inverted chromatids would be formed (Fig. 2.2). If one chromatid is common in both chiasmata (Fig. 2.3), the resolution would be the same as that described in (b), and if no chromatid is common only chromatids with duplications/deficiencies would be formed (2:2) (Fig. 2.4).

d) The formation of more than two chiasmata would result in combinations of the same previous events.

In pericentric inversions, the duplicated-deficient chromatids resulting from the recombination process can differ in length from the original ones when the noninverted segments outside the inversion loop are unequal in size. The chiasma location or the centromere position does not affect this variation.

Paracentric inversions (Fig. 3). In this case, recombination can result in the formation of acentric and dicentric chromosomes which contain duplications and deficiencies:

a) The formation of one or more chiasmata outside the loop does not have any effect on the bivalent resolution and the ratio of normal:inverted chromosomes is 1:1.

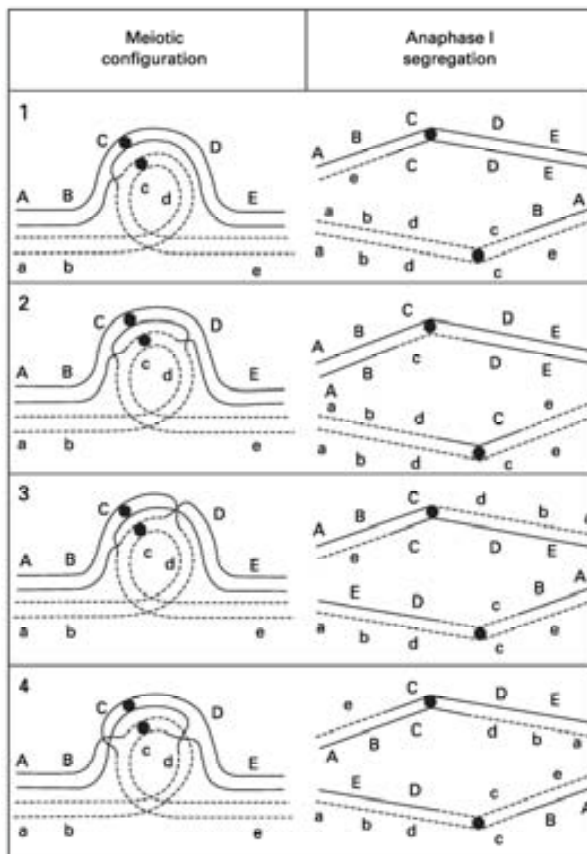


Fig. 2. Meiotic configuration of a pericentric inversion with different recombination points and their respective anaphase I segregation.

b) If a single chiasma is formed within the inversion loop, four different products would be generated: a normal and an inverted chromatid (from the two chromatids not involved in the chiasma) and a dicentric and an acentric one (from the implicated chromatids) (Fig. 3.1). Whereas the acentric will not be able to orient itself and will probably be lost or incorporated by chance into a gamete, the dicentric chromatid will form a bridge during anaphase I. During segregation this structure could either break into two partial chromatids (carriers of duplications or deficiencies), maintain the chromosomes together during meiosis II (thus favoring the production of a diploid cell), be included in one of the resulting products (as a stable structure by the inactivation of one of the centromeres), or be excluded from the final outcome.

c) The products generated by the formation of more than one chiasma within the loop would depend on the chromatids affected. If two chiasmata involve the same two chromatids one would cancel the other and only normal/inverted chromatids would be formed. If one chromatid is common to both chiasmata, the resolution would be the same described in (b), and if no chromatid is common only acentric and dicentric fragments

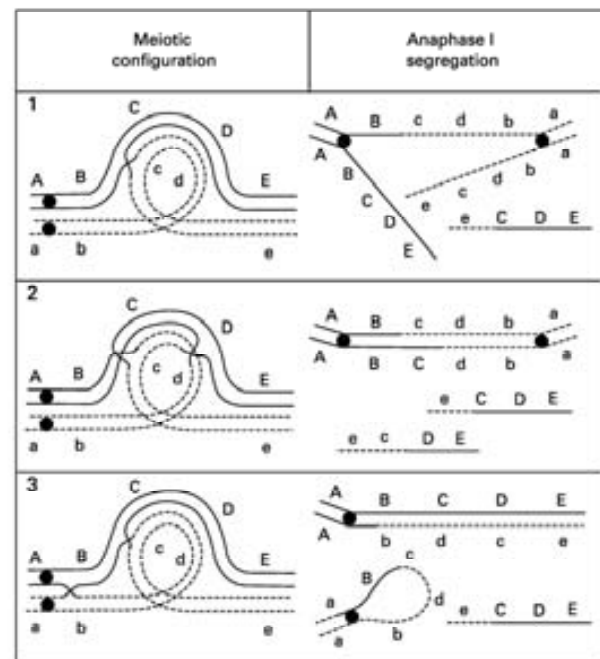


Fig. 3. Meiotic configuration of a paracentric inversion with different recombination points and their respective anaphase I segregation.



Fig. 4. Breakage and reunion between homologous chromatids in a U-loop exchange.

would be formed (1:1) (Fig. 3.2). In this case, a double chromatid bridge would be formed during anaphase I.

d) The formation of one chiasma within the loop and another outside would have a combined effect if the outer chiasma is located in the interstitial segment and both have only one common chromatid (Fig. 3.3). Then, the same products described in (b) would be generated but in this case, the anaphase bridge would appear at meiosis II whereas at anaphase I a loop between sister chromatids would be formed.

e) The formation of more than two chiasmata would result in combinations of the same previous events.

Other mechanisms of generating unbalanced gametes

Abnormal processes involving chromatid breakage and reunion can rarely occur. This is the case of U-type exchanges where a double chromatid break proceeds with reunion which, instead of continuing in the same way towards the other chromatid, inverts the direction of the chromosome (Fig. 4). Although the frequency of this phenomenon is unknown, its occurrence would result in a duplication of the segment limited by the U-exchange and a deletion of the rest. In particular, the

Table 1. Results of chromosome segregation and ICE in inversion carriers reported by different authors

Author	Inversion ^a	Method ^b	No. sperm evaluated	% Sperm recombinant	Inverted seg. size (Mbp)	Chr. size (Mbp)	% Inverted segment
Pericentric Inversion:							
Balkan et al., 1983	inv(3)(p11q11)	1	111	0	7	200	3.5
Martin, 1991	inv(3)(p25q21)	1	144	30.8	124	200	62
Martin, 1993	inv(8)(p23q22)*	1	166	11.4	105	146	71.92
Jenderny et al., 1992	inv(20)(p13q11.2)	1	26	0	37	63	58.73
Navarro et al., 1993	inv(7)(p13q36)	1	140	25	118	158	74.68
Martin et al., 1994	inv(1)(p31q12) [†]	1	159	0	75	246	30.49
Colls et al., 1997	inv(9)(p11q13)	1	314	0	20	136	14.71
Jaarola et al., 1998	inv(1)(p31q12) [†]	2	6006	0.38	75	246	30.49
	inv(8)(p23q22)*	2	3168	13.10	105	146	71.92
Anton et al., 2002	inv(6)(p23q25)	2	10049	37.85	150	170	88.24
Yakut et al., 2003	inv(1)(p34q21)	2	1636	16	118	246	47.97
Mikhaail-Philips et al., 2004	inv(2)(p23q33)	2	1005	34.5	180	243	74.07
Anton et al. (unpublished)	inv(2)(p11.2q13)	2	5460	0	29	243	11.93
	inv(4)(p16q21)	2	6406	0.78	85	191	44.50
	inv(10)(p13q22.3)	2	10723	3.41	65	135	48.15
Paracentric Inversions:							
Martin, 1986	inv(7)(q11q22)	1	94	0	50	158	31.65
Brown et al., 1998	inv(9)(q32q34.3)	3	282	0	32	136	23.53
Martin, 1999	inv(14)(q24.1q32.1)	1	120	0	27	105	25.71
Devine et al., 2000	inv(2)(q14.2q24.3)	2	496	0.81	49	243	20.16
Anton et al. (unpublished)	inv(4)(p14p15.3)	2	8158	0.03	11	191	5.76

^a *[†] = same patients.
^b 1 = Sperm chromosomes; 2 = Fluorescence in situ hybridization; 3 = Sperm-typing.

occurrence of this process within the inversion loop would generate acentric and dicentric chromatids in pericentric inversions and chromatids with duplications and deficiencies in paracentric inversions.

Sperm studies

Segregation outcome

Throughout the years, several approaches have been used to evaluate the segregation products of these reorganizations. First, the use of the hamster test enabled the analysis of sperm chromosome complements from several paracentric (Martin, 1986, 1999) and pericentric inversion carriers (Balkan et al., 1983; Martin, 1991, 1993; Jenderny et al., 1992; Navarro et al., 1993; Martin et al., 1994; Colls et al., 1997) with a range of 26–314 spermatozoa analyzed per patient. This technique permits not only the segregation analysis of the inverted chromosomes but also the evaluation of all the other chromosomes of each cell, providing extensive information about structural and numerical abnormalities. Nevertheless, the cost and difficulty of this method results in the analysis of a small number of spermatozoa in each case (Table 1).

Another methodology used in sperm segregation studies was sperm typing (Li et al., 1988). The application of this technique in inversion carriers was employed by Brown et al. (1998), who analyzed 282 spermatozoa from an inv(9)(q32q34.3) carrier (Table 1). The complexity of this method is also a limiting factor for a wide analysis of cells.

Finally, the use of fluorescent DNA probes labeled with different fluorochromes to differentiate the segregation products through color-spot patterns was put into practice. The applica-

tion of the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique on decondensed sperm heads has allowed researchers to perform a large number of studies of different types of chromosome rearrangements including paracentric (Devine et al., 2000) and pericentric inversions (Jaarola et al., 1998; Anton et al., 2002; Yakut et al., 2003; Mikhaail-Philips et al., 2004). Usually, the combination of probes used in FISH studies of sperm from inversion carriers consists of labeling the p and q telomeres of the inverted chromosome with two different colors. This approach allows for the identification of both ends of the chromosome and, when recombination events occur inside the inverted segment, the resulting color pattern will indicate the presence or absence of the corresponding telomeres (Fig. 5).

The combination of these techniques allowed obtaining a substantial amount of data. Table 1 is a summary of results obtained by different authors who have performed sperm segregation studies in a wide range of paracentric and pericentric inversions.

This compilation displays great heterogeneity in the number of spermatozoa analyzed per patient (from 26 to 10,723 spermatozoa) and also in the percentage of recombinant gametes: while several studies did not find any recombinant gametes (Balkan et al., 1983; Martin, 1986, 1999; Jenderny et al., 1992; Martin et al., 1994; Colls et al., 1997; Brown et al., 1998; Anton et al., unpublished), percentages of 0.38–37.87% recombinants for pericentric inversions and 0.03–0.81% recombinants for paracentric inversions were observed by others (see Table 1).

As previously stated, the size of an inverted segment seems to be closely related to recombination. To shed more light on this subject, we have calculated the inverted segment size

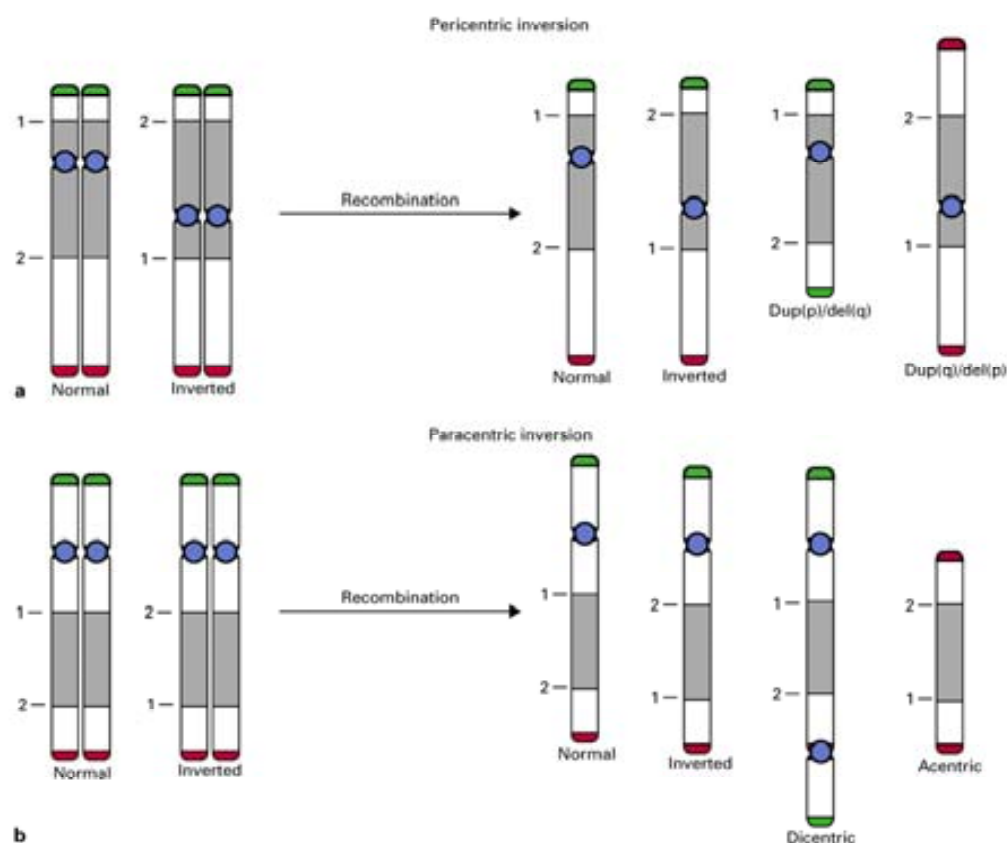


Fig. 5. Signal patterns observed in pericentric and paracentric inversions after the occurrence of a single recombination event in the inverted segment measured by MultiFISH combining subtelomeric (p-green; q-red) and centromeric (blue) probes.

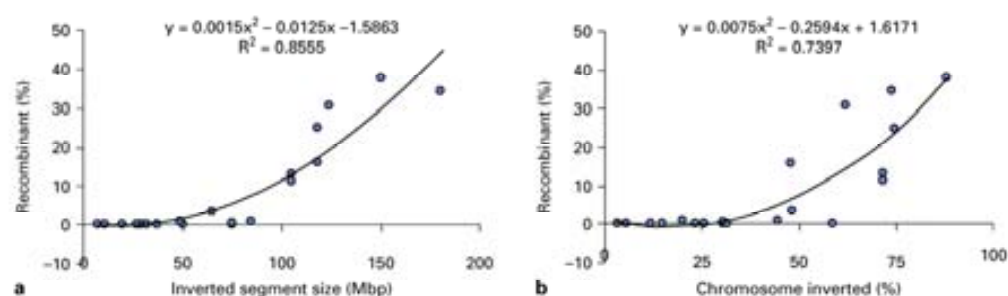


Fig. 6. Graphic representation (using a quadratic model) of the relationship between: **(a)** the size of the inverted segments (Table 1; column 6) and the percentages of recombinant gametes (Table 1; column 5); **(b)** the proportion of the inverted segments (Table 1; column 8) and the percentages of recombinant gametes (Table 1; column 5).

(Mbp) of all the inversions contained in Table 1 (range of 7–180 Mbp), and we have made a statistical comparison between these values and the percentages of recombinant gametes. The results reflected a Pearson correlation ($P < 0.0001$) between both parameters ($R^2 = 0.8555$, using a quadratic model;

Fig. 6a) which confirms the idea that the size of the inverted segment and, therefore, its pairing abilities (Kaiser, 1984) are closely related to the production of recombinant chromosomes and, thus unbalanced gametes.

From the graph displayed in Fig. 6a, a slight tendency of the percentage of recombinants to reach a plateau stage in large inverted segments can be seen. This stage defines a maximum production of unbalanced gametes of approximately 50%. This observation would agree with the assumption that when the inverted segment is large enough, the formation of one, two or more chiasmata in the loop would always affect random chromatids, thus producing 50% normal gametes and 50% unbalanced (Figs. 2 and 3).

Taking into account that the largest inversions do not always involve the major part of the length of a chromosome, the length of the inverted segments was calculated with respect to the whole size of the respective chromosome to obtain the proportion of the chromosome which has been inverted. These relative values (range: 3.5–88.24%; Table 1, column 8) were also compared with the production of recombinant gametes (Table 1, column 5). Again, results pointed out a positive Pearson correlation ($P < 0.0001$) ($R^2 = 0.7397$, using a quadratic model; Fig. 6b).

The graphs shown seem to indicate that the production of significantly increased levels of unbalanced recombinant gametes would require a minimum inverted segment size close to 100 Mbp (Fig. 6a) and the inversion of around 50% of the chromosome (Fig. 6b).

Interchromosomal effects

The observation of an influence from structural chromosome reorganizations in the segregation of other chromosome pairs has been described by several authors in many works (Rousseaux et al., 1995a, b; Van Hummelen et al., 1997; Blanco et al., 2000; Amiel et al., 2001; Morel et al., 2001a, b, 2004; Oliver-Bonet et al., 2001, 2002; Baccetti et al., 2003; Anton et al., 2004). This phenomenon is called interchromosomal effect (Lejeune, 1963) and has been related to the presence of unpaired regions in the reorganized chromosomes which can interfere with other bivalents.

Inversion loops have been observed associated with other chromosome pairs (Batanian and Hultén, 1987), and their implication on the segregation of other chromosome pairs has been analyzed in several published studies. So far, no increase of numerical abnormalities unrelated to the reorganization was detected in any of the sperm chromosome studies performed in paracentric or pericentric inversions (Balkan et al., 1983; Martin, 1986, 1991, 1993, 1999; Jenderny et al., 1992; Navarro et al., 1993; Martin et al., 1994).

Few studies have evaluated a possible ICE occurrence in inversion carriers by FISHing decondensed sperm nuclei (Colls et al., 1997; Amiel et al., 2001; Anton et al., 2002; Mikhaail-Philips et al., 2004), and only Amiel et al. (2001) have described increases in the disomy frequencies for the chromosomes analyzed. It has to be noted that this reorganization (inv(9)), besides being considered as a polymorphism, involves a large heterochromatic region. Among the cytogenetic characteristics of heterochromatin, we can underline the high density of repetitive sequences shared with other chromosomes (reviewed by Miklos and John, 1979; reviewed by Lee et al., 1997), their later pairing in the meiotic process (reviewed by McKee, 2004) and the absence of crossing-over and, hence, the lack of recombina-

tion in these regions (Olson and Magenis, 1988; reviewed by Grewal and Moazed, 2003). All of these features make heterochromatic regions a candidate to associate with other unpaired regions of the genome through heterosynapsis during the development of the meiotic process, thus disturbing the normal segregation of the affected chromosomes. Therefore, in the case described by Amiel et al. (2001), the polymorphic heterochromatic region included in the inversion could play an important role.

It would be interesting to perform further aneuploidy analyses of chromosomes susceptible to being disturbed by other chromosome abnormalities. This would allow researchers to gain substantial information about the occurrence and the cytogenetic causes of this phenomenon.

Inversion carriers' progeny

As previously discussed, the cytogenetic characteristics of each inversion will determine the risk of producing recombinant gametes. These products will be potentially able to form viable embryos and, so, recombinant offspring affected by disorders of variable severity.

Many cases of recombinant progeny from pericentric inversion carriers have been reported in the literature (Ishii et al., 1997; Mejia-Baltodano et al., 1997; Goodman et al., 1999; Angle et al., 2000; Dufke et al., 2000; Ilgin Ruhi et al., 2001; Lazzaro et al., 2001; Battaglia et al., 2002; Garcia-Heras and Martin, 2002; Lagier-Tourenne et al., 2004). The viability of the recombinant products mostly depends on the genetic content (and so the size) of the noninverted segment because they are the potential regions to be deleted or duplicated by recombination. Therefore, losses/gains of large distal segments usually have a strong negative impact on the viability of the resulting recombinants.

Regarding the outcome of unbalanced progeny, paracentric inversions usually have a better prognosis due to the fact that recombination events usually give rise to the production of nonviable products (acentric and dicentric chromosomes). Nevertheless, some cases of recombinant offspring from these carriers have been described (reviewed by Pettenati et al., 1995; Yang et al., 1997; Courtens et al., 1998; Whiteford et al., 2000; Lefort et al., 2002).

No evidence of dicentric/acentric unbalanced offspring resulting from U-type exchanges in pericentric inversion carriers has been described. However, Escudero et al. (2001) have warned about the risk of occurrence of these events by interpreting the unexpected signals' combination of 54% of the abnormal embryos diagnosed by preimplantation genetic diagnosis (PGD) as a result of U-type exchanges.

Feldman et al. (1993) reported five cases of unbalanced offspring from paracentric inversion carriers and presumed that their origin came from U-type exchanges within the inversion loop. Subsequently, Pettenati et al. (1995) established a 3.8% incidence of this kind of "recombination" when they reviewed the progeny from 446 paracentric inversion carriers. Nevertheless, it has been pointed out that some cases included in Pettenati's work may rather correspond to insertions (3-break rearran-

gements capable of generating the same type of products by the occurrence of chiasmata) than inversions (Sutherland et al., 1995). Therefore, the risk of occurrence of U-type exchanges would be lower.

In FISH studies of sperm from inversion carriers, the combination of a centromeric probe plus telomeric probes for the inverted chromosome (Fig. 5) could help to establish the incidence of this kind of event during meiosis.

Sperm studies are a useful and reliable tool to predict the risk of transmission of chromosome anomalies from male reorganization carriers. The evaluation of the frequency of chromo-

somally abnormal gametes allows for the offering of a more accurate genetic counseling to these couples and also the evaluation of the need of a preimplantation genetic diagnosis (PGD) to establish a better diagnostic approach in order to reduce risks to a minimum.

Acknowledgements

We wish to thank Jonatan Lucas for his technical assistance and the Statistical Service of the Universitat Autònoma de Barcelona for their help in the data analysis.

References

- Amiel A, Sardos-Albertini F, Fejgin MD, Sharony R, Diukman R, Bartoov B: Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv9) and C-heterochromatin. *J Hum Genet* 46:245–250 (2001).
- Angle B, Hersh JH, Yen F, Christensen KM: Case of partial duplication 2q3 with characteristic phenotype: rare occurrence of an unbalanced offspring resulting from a parental pericentric inversion. *Am J Med Genet* 91:126–130 (2000).
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F: Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion inv(6)(p23q25) carrier using FISH on decondensed sperm nuclei. *Cytogenet Genome Res* 97:149–154 (2002).
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F: Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod* 19:1345–1351 (2004).
- Ashley T: G-band position effects on meiotic synapsis and crossing-over. *Genetics* 118:307–317 (1988).
- Ashley T, Moses MJ, Solari AJ: Fine structure and behaviour of a pericentric inversion in the sand rat, *Psammomys obesus*. *J Cell Sci* 50:105–119 (1981).
- Baccetti B, Bruni E, Colodet G, Gambera L, Moretti E, Marzella R, Piomboni P: 10,15 reciprocal translocation in an infertile man: ultrastructural and fluorescence in-situ hybridization sperm study: case report. *Hum Reprod* 18:2302–2308 (2003).
- Balkan W, Burns K, Martin RH: Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 3. *Cytogenet Cell Genet* 35:295–297 (1983).
- Batanian J, Hultén MA: Electron microscopic investigations of synaptonemal complexes in an infertile human male carrier of a pericentric inversion inv(1)(p32q42). Regular loop formation but defective synapsis including a possible interchromosomal effect. *Hum Genet* 76:81–89 (1987).
- Battaglia A, Brothman AR, Carey JC: Recombinant 4 syndrome due to an unbalanced pericentric inversion of chromosome 4. *Am J Med Genet* 112:103–106 (2002).
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F: Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 106:500–505 (2000).
- Brown GM, Leversha M, Hultén M, Ferguson-Smith MA, Affara NA, Furlong RA: Genetic analysis of meiotic recombination in humans by use of sperm typing: reduced recombination within a heterozygous paracentric inversion of chromosome 9q32-q34.3. *Am J Hum Genet* 62:1484–1492 (1998).
- Chaganti RS, Jhanwar SC, Ehrenbard LT, Kourides IA, Williams JJ: Genetically determined asynapsis, spermatogenic degeneration, and infertility in men. *Am J Hum Genet* 32:833–848 (1980).
- Chandley AC: A pachytene analysis of two male-fertile paracentric inversions in chromosome 1 of the mouse and in the male-sterile double heterozygote. *Chromosoma* 85:127–135 (1982).
- Chandley AC, McBeath S, Speed RM, Yorston L, Hargreave TB: Pericentric inversion in human chromosome 1 and the risk for male sterility. *J Med Genet* 24:325–334 (1987).
- Cheng EY, Chen YJ, Distche CM, Gartler SM: Analysis of a paracentric inversion in human oocytes: nonhomologous pairing in pachytene. *Hum Genet* 105:191–196 (1999).
- Colls P, Blanco J, Martínez-Pasarell O, Vidal F, Egozcue J, Márquez C, Guitart M, Templado C: 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 (1997).
- Concolino D, Iembo MA, Rossi F, Giglio S, Coppola G, Miraglia Del Giudice E, Strisciuglio P: Familial pericentric inversion of chromosome 5 in a family with benign neonatal convulsions. *J Med Genet* 39:214–216 (2002).
- Courtens W, Grossman D, Van Roy N, Messiaen L, Vamos E, Toppet V, Haumont D, Streydio C, Jauch A, Vermeesch JR, Speleman F: Noonan-like phenotype in monozygotic twins with a duplication-deficiency of the long arm of chromosome 18 resulting from a maternal paracentric inversion. *Hum Genet* 103:497–505 (1998).
- De Brackeleer M, Dao T-N: Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6:245–250 (1991).
- de la Chapelle A, Schröder J, Stenstrand K, Fellman J, Herva R, Saarni M, Anttolainen I, Tallila I, Tervilä L, Husa L, Tallqvist G, Robson EB, Cook PJJ, Sanger R: Pericentric inversions of human chromosomes 9 and 10. *Am J Hum Genet* 26:746–766 (1974).
- de Perdigó A, Gabriel-Robez O, Rumpler Y: Correlation between chromosomal breakpoint positions and synaptic behaviour in human males heterozygous for a pericentric inversion. *Hum Genet* 83:274–276 (1989).
- Devine DH, Whitman-Elia G, Best RG, Edwards JG: Paternal paracentric inversion of chromosome 2: a possible association with recurrent pregnancy loss and infertility. *J Assist Reprod Genet* 17:293–296 (2000).
- Dufke A, Eggermann K, Balg S, Stengel-Rutkowski S, Enders H, Kaiser P: A second case of inv(4)pat with both recombinants in the offspring: rec dup(4q) in a girl with Wolf-Hirschhorn syndrome and rec dup(4p). *Cytogenet Cell Genet* 91:85–89 (2000).
- Escudero T, Lee M, Stevens J, Sandalinas M, Munne S: Preimplantation genetic diagnosis of pericentric inversions. *Prenat Diagn* 21:760–766 (2001).
- Feldman GL, Weiss L, Phelan MC, Schroer RJ, Van Dyke D: Inverted duplication of 8p: ten new patients and review of the literature. *Am J Med Genet* 47:482–486 (1993).
- Ferguson-Smith MA, Yates JR: Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative European study on 52 965 amniocenteses. *Prenat Diagn* 4:5–44 (1984).
- Fryns JP, Kleczkowska A, Van den Bergh H: Paracentric inversions in man. *Hum Genet* 73:205–213 (1986).
- Gabriel-Robez O, Rumpler Y: The meiotic pairing behaviour in human spermatocytes carrier of chromosome anomalies and their repercussions on reproductive fitness. I: Inversions and insertions. A European collaborative study. *Ann Genet* 37:3–10 (1994).
- García-Heras J, Martín J: A rec(4) dup 4p inherited from a maternal inv(4)(p15q35): case report and review. *Am J Med Genet* 109:226–230 (2002).
- Goodman BK, Stone K, Coddett JM, Cargile CB, Gurewitsch ED, Blakemore KJ, Stetten G: Molecular cytogenetic analysis and clinical findings in a newborn with prenatally diagnosed rec(7)dup(7q)inv(7)(p22q31.3)pat. *Prenat Diagn* 19:1150–1156 (1999).
- Greger V, Knoll JH, Wagstaff J, Woolf E, Lieske P, Glatt H, Benn PA, Rosengren SS, Lalande M: Angelman syndrome associated with an inversion of chromosome 15q11.2q24.3. *Am J Hum Genet* 60:574–580 (1997).
- Grewal SI, Moazed D: Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301:798–802 (2003).
- Guichoua MR, Delafontaine D, Taurelle R, Taille-mite JL, Morazzani MR, Luciani JM: Loop formation and synaptic adjustment in a human male heterozygous for two pericentric inversions. *Chromosoma* 93:313–320 (1985).
- Guitart M, Ponsà M, Coll MD, Egozcue J: New data on the synaptic process of *Mesocricetus auratus*: connecting fibers, telomere association and heterosynapsis. *Genetica* 74:105–112 (1987).
- Ilgín Ruhi H, Tukun A, Karabulut H, Bayazit P, Boke-soy I: A Down syndrome case with a karyotype of 46,XY,rec(21)dup(21q)inv(21)(p11q22) derived from paternal pericentric inversion of chromosome 21. *Clin Genet* 59:368–370 (2001).

- Ishii F, Fujita H, Nagai A, Ogihara T, Kim HS, Okamoto R, Mino M: Case report of *rec(7)dup(7q)inv(7)(p22q22)* and a review of the recombinants resulting from parental pericentric inversions on any chromosomes. *Am J Med Genet* 73:290–295 (1997).
- Jaarola M, Martin RH, Ashley T: Direct evidence for suppression of recombination within two pericentric inversions in humans: a new sperm-FISH technique. *Am J Hum Genet* 63:218–224 (1998).
- Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H: Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet* 29:103–108 (1992).
- Jenderny J, Gebauer J, Röhrborn G, Rüger A: Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 20. *Hum Genet* 89:117–119 (1992).
- Kaiser P: Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics. *Hum Genet* 68:1–47 (1984).
- Lagier-Tourenne C, Ginglinger E, Alembik Y, De Saint Martin A, Peter MO, Dulucq P, Jonveaux P, Jean-didier E: Two cousins with partial trisomy 12q and monosomy 12p recombinants of a familial pericentric inversion of the chromosome 12. *Am J Med Genet* 125A:77–85 (2004).
- Lazzaro SJ, Spevak MD, Farrell SA: Recombinant Down syndrome: a case report and literature review. *Clin Genet* 59:128–130 (2001).
- Lee C, Wevrick R, Fisher RB, Ferguson-Smith MA, Lin CC: Human centromeric DNAs. *Hum Genet* 100:291–304 (1997).
- Lefort G, Blanchet P, Belgrade N, Rivier F, Chaze AM, Sarda P, Demaille J, Pelletier F: Stable dicentric duplication-deficiency chromosome 14 resulting from crossing-over within a maternal paracentric inversion. *Am J Med Genet* 113:333–338 (2002).
- Lejeune J: Autosomal disorders. *Pediatrics* 32:326–337 (1963).
- Li HH, Gyllensten UB, Cui XF, Saiki RK, Erlich HA, Arnheim N: Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 335:414–417 (1988).
- Martin RH: Sperm chromosome analysis in a man heterozygous for a paracentric inversion of chromosome 7 (q11q22). *Hum Genet* 73:97–100 (1986).
- Martin RH: Cytogenetic analysis of sperm from a man heterozygous for a pericentric inversion, *inv(3)(p25q21)*. *Am J Hum Genet* 48:856–861 (1991).
- Martin RH: Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion, *inv(8)(p23q22)*. *Cytogenet Cell Genet* 62:199–202 (1993).
- Martin RH: Sperm chromosome analysis in a man heterozygous for a paracentric inversion of chromosome 14 (q24.1q32.1). *Am J Hum Genet* 64:1480–1484 (1999).
- Martin RH, Chernos JE, Lowry RB, Pattinson HA, Barclay L, Ko E: Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 1. *Hum Genet* 93:135–138 (1994).
- Martínez-Flores I, Egozcue J, Cabero LI, García M: Synaptic behaviour of some structural and numerical chromosome anomalies in female and male rats (*Rattus norvegicus*). *Histol Histopathol* 16:701–706 (2001).
- McKee BD: Homologous pairing and chromosome dynamics in meiosis and mitosis. *Biochim Biophys Acta* 1677:165–180 (2004).
- Mejía-Baltodano G, Bobadilla L, Gonzalez RM, Barros-Nunez P: High recurrence of recombinants in a family with pericentric inversion of chromosome 18. *Ann Genet* 40:164–168 (1997).
- Mikhaail-Philips MM, Ko E, Chernos J, Greene C, Rademaker A, Martin RH: Analysis of chromosome segregation in sperm from a chromosome 2 inversion heterozygote and assessment of an interchromosomal effect. *Am J Med Genet* 127A:139–143 (2004).
- Miklos GL: Sex-chromosome pairing and male fertility. *Cytogenet Cell Genet* 13:558–577 (1974).
- Miklos GL, John B: Heterochromatin and satellite DNA in man: properties and prospects. *Am J Hum Genet* 31:264–280 (1979).
- Morel F, Fellmann F, Roux C, Bresson JL: Meiotic segregation analysis by FISH investigation of spermatozoa of a 46,Y,der(X),t(X;Y)(qter→p22::q11→qter) carrier. *Cytogenet Cell Genet* 92:63–68 (2001a).
- Morel F, Roux C, Bresson JL: FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype. *Mol Hum Reprod* 7:483–488 (2001b).
- Morel F, Douet-Guilbert N, Roux C, Tripogney C, Le Bris MJ, De Braekeleer M, Bresson JL: Meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21;cen) translocation in two carrier brothers. *Fertil Steril* 81:682–685 (2004).
- Navarro J, Benet J, Martorell MR, Templado C, Egozcue J: 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 (1993).
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Carrera M, Egozcue J, Benet J: Meiotic segregation analysis in a t(4;8) carrier: comparison of FISH methods on sperm chromosome metaphases and interphase sperm nuclei. *Eur J Hum Genet* 9:395–403 (2001).
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Carrera M, Egozcue J, Benet J: Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Mol Hum Reprod* 8:958–963 (2002).
- Olson SB, Magenis RE: Preferential paternal origin of de novo structural chromosome rearrangements, in Daniel A (ed): *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*, pp 583–599 (AR Liss, New York 1988).
- Pettenati MJ, Rao PN, Phelan MC, Grass F, Rao KW, Cosper P, et al: Paracentric inversions in humans: a review of 446 paracentric inversions with presentation of 120 new cases. *Am J Med Genet* 55:171–187 (1995).
- Poorman PA, Moses MJ, Davission MT, Roderick TH: Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. III. Cytogenetic observations on two paracentric inversions. *Chromosoma* 83:419–429 (1981).
- Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Delafontaine D, Sèle B: Sperm nuclei analysis of a Robertsonian t(14q21q) carrier, by FISH, using three plasmids and two YAC probes. *Hum Genet* 96:655–660 (1995a).
- Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Devillard F, Lespinasse J, Sèle B: Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocation: analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 71:240–246 (1995b).
- Rumpler Y, Gabriel-Robez O, Volobouev V, Yu W, Rasamimanana P, de Pergida A: Male sterility and double heterozygosity for chromosomal inversion. *Cytogenet Cell Genet* 69:66–70 (1995).
- Saadallah N, Hultén M: 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 (1986).
- Saito-Ohara F, Fukuda Y, Ito M, Agarwala KL, Hayashi M, Matsuo M, Imoto I, Yamakawa K, Nakamura Y, Inazawa J: The Xq22 inversion breakpoint interrupted a novel Ras-like GTPase gene in a patient with Duchenne muscular dystrophy and profound mental retardation. *Am J Hum Genet* 71:637–645 (2002).
- Sutherland GR, Callen DF, Gardner RJ: Paracentric inversions do not normally generate monocentric recombinant chromosomes. *Am J Med Genet* 59:390–392 (1995).
- Tease C, Fisher G: Further examination of the production-line hypothesis in mouse foetal oocytes. I. Inversion heterozygotes. *Chromosoma* 93:447–452 (1986).
- Van Dyke DL, Weiss L, Roberson JR, Babu VR: The frequency and mutation rate of balanced autosomal rearrangements in man estimated from prenatal genetic studies for advanced maternal age. *Am J Hum Genet* 35:301–308 (1983).
- Van Hummelen P, Manchester D, Lowe X, Wyrobek AJ: 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 (1997).
- Warburton D: Outcome of cases of de novo structural rearrangements diagnosed at amniocentesis. *Prenat Diagn* 4:69–80 (1984).
- Whiteford ML, Baird C, Kinmond S, Donaldson B, Davidson HR: A child with bisatellited, dicentric chromosome 15 arising from a maternal paracentric inversion of chromosome 15q. *J Med Genet* 37:E11 (2000).
- Winsor EJ, Palmer CG, Ellis PM, Hunter JL, Ferguson-Smith MA: Meiotic analysis of a pericentric inversion, *inv(7)(p22q32)*, in the father of a child with a duplication-deletion of chromosome 7. *Cytogenet Cell Genet* 20:169–184 (1978).
- Yakut T, Acar H, Egelü U, Kimya Y: Frequency of recombinant and nonrecombinant products of pericentric inversion of chromosome 1 in sperm nuclei of carrier: by FISH technique. *Mol Reprod Dev* 66:67–71 (2003).
- Yang SP, Bidichandani SI, Figueroa LE, Juyal RC, Saxton PJ, Baldini A, Patel PI: Molecular analysis of deletion (17)(p11.2p11.2) in a family segregating a 17p paracentric inversion: implications for carriers of paracentric inversions. *Am J Hum Genet* 60:1184–1193 (1997).

TREBALL 7

Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers.

Human Reproduction 22(8):2088-2092

ANTON Ester, **VIDAL** Francesca, **BLANCO** Joan

2007

OPINION

Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers

E. Anton, F. Vidal and J. Blanco¹

Unitat de Biologia Cel·lular (Facultat de Biociències), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

¹Correspondence address. Tel: +34 93 581 37 28; Fax: +34 93 581 22 95; E-mail address: joan.blanco@uab.es

The use of fluorescence in-situ hybridization (FISH) in decondensed spermatozoa from carriers of structural chromosomal abnormalities provides a way to estimate the amount of unbalanced products. This methodology has become a tool of special interest for a better approximation of the reproductive competence of the carriers. Although there is no discussion regarding the cytogenetic value of the information obtained, the usefulness of performing individual sperm FISH studies must be weighed depending on the object of the study.

In this paper, we introduce some considerations concerning the convenience of a routine application of sperm FISH analysis in the major populations of structural reorganization carriers. For each group, the significance of the information that can be obtained and its relevance for genetic reproductive advice are discussed.

Keywords: structural reorganization carriers; sperm FISH studies; meiotic segregation; interchromosomal effects

Introduction

It is well known that carriers of structural chromosomal anomalies have a certain risk of producing unbalanced gametes during meiosis. Although their phenotype is generally normal, their reproductive competence is significantly reduced and they have a high risk of transmitting chromosomal abnormalities to the offspring. The extent of this effect has been related to the particular characteristics of each kind of reorganization and this information has been classically used for the reproductive counseling of these individuals (HC Forum[®]; Gardner and Sutherland, 2004).

The advent of fluorescence in-situ hybridization (FISH) in decondensed sperm nuclei offered a new approach. Sperm FISH analysis has been revealed as the fastest and easiest method to measure the proportion of unbalanced gametes produced by these individuals. Its use has become very common worldwide, even recommended for being routinely incorporated into the genetic screening offered prior to preimplantation genetic diagnosis (PGD; Escudero *et al.*, 2003; Gianaroli *et al.*, 2005).

In this paper, we introduce some considerations concerning the benefit of undertaking sperm FISH analysis in carriers of Robertsonian translocations, reciprocal translocations and chromosome inversions, and the implications of these studies in obtaining relevant information for improving the genetic reproductive advice of these carriers.

Robertsonian translocation carriers

Since 1995, segregation sperm FISH studies have been performed in 51 carriers involving different chromosomes: der(13;14), der(13;15), der(13;21), der(13;22), der(14;15), der(14;21), der(14;22) and der(21;22) (Rousseaux *et al.*, 1995; Mennicke *et al.*, 1997; Escudero *et al.*, 2000; Frydman *et al.*, 2001; Morel *et al.*, 2001; Anton *et al.*, 2004b; Anahory *et al.*, 2005; Roux *et al.*, 2005; Brugnon *et al.*, 2006; Hatakeyama *et al.*, 2006; Moradkhani *et al.*, 2006a,b; Ogur *et al.*, 2006).

The percentages of normal/balanced gametes observed describe a relatively wide range, which goes from 60 to 93%. However, the production of normal/balanced gametes in most of the carriers is close to the average \pm SD of $84.5 \pm 6.1\%$.

It has been noticed that these percentages are more homogeneous among the series of individuals analysed within a single laboratory even when different kinds of Robertsonian translocations are compared (Frydman *et al.*, 2001; Brugnon *et al.*, 2006; Moradkhani *et al.*, 2006b). This would indicate that a certain amount of the variability observed could be more related to technical aspects (such as the protocols used, the selected probes, the particular scoring criteria established in the groups according to the protocols used, etc.) than to the specific cytogenetic characteristics of the rearrangement.

To conclude, Robertsonian translocations are rearrangements with a very homogeneous segregation behavior, independent of the chromosomes involved.

The determination of the exact amount of normal/balanced gametes in every single case could be pertinent for basic cytogenetic research. However, this information would not be relevant for any subsequent counseling and there is little reason for incorporating this kind of studies as routine analysis for better reproductive advice in these carriers.

Reciprocal translocation carriers

During the period 1997–2006, complete segregation patterns have been obtained by sperm FISH analysis in 62 reciprocal translocation carriers (reviewed by Anton *et al.*, 2004a; Benet *et al.*, 2005; Brugnion *et al.*, 2006; Midro *et al.*, 2006; Wiland *et al.*, 2006; Yakut *et al.*, 2006). From these studies, the observed production of normal/balanced gametes describes a range that goes from 18.6 to 62.8%, with an average \pm SD of $42.5 \pm 10.7\%$. As it can be seen, the results obtained are more heterogeneous than for Robertsonian translocations.

These divergences have been classically attributed to the particular cytogenetic characteristics of each rearrangement (centromere position, size of the pairing segment, etc.) (Sybenga, 1975). Nevertheless, it is important to note that these kind of segregation studies involve a more complicated methodological approach. In part, this arises from the fact that four chromosomes are involved in this type of reorganization, making necessary the use of at least three probes and fluorochromes to allow the identification of the high number of segregation products defined by different probe combinations. Moreover, the designed combinations usually involve various classes of probes of different sizes, hybridization efficiencies and signal intensities. Therefore, it seems very likely that part of the variability observed could be influenced by different methodological approaches.

On the other hand, FISH procedures also have technical limitations that can bias the results observed. One of them is related to the increased probability that, using a high number of probes and given that the size of the sperm head is limited, some of the signals appear masked by others situated very close to them. Thus, some signals would not be considered individualized when applying strict scoring criteria, and that will favor a general increase in the products defined by fewer signals (for instance: products with one chromosome from a 3:1 segregation versus their complementary products with three chromosomes).

Another handicap of the FISH technique concerns the evaluation of a lack of a signal, as it is impossible to distinguish between the true absence of a target region and a hybridization failure. The direct consequence of including hybridization failures in the scoring would be an artifactual increase of products with only one chromosome. This would be reflected in an overestimation of the 3:1 segregation mode to the detriment of alternate and adjacent segregation modes. Regarding this fact, it can be noticed from the results published in the literature that the wideness in the range of normal/balanced gametes produced is highly influenced by some studies that report

cases with an unusual segregation pattern characterized by an exaggerated presence of 3:1 segregation products (Estop *et al.*, 1999; Van Assche *et al.*, 1999; Escudero *et al.*, 2003) which, in some cases, could also involve misinterpreted hybridization failures. Obviously hybridization failures will also affect Robertsonian translocation and inversion studies. The difference in these cases is that sperm will probably not be included in the assessment because they cannot be assigned to any of the expected genotypes.

Altogether, it seems that only through the analysis of a high number of carriers using the same assessment criteria and the same rigor would it be possible to clarify to which extent the origin of the variability is the consequence of the cytogenetic characteristics of the rearrangement or to methodological approaches.

To achieve this objective, a large population of reciprocal translocation carriers with very different cytogenetic features has been analysed in our laboratory (Anton *et al.*, 2006a). In this study, a very similar production of normal/balanced gametes (around $43.9 \pm 4\%$) has been observed in most of the individuals analysed (12 out of the 14 cases). Results point to a generalized homogeneity in the production of normal/balanced gametes. The percentage of normal gametes ($\sim 60\%$) detected in the two other cases were associated with the very unusual configuration adopted by those tetravalents. A deviation of the standard segregation behavior would depend on the distribution of chiasmata which in its turn depends on the size and the chromatin characteristics of the pairing segments. In this sense, extremely short segments, the presence of heterochromatin or the proximity of the centromere are clearly associated with a suppression of recombination. Thus, those situations hampering the formation of a tetravalent as a result of the factors mentioned above would represent a risk of deviation of the standard segregation pattern, producing an increase or a decrease in the percentage of normal/balanced gametes and having significant reproductive consequences in the patients.

In conclusion, most reciprocal translocations lead to a regular production of normal/balanced gametes ($\sim 35\text{--}50\%$). These figures are informative enough to judge the genetic reproductive risk for most of the carriers. This narrow range will probably not represent any variation in the final decision of the patients regarding any further commitment to PGD. Only a basic cytogenetic research purpose or a suspicion of a possible deviation from the standard segregation behavior would justify the execution of a particular segregation study addressed toward reproductive counseling.

Inversion carriers

Segregation sperm FISH studies have been performed in 18 inversion carriers during the period 1998–2006 (Jaarola *et al.*, 1998; Devine *et al.*, 2000; Anton *et al.*, 2002; Yakut *et al.*, 2003; Mikhaail-Philips *et al.*, 2004; Mikhaail-Philips *et al.*, 2005; Anton *et al.*, 2006b; Malan *et al.*, 2006; Morel *et al.*, 2006).

The methodological approach used for the segregation studies in this kind of structural variants is fairly simple as it

Anton *et al.*

only requires the combination of two probes for a single chromosome. Nevertheless in these carriers, the production of normal gametes describes a range that goes from 45.7 to 99.4%, with an average \pm SD of $82.9 \pm 17.1\%$. This wide variety therefore would hardly be explained by methodological causes but would rather reflect the highly variable effect of this kind of structural reorganization on the reproductive competence of the carriers, which in some cases have the same prognosis as the normal population and in other cases have their fertility reduced to half.

It is well known that the production of unbalanced gametes in inversion carriers depends on the occurrence of recombination events within the inverted segment, which is directly related to the cytogenetic characteristics and thus the manner of pairing of these rearrangements.

By analysing the relationship between the parameters of inverted segment length and proportion of the chromosome inverted with the production of unbalanced gametes, a statistically significant correlation was detected (Anton *et al.*, 2005). According to these results, the production of unbalanced gametes in those cases with an inverted segment larger than ~ 100 Mbp or involving more than $\sim 50\%$ of the chromosome is high (up to 50%). Thus, these carriers have a predictable, high genetic reproductive risk without performing further sperm FISH studies. On the other hand, in carriers of inverted segments shorter than ~ 50 Mbp and/or involving less than $\sim 40\%$ of the chromosome, the production of unbalanced spermatozoa is so unlikely that there is no need of performing further segregation studies. Therefore, only in those carriers of inverted segments of ~ 50 to 100 Mbp, or involving ~ 40 – 50% of the chromosome, sperm FISH studies would be useful in determining the particular behavior of each reorganization.

In summary, the usefulness of sperm FISH studies for the genetic reproductive advice of inversion carriers should be considered according to the dimensions of the inverted segment (Anton *et al.*, 2006a). Data from further particular segregation studies in inversion carriers will contribute in defining the limits of distribution of these three groups more accurately.

Interchromosomal effect studies

Besides studying the segregation outcome in carriers of structural chromosome abnormalities, sperm FISH studies have also been performed for evaluating the presence of aneuploidies for chromosome pairs not involved in the reorganization. These anomalies have been postulated to be a potential consequence of meiotic disturbances produced by the rearrangements (Interchromosomal effect; Lejeune, 1963). Results supporting the existence of this phenomenon have been published by some authors, while others have not found any evidence of this (reviewed by Douet-Guilbert, 2005).

Data collected seem to indicate that Robertsonian translocations carriers have an important susceptibility for this kind of anomaly. In fact, around 39% (7 out of 18) of the cases in which an ICE study has been added to the segregation study (Rousseaux *et al.*, 1995; Morel *et al.*, 2001; Anton *et al.*, 2004b; Hatakeyama *et al.*, 2006; Ogur *et al.*, 2006) showed

significant increased frequencies of numerical abnormalities for at least one of the chromosomes evaluated. In the reciprocal translocation carriers, the incidence was even higher with around 44% of positive ICE (12 cases out of 27) (Mercier *et al.*, 1998; Oliver-Bonet *et al.*, 2001; Morel *et al.*, 2004; Anton *et al.*, 2006a). Concerning inversion carriers, around 14% of the cases analysed showed a positive ICE, which represented only one patient (Anton *et al.*, 2006a) of the seven cases in which segregation behavior and ICE were analysed (Mikhaail-Philips *et al.*, 2004; Mikhaail-Philips *et al.*, 2005; Anton *et al.*, 2006b). This incidence is relatively low when compared with the other structural reorganizations, but the population of inversion carriers studied is also smaller.

The origin of these aneuploidies is a controversial issue. This is based on the fact that carriers of structural chromosomal abnormalities usually have an altered semenogram, a feature which is also common in infertile patients. Increased aneuploidy frequencies are also frequent in this last group of individuals independently of whether they have a normal or abnormal karyotype (Machev *et al.*, 2005; Miharu, 2005; Rives, 2005). Meiotic errors, either affecting synapsis during prophase I or meiotic recombination (Egozcue *et al.*, 2000), can be the starting point for the production of these chromosomally unbalanced spermatozoa. These meiotic abnormalities have been related to mutations of meiosis specific genes involved in synaptic events, DNA recombination and DNA repair (Baarends *et al.*, 2001), as well as to environmental factors (Mroz *et al.*, 1998); such origins could also be applicable in structural reorganization carriers.

A recent study performed in a large population of infertile patients with altered seminal parameters and normal karyotypes (Sarrate *et al.*, unpublished data) reported a 13% incidence of significantly increased numerical abnormalities. This incidence is very similar to that obtained in the aneuploidy screening performed in inversion carriers (14.3%) but noticeably smaller than the frequencies detected in Robertsonian translocation carriers (38.9%) and in reciprocal translocation carriers (43.5%). This would indicate that, at least in translocation carriers, the increases observed should be attributed to other factors than those mentioned above for infertile patients. In this context, the meiotic interaction at meiosis I between the reorganized chromosomes and other bivalents appears to be a reliable event for explaining the abnormal segregation of these chromosomes, and would support the interchromosomal effect premise.

Overall, independent of the origin of the aneuploidies in sperm, these carriers appear to have an increased risk of producing aneuploid gametes. At the embryo level, the consequences of this phenomenon are also controversial. Whereas some authors have found an apparent contribution from these interchromosomal effects in the number of aneuploid embryos generated (Gianaroli *et al.*, 2002), others have not (Munne *et al.*, 2005). In this sense, we think that it is important to point out that aneuploidy screenings only reflect a portion of the whole chromosome content of sperm/embryos, and thus, results obtained by sperm FISH studies should just be conceived as an estimation of the possible disturbances existent in each patients.

Therefore, structural carriers with significant increases in aneuploidies would have two genetic risks: those derived from the segregation of the reorganized chromosomes, and interchromosomal effects. Considering the high presence of this phenomenon in carriers, the absence of conclusive data about the characteristic of the reorganizations related to ICE, and its controversial effect at the embryo level, ICE studies in sperm could be useful in the genetic reproductive advice for carriers involved in a PGD program. In cases of a positive effect, a supplementary aneuploid PGD screening should be incorporated into the conventional PGD for structural anomalies.

Summary

Compiled data indicate that Robertsonian translocation carriers would not obtain much benefit from particular segregation studies due to their very similar segregation pattern. They have a relatively high production of normal/balanced gametes that can be anticipated at around 84%.

In reciprocal translocation carriers, the production of normal/balanced gametes would fit into a small range with similar reproductive implications (around 43%). Only some specific cases with particular cytogenetic characteristics would deserve further consideration.

In inversion carriers, the usefulness of sperm FISH studies for genetic reproductive advice should be considered in relation to the dimensions of the inverted segment. Only in those cases where the risk of producing unbalanced gametes is variable with significant reproductive consequences (carriers of inverted segments involving ~40–50% of the chromosome), would particular sperm FISH studies be recommended.

Finally, due to the high susceptibility of structural reorganization carriers for producing aneuploid and/or diploid gametes, a screening of numerical abnormalities by sperm FISH prior to a PGD cycle would be a very recommendable option to orientate further PGD analysis in these carriers.

Acknowledgements

This work was funded by Projects SAF2003-04 312 (DGI, Ministerio de Ciencia y Tecnología), 2005SGR-00 495 (Generalitat de Catalunya) and 2004XT-00 054 (Generalitat de Catalunya).

References

Anahory T, Hamamah S, Andreo B, Hedon B, Claustres M, Sarda P, Pellistor F. Sperm segregation analysis of a (13;22) Robertsonian translocation carrier by FISH: a comparison of locus-specific probe and whole chromosome painting. *Hum Reprod* 2005;**20**:1850–1854.

Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion inv(6p23q25) carrier using FISH on decodensed sperm nuclei. *Cytogenet Genome Res* 2002;**97**:149–154.

Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J. Preferential alternate segregation in the common t(11;22)(q23;q11) reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers. *Reprod Biomed Online* 2004a;**9**:637–644.

Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod* 2004b;**19**:1345–1351.

Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 2005;**111**:297–304.

Anton E, Sarate Z, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Role of sperm FISH studies in the reproductive advice of carriers of structural chromosome anomalies. *Hum Reprod* 2006a;**21**(Suppl 1):i61.

Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J. Genetic reproductive risk in inversion carriers. *Fertil Steril* 2006b;**85**:661–666.

Baarends WM, van der Laan R, Grootegoed JA. DNA repair mechanisms and gametogenesis. *Reproduction* 2001;**121**:31–39.

Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 2005;**111**:281–290.

Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, Janny L, Devroey P, Liebaers I, Van Steirneghem A. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod* 2006;**21**:685–693.

Devine DH, Whitman-Elia G, Best RG, Edwards JG. Paternal paracentric inversion of chromosome 2: a possible association with recurrent pregnancy loss and infertility. *J Assist Reprod Genet* 2000;**17**:293–296.

Douet-Guilbert N, Bris MJ, Amice V, Marchetti C, Delobel B, Amice J, Braekeler MB, Morel F. Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature. *Int J Androl* 2005;**28**:372–379.

Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000;**6**:93–105.

Escudero T, Lee M, Carrel D, Blanco J, Munne S. Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13;14)(q10;q10) carriers. *Prenat Diagn* 2000;**20**:599–602.

Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M, Munne S. Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertil Steril* 2003;**79**:1528–1534.

Estop AM, Cieply KM, Munne S, Feingold E. Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of the spermatozoa of a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Hum Genet* 1999;**104**:412–417.

Frydman N, Romana S, Le Lor'h M, Vekemans M, Frydman R, Tachdjian G. Assisting reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation. *Hum Reprod* 2001;**16**:2274–2277.

Gardner R, Sutherland G. Chromosome abnormalities and genetic counseling. New York, Oxford University Press, 2004.

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

Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, Menchini Fabris GF, Voliani S, Ferraretti AP. Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum Reprod* 2005;**20**:2140–2152.

Hatakeyama C, Gao H, Harmer K, Ma S. Meiotic segregation patterns and ICSI pregnancy outcome of a rare (13;21) Robertsonian translocation carrier: a case report. *Hum Reprod* 2006;**21**:976–979.

HC Forum[®] (Human Genetics Forum). https://hcforum.imag.fr/H_A/index.html last date accessed.

Jaarola M, Martin RH, Ashley T. Direct evidence for suppression of recombination within two pericentric inversions in humans: a new sperm-FISH technique. *Am J Hum Genet* 1998;**63**:218–224.

Lejeune J. Autosomal disorders. *Pediatrics* 1963;**32**:326–337.

Machev N, Gosset P, Viville S. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 2005;**111**:352–357.

Malan V, Pipiras E, Sifer C, Kanafani S, Cedrin-Durnerin I, Martin-Pont B, Hagues JN, Wolf JP, Benzacken B. Chromosome segregation in an infertile man carrying a unique pericentric inversion, inv(21)(p12q22.3), analysed using fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei: significance for clinical genetics. A case report. *Hum Reprod* 2006;**21**:2052–2056.

Mennicke K, Diercks P, Schlieker H, Bals-Pratsch M, al Hasani S, Diedrich K, Schwinger E. Molecular cytogenetic diagnostics in sperm. *Int J Androl* 1997;**20**:11–19.

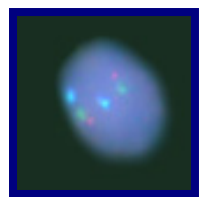
Mercier S, Morel F, Fellman F, Roux C, Bresson JL. Molecular analysis of the chromosomal equipment in spermatozoa of a 46, XY, t(7;8)(q11.21;cen) carrier by using fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1998;**102**:446–451.

Midro AT, Wiland E, Panasiuk B, Lesniewicz R, Kurpisz M. Risk evaluation of carriers with chromosome reciprocal translocation t(7;13)(q34;q13) and

Anton *et al.*

- concomitant meiotic segregation analyzed by FISH on ejaculated spermatozoa. *Am J Med Genet (A)* 2006;**140**:245–256.
- Mihara N. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 2005;**111**:347–351.
- Mikhaail-Philips MM, Ko E, Chemos J, Greene C, Rademaker A, Martin RH. Analysis of chromosome segregation in sperm from a chromosome 2 inversion heterozygote and assessment of an interchromosomal effect. *Am J Med Genet A* 2004;**127**:139–143.
- Mikhaail-Philips MM, McGillivray BC, Hamilton SJ, Ko E, Chemos J, Rademaker A, Martin RH. Unusual segregation products in sperm from a pericentric inversion 17 heterozygote. *Hum Genet* 2005;**117**:357–365.
- Moradkhani K, Puechberty J, Bhatt S, Vago P, Janny L, Lefort G, Hamamah S, Sarda P, Pellestor F. Meiotic segregation of rare Robertsonian translocations: sperm analysis of three t(14q;22q) cases. *Hum Reprod* 2006a;**21**:1166–1171.
- Moradkhani K, Puechberty J, Bhatt S, Lespinasse J, Vago P, Lefort G, Sarda P, Hamamah S, Pellestor F. Rare Robertsonian translocations and meiotic behaviour: sperm FISH analysis of t(13;15) and t(14;15) translocations: A Case Report. *Hum Reprod* 2006b; [Epub ahead of print].
- Morel F, Roux C, Bresson JL. FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype. *Mol Hum Reprod* 2001;**7**:483–488.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Roux C, Tripogney C, Le Bris MJ, De Braekeleer M, Bresson JL. Meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21;cen) translocation in two carrier brothers. *Fertil Steril* 2004;**81**:682–685.
- Morel F, Laudier B, Guerif F, Couet ML, Royere D, Roux C, Bresson JL, Amice V, De Braekeleer M, Douet-Guilbert N. Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* [Epub ahead of print] 2006;
- Mroz K, Hassold TJ, Hunt PA. Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors. *Hum Reprod* 1998;**14**:1151–1156.
- Munne S, Escudero T, Fischer J, Chen S, Hill J, Stelling JR, Estop A. Negligible interchromosomal effect in embryos of Robertsonian translocation carriers. *Reprod Biomed Online* 2005;**10**:363–369.
- Ogur G, Van Assche E, Vegetti W, Verheyen G, Tournaye H, Bondaelle M, Van Steirteghem A, Liebaers I. Chromosomal segregation in spermatozoa of 14 Robertsonian translocation carriers. *Mol Hum Reprod* 2006;**12**:209–215.
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Carrera M, Egozcue J, Benet J. Meiotic segregation analysis in a t(4;8) carrier: comparison of FISH methods on sperm chromosome metaphases and interphase sperm nuclei. *Eur J Hum Genet* 2001;**9**:395–403.
- Rives NM. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: asthenozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 2005;**111**:358–362.
- Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Delafontaine D, Sele B. Sperm nuclei analysis of a Robertsonian t(14q21q) carrier, by FISH, using three plasmids and two YAC probes. *Hum Genet* 1995;**96**:655–660.
- Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann F, Clavequin MC, Bresson JL. Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenet Genome Res* 2005;**111**:291–296.
- Sybenga J. *General Cytogenetics*. Amsterdam, The Netherlands: North-Holland Publishing Company, 1975.
- Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, Bondaelle M, Vandervorst M, Van Steirteghem A, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in-situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Mol Hum Reprod* 1999;**5**:682–690.
- Wiland E, Midro A, Panasiuk B, Kurpisz M. The analysis of meiotic segregation patterns and aneuploidy in the spermatozoa of father and son with translocation t(4;5)(p15.1;p12) and the prediction of the individual probability rate for unbalanced progeny at birth. *J Androl* 2006; [Epub ahead of print].
- Yakut T, Acar H, Egeli U, Kimya Y. Frequency of recombinant and nonrecombinant products of pericentric inversion of chromosome 1 in sperm nuclei of carrier: by FISH technique. *Mol Reprod Dev* 2003;**66**:67–71.
- Yakut T, Ercelen N, Acar H, Kimya Y, Egeli U. Meiotic segregation analysis of reciprocal translocations both in sperms and blastomeres. *Am J Med Genet A* 2006;**140**:1074–1082.

Submitted on November 22, 2006; resubmitted on May 4, 2007; accepted on May 9, 2007



6- Discussió

6.1- SEGREGACIÓ

6.1.1- TRANSLOCACIONS ROBERTSONIANES

Les translocacions Robertsonianes presenten un comportament molt homogeni, amb una segregació preferentment alternant que dóna lloc a prop del 84% de gàmetes normals/equilibrats. Aquests resultats concorden amb el models teòrics clàssics que proposaven el mode alternant com el repartiment més afavorit en la segregació d'un trivalent (Sybenga 1975).

Les dades publicades a la literatura (**Annex I; Taula I.1**) descriuen un comportament molt similar al dels nostres resultats, que en tots els casos es caracteritza per presentar freqüències decreixents dels modes alternant, adjacent i 3:0 (**Figura 6.1**).

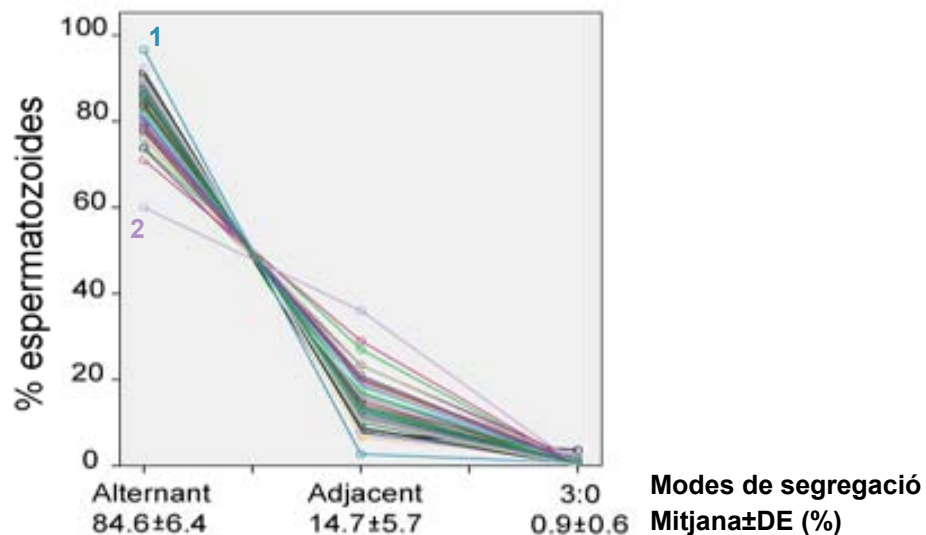


Figura 6.1- Resultats publicats dels estudis de segregació realitzats en portadors de translocacions Robertsonianes. Cada un dels casos analitzats està representat per un color diferent. Els casos 1 i 2 són els que presenten valors més allunyats de la mitjana (Syme i Martin 1992 i Mennicke et al. 1997 respectivament).

La comparació estadística de la nostra població amb el conjunt de dades de la literatura, no mostra diferències significatives ni pel que fa als resultats de la segregació alternant (T-student; $p=0.58$) ni per l'adjacent (T-student; $p=0.59$).

El petits desajustaments detectats en els patrons de segregació dels diversos individus es poden associar a dos orígens no excloents que es detallen a continuació.

► **Factors cromosòmics**

Alguns autors han relacionat una major producció de gàmetes amb contingut adjacent a la implicació de cromosomes acrocèntrics de mides diferents (cromosomes del grup D i G) (Munné et al. 2000). Aquesta observació es basa en el fet que, aquests cromosomes, formarien un trivalent altament asimètric, que afavoriria un repartiment cromosòmic desequilibrat. La participació d'un cromosoma petit (amb baixa taxa de recombinació) en la reorganització, també podria afavorir la segregació adjacent ja que, en absència de quiasmes, aquest cromosoma quedaria en forma d'univalent i segregaria a l'atzar.

En els individus de la nostra població no es van detectar diferències de comportament en les translocacions Robertsonianes amb cromosomes del grup D respecte a les que implicaven cromosomes del grup D i G. Pel que fa les dades de la literatura on hi ha més variabilitat de casos, la comparació entre els patrons observats en translocacions Robertsonianes entre cromosomes D/D, D/G i G/G tampoc va mostrar diferències significatives (Test de Kruskal-Wallis; $p > 0.05$).

En aquest sentit i tal com s'observa a la **Taula 6.1**, el grau de variació dels diversos modes de segregació, tot i ser reduït, sovint és més gran dins un mateix tipus de translocació Robertsoniana que entre les diverses variants estudiades.

Taula 6.1 - Grups de translocacions Robertsonianes publicats a la literatura amb les freqüències mitjanes±DE dels diferents modes de segregació.

	Alternant (mitjana±DE)	Adjacent (mitjana±DE)	3:0/2n (mitjana±DE)	Altres (mitjana±DE)	Casos (n)
der(13;14)	84.2±4.9	15.0±4.8	0.6±0.9	0.3±0.9	29
der(13;15)	82.2±6.8	17.2±6.5	0.5±0.4	0.0	6
der(13;21)	87.6±1.1	11.4±0.4	0.5±0.3	0.3±0.5	2
der(13;22)	86.7	12.8	0.5	0.0	1
der(14;15)	88.3±5.3	10.6±4.4	0.9±0.7	0.0	4
der(14;21)	85.5±8.3	13.1±6.8	0.3±0.5	1.0±3.0	9
der(14;22)	79.4±0.8	20.1±0.9	0.6±0.0	0.0	4
der(15;22)	89.6	10.4	0.0	0.0	1
der(21;22)	82.0±15.5	16.4±14.0	0.5±0.3	0.0	4
Total	84.2±6.2	14.8±6.1	0.6±0.7	1.1±2.2	60

Això descartaria un comportament propi de cada tipus de reorganització, tot i que cal tenir en compte que algunes translocacions Robertsonianes han estat analitzades en un nombre baix de casos (**Taula 6.1**). De fet, pràcticament el 50% de les dades provenen de la translocació der(13;14) mentre que les que tenen

menor incidència poblacional (Nielsen i Wohler 1991) estan molt menys representades o fins i tot no se'n tenen dades com és el cas de la der(15;21). Per aquest motiu, l'ampliació d'algun dels grups d'estudi ajudaria a descartar de forma definitiva una influència cromosòmica en el comportament d'aquestes reorganitzacions.

► **Factors no cromosòmics**

Entre els factors que poden influir en els resultats publicats, cal tenir present la variabilitat del nombre d'espermatozoides avaluats (rang 24-16578; **Figura 6.2**). Els treballs amb recomptes mostrals més baixos són els que poden tenir major efecte distorsionant, ja que tenen un poder estadístic menor.

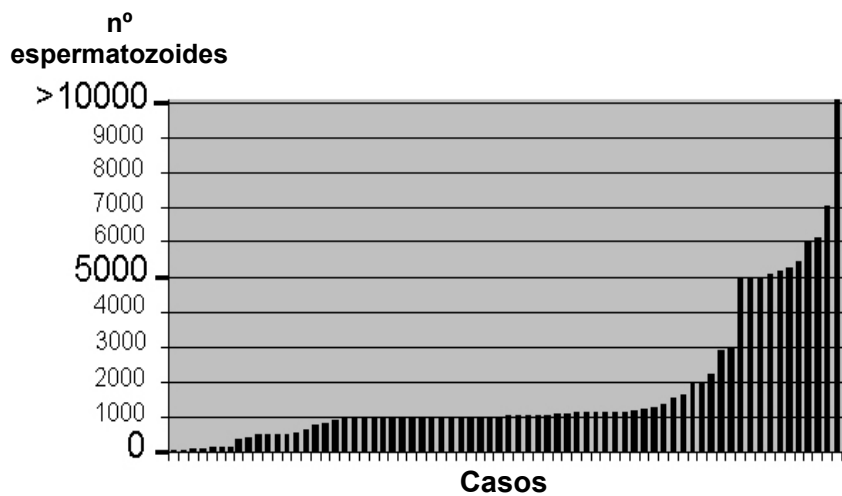


Figura 6.2- Mida de les mostres analitzades en els estudis de segregació en portadors de translocacions Robertsonianes publicats a la literatura (**Taula I.1; Annex I**).

Concretament, els casos que més es desvien de la mitjana poblacional es corresponen a estudis en els que el nombre d'espermatozoides avaluat és menor, com per exemple els individus 1 i 2 de la **Figura 6.1** en els que es van analitzar 146 (Syme i Martin 1992) i 350 espermatozoides (Mennicke et al. 1997) respectivament (**Annex I; Taula I.1**).

Finalment, no es pot descartar la participació de característiques pròpies de cada individu en els resultats obtinguts. Aquestes podrien estar relacionades amb l'existència de diferències en els processos cel·lulars o en els mecanismes de control del cicle que donarien lloc a una major/menor efectivitat en l'eliminació de cèl·lules cromosòmicament desequilibrades (Honda et al. 1999).

6.1.2- TRANSLOCACIONS RECÍPROQUES

Els patrons de segregació obtinguts en portadors de translocacions recíproques mostren un predomini del mode de segregació alternant que, tot i ser força més baix que en translocacions Robertsonianes, dóna lloc a prop de 45% de gàmetes normals/equilibrats.

Tant la segregació alternant com l'adjacent I (segon mode majoritari) impliquen una distribució oposada dels centròmers homòlegs a anafase I, que coincideix amb el comportament més afavorit segons els models de citogenètica clàssica (Sybenga 1975). Les freqüències dels modes de segregació adjacent II i 3:1 van ser més baixes o fins i tot nul·les en alguns casos, corroborant el fet que el repartiment dels cromosomes homòlegs cap a un mateix pol és veu citogenèticament desafavorit (equivaldria a una no-disjunció).

Pel que fa a les dades publicades per altres autors, els 56 estudis de segregació que utilitzen la tècnica de FISH (**Annex I; Taula I.2**) mostren un comportament molt més heterogeni que l'observat a la nostra població, amb casos en els que, els productes majoritaris, poden ser qualsevol dels tres modes de segregació desequilibrats (**Figura 6.3**; casos 1, 2, i 3).

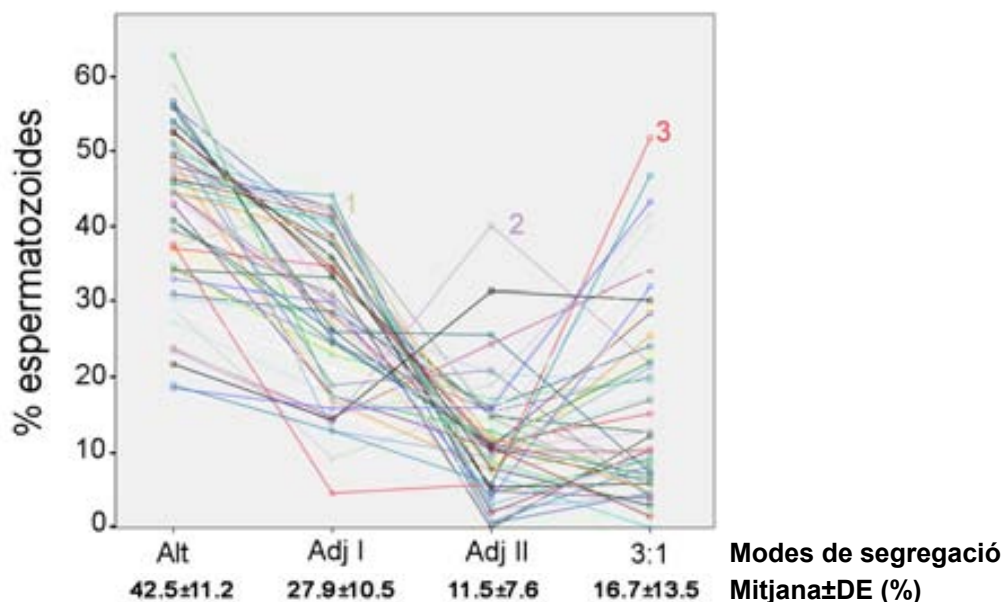


Figura 6.3- Resultats publicats dels estudis de segregació en portadors de translocacions recíproques mitjançant FISH en espermatozoides. Cada un dels casos analitzats està representat per un color diferent. Els casos 1, 2 i 3 mostren una prevalença dels modes de segregació adjacent I, adjacent II i 3:1 respectivament (Escudero et al. 2003).

Els factors que poden explicar les variacions dels patrons de segregació observats en translocacions recíproques s'apunten a continuació.

► Factors cromosòmics

Clàssicament, aquestes diferències de comportament han estat associades a les característiques citogenètiques de les reorganitzacions (Shi i Martin 2001). Per tal d'acotar els factors responsables dels resultats obtinguts a la nostra població, els casos van ser agrupats en funció de la similitud dels patrons de segregació mitjançant una anàlisi de conglomerats jeràrquics. El dendrograma resultant mostra l'existència de dos comportaments clarament diferenciats: un patró amb freqüències progressivament decreixents dels modes alternant, adjacent I, adjacent II i 3:1 (Grup 1), i un patró amb absència dels modes adjacent II i 3:1 (Grup 2).

Pel que fa a les translocacions recíproques classificades en el Grup 1, els paràmetres cromosòmics valorats no evidencien cap característica cromosòmica que justifiqui la distribució dels casos en els subgrups formats. Tot i integrar dues reorganitzacions que, a més d'un tetravalent, presenten certa tendència a adoptar altres configuracions meiòtiques (**Taula 4.4**), aquestes no demostren un comportament significativament diferent de la resta. Això s'explicaria per:

- $t(11;22)$ (Anton et al. 2004b)

En les situacions on es formés una configuració III+I (34%), la segregació a l'atzar de l'univalent donaria lloc majoritàriament a productes amb un contingut alternant (50%) o 3:1 (50%). Per tant, el patró de segregació d'aquesta reorganització tan sols es podria veure modificat per un lleuger increment dels productes amb contingut 3:1 respecte a les segregacions adjacent I i adjacent II, mentre que la segregació alternant continuaria essent la majoritària.

- $t(9;20)$

La formació de les configuracions II+II i III+I, tindria lloc amb freqüències relativament baixes (11% i 12% respectivament) de manera que els seus efectes encara haurien de ser més menors. En cas d'adoptar una configuració III+I, les conseqüències serien les mateixes que les descrites per la $t(11;22)$. Pel que fa a la formació de dos bivalents, aquesta configuració principalment donaria lloc a gàmetes amb contingut alternant i adjacent I (veure **Figura 6.4**). Per tant, els efectes produïts per la combinació d'aquestes situacions quedarien repartits entre els diversos de modes de segregació, i per tant difícilment alterarien el patró global de segregació descrit per als individus del Grup 1.

En els individus del Grup 2, l'avaluació de les característiques cromosòmiques mostra l'existència de les següents particularitats:

- Participació d'un cromosoma acrocèntric.
- Localització del centròmer del cromosoma acrocèntric al centre de la creu.
- Presència de segments translocats extremadament curts.
- Configuracions meiótiques esperades en forma de tetravalent obert (60-70%) i dos bivalents (30-40%).

A anafase I, i com a resultat d'aquests factors, els cromosomes implicats poden segregar amb elevada freqüència com si fossin 2 bivalents independents. En aquests casos, la biorientació dels centròmers homòlegs dóna lloc a gàmetes amb contingut alternant (50%) o adjacent I (50%) (**Figura 6.4**), ja que les segregacions adjacent II o 3:1 impliquen fenòmens de no-disjunció (**Figura 6.4**). Aquest fet explicaria per què els gàmetes corresponents a aquests últims modes són tan minoritaris, especialment els productes derivats de la segregació adjacent II, que només s'originarien per una doble no disjunció (**Figura 6.4**).

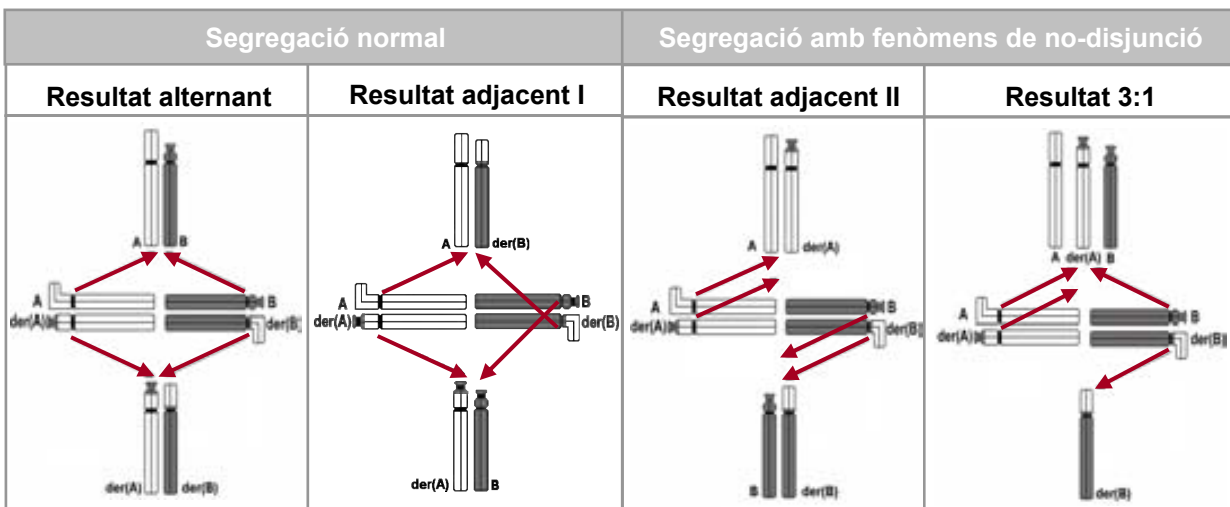


Figura 6.4- Resultats possibles de la segregació dels cromosomes implicats en una translocació recíproca disposats en forma de dos bivalents.

Recentment s'ha publicat un estudi de segregació realitzat en un portador d'una translocació recíproca amb característiques similars (Brugnon et al. 2006). Aquest individu amb cariotip 46,XY,t(2;22)(q33;p11) mostra un patró de segregació molt semblant al dels individus del Grup 2 (**Annex I; Taula I.2**) corroborant la influència d'aquests paràmetres en el comportament de la reorganització.

De forma poblacional, els individus del Grup 1 i del Grup 2 presenten una producció de gàmetes amb contingut adjacent I i adjacent II influenciada per la mida dels segments translocats i dels segments cèntrics respectivament. La relació entre aquest comportament i la simetria de les creus va ser descrita per Rickards (1983) i corroborada posteriorment en un estudi realitzat per Faraut et al. (2000).

La influència de la mida dels segments cèntrics i translocats en la segregació de les translocacions recíproques es basa en el balanç de forces que s'estableix en el repartiment dels cromosomes d'un tetravalent amb configuració oberta. En aquesta situació, la distribució dels centròmers segueix preferentment un repartiment 1/1/1/1 que genera productes alternants, però l'equilibri també es pot assolir a través d'una distribució 1/2/1 (**Figura 6.5**). En una reorganització amb un segment translocat molt curt (absència de recombinació), el tetravalent queda obert amb un cromosoma normal a un extrem i el derivatiu de l'altre cromosoma a l'extrem oposat. En aquesta situació, el repartiment 1/2/1 equival a al mode de segregació adjacent I (**Figura 6.5A**). En canvi quan el segment curt és un dels no translocats, el tetravalent queda obert amb un cromosoma normal a un extrem i el seu derivatiu a l'altre. En aquest cas el repartiment 1/2/1 és equivalent a una segregació adjacent II (**Figura 6.5B**).

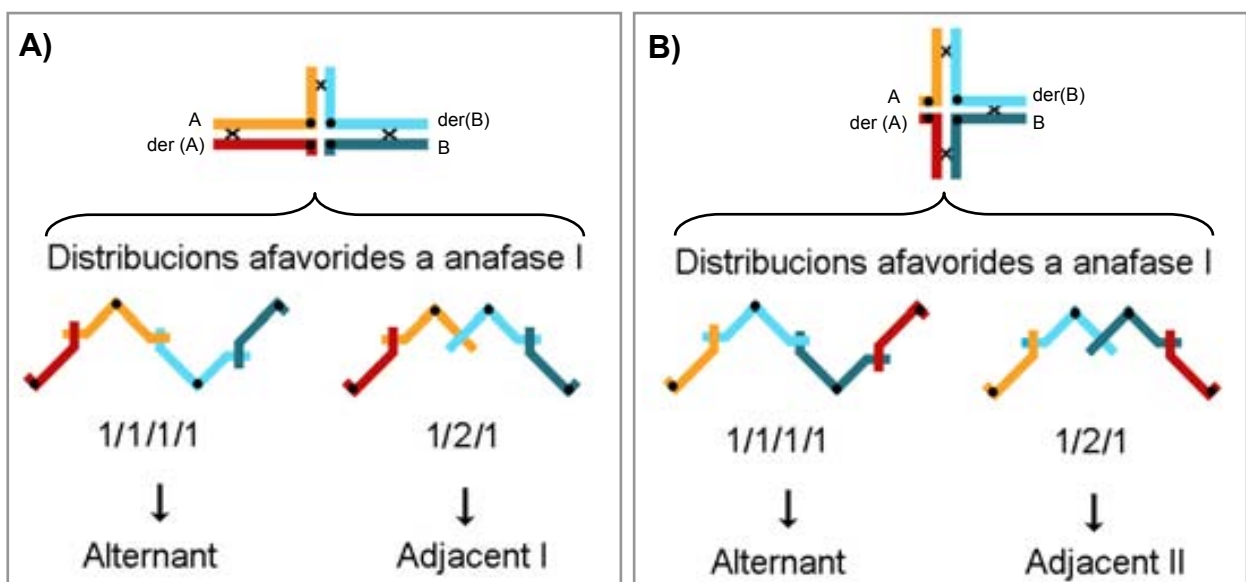


Figura 6.5- Orientacions centromèriques més afavorides citogenèticament en un tetravalent amb configuració oberta degut a: A) absència de recombinació en un dels segments translocats; B) absència de recombinació en un dels segments cèntrics.

Els resultats obtinguts a la nostra població confirmen la relació entre aquests paràmetres, tot i que les variacions de les freqüències dels modes adjacent I i

adjacent II es compensen de diverses maneres en els patrons de segregació de cada individu. Per aquest motiu, i donat que la mida és un paràmetre d'efecte progressiu, la seva influència no queda reflectida en el dendrograma.

► Factors no cromosòmics

Tot i que els paràmetres citogenètics esmentats expliquen la majoria de les divergències observades en la nostra població d'estudi, aquests factors no són suficients per justificar l'elevat grau d'heterogeneïtat observat a la literatura (**Figura 6.3**). En aquest punt és important remarcar que, gran part de la variabilitat observada prové de determinats estudis que presenten una ocurrència inusualment elevada dels modes de segregació citogenèticament més desfavorits, tals com l'adjacent II (Escudero et al. 2003), o el mode 3:1 (Estop et al. 1999; Van Assche et al. 1999; Geneix et al. 2002; Escudero et al. 2003; Brugnon et al. 2006). Alguns casos també mostren una predominança d'aquests modes respecte la segregació adjacent I encara que mantenen la segregació alternant com a majoritària (Mennicke et al. 1997; Martini et al. 1998; Rives et al. 2003a; Nishikawa et al. 2008) (**Annex I; Taula I.2**).

Tot i que alguns d'aquests resultats queden justificats pels autors (Estop et al. 1999; Van Assche et al. 1999), molts dels percentatges incrementats són deguts a la presència de tan sols alguns dels productes possibles dels modes de segregació implicats, bàsicament aquells definits per un nombre més baix de senyals d'hibridació. En canvi, els productes complementaris amb major nombre de senyals, són presents en proporcions de 10 a 200 vegades inferiors (Mennicke et al. 1997; Estop et al. 1999; Geneix et al. 2002; Brugnon et al. 2006). En aquests resultats queden paleses les limitacions pròpies de la tècnica de FISH que impedeixen discernir entre els errors d'hibridació i les absències de senyal, i que podrien explicar una part important de les divergències observades. Aquest factor també es pot veure condicionat per la major complexitat dels estudis de segregació en translocacions recíproques que, en contraposició als estudis en translocacions Robertsonianes i inversions, es caracteritzen per:

- Requerir un mínim de tres sondes per distingir tots els productes de segregació possibles (17 combinacions de senyals diferents; apartat 3.3.3). Les sondes utilitzades sovint tenen mides i eficiències d'hibridació diferents, i com més n'hi hagi, més properes quedaran dins d'un mateix nucli, dificultant-ne la interpretació.

- Les absències de senyals resultants d'errors d'hibridació sovint no impedeixen que les cèl·lules afectades es classifiquin dins algun mode segregació diferent del que provenen en realitat (en altres reorganitzacions, els errors d'hibridació majoritàriament donen lloc a productes no catalogables). Aquest fet provoca sobreestimacions dels modes de segregació amb menor nombre de senyals amb detriment d'altres productes, i també una distorsió de les proporcions 1:1 dels productes complementaris.

6.1.3- INVERSIONS

Els estudis de segregació realitzats en portadors d'inversions mostren una producció de gàmetes recombinants que oscil·la entre pràcticament nul·la, moderada i elevada. A la literatura (**Annex I; Taula I.3**) els valors observats també descriuen des d'una absència total d'aneusomies de recombinació (Balkan et al. 1983; Martin 1986; Jenderny et al. 1992; Martin et al. 1994; Colls et al. 1997; Brown et al. 1998; Martin 1999; Morel et al. 2007) fins a la presència de més del 25% de gàmetes desequilibrats (Martin 1991; Navarro et al. 1993; Mikhaail-Philips et al. 2004; Mikhaail-Philips et al. 2005; Caer et al. 2007).

En una revisió retrospectiva de les dades (Anton et al. 2005) ja es va demostrar que aquesta heterogeneïtat no es dona a l'atzar, sinó que està relacionada amb la mida i la proporció del segment invertit, i que a mesura que augmenten aquestes variables, major nombre d'espermatozoides amb aneusomies de recombinació es produeixen.

Estudis de segregació publicats més recentment³ han ampliat el ventall de inversions analitzades amb mides i proporcions diferents (**Annex I; Taula I.3**), permetent així actualitzar les correlacions realitzades (Anton et al. 2005). Amb les dades actuals, la producció de gàmetes recombinants s'ajusta més a la proporció del segment invertit ($r=0.817$; $p=1.18 \times 10^{-9}$) (**Figura 6.6A**) que no pas la mida de la inversió ($r=0.701$; $p=1.93 \times 10^{-6}$) (**Figura 6.6B**), tot i que en ambdós casos continua havent-hi una correlació significativa.

³ Les inversions són les reorganitzacions estructurals menys estudiades, sobretot degut a la seva baixa incidència poblacional. Dels 26 estudis de FISH publicats fins al moment (**Annex I; Taula I.3**), 18 d'ells han estat publicats en els últims dos anys.

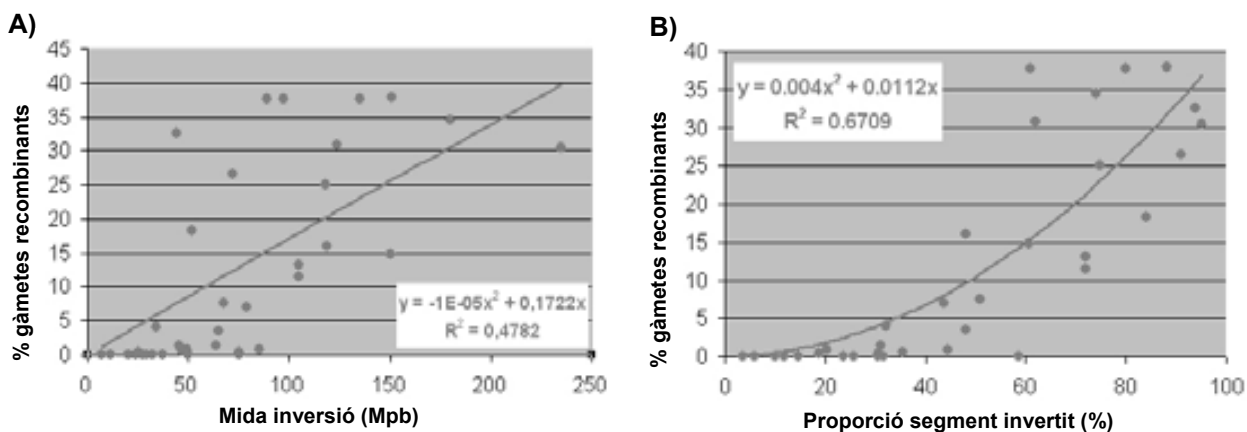


Figura 6.6- Relació entre: A) la mida del segment invertit (Mb) i el percentatge de gàmetes recombinants; B) la proporció del segment invertit i el percentatge de gàmetes recombinants.

Aquest reajustament es deu principalment a la incorporació de casos en els que les inversions estan localitzades en cromosomes petits. En aquestes situacions, segments de poques Mpb poder arribar a representar una proporció molt elevada del cromosoma (**Figura 6.7**) i per tant, determinar l'aparellament preferent de la regió invertida. Tot i la baixa freqüència de quismes que s'esperen en aquests cromosomes (Laurie i Hulten 1985; Sun et al. 2004; Codina-Pascual et al. 2006a), aquests es donaran amb elevada probabilitat dins de la regió invertida formant aneusomies de recombinació (Anton et al. 2007a).

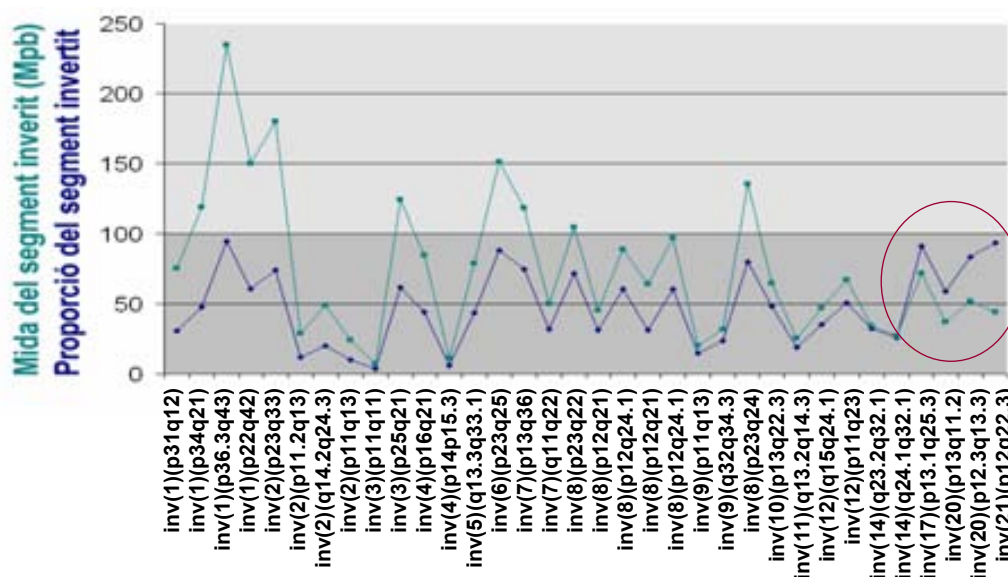


Figura 6.7- Mida i proporció de les inversions publicades (ordenades pel cromosoma implicat). El cercle assenjala els casos en els que, inversions de mida molt petita, representen una proporció molt gran dins del cromosoma.

6.2- EFECTE INTERCROMOSÒMIC

Les dades derivades dels estudis d'ICE realitzats en les tres poblacions de reorganitzacions cromosòmiques, descriuen una incidència global del 38% que majoritàriament es reparteix entre els portadors de translocacions recíproques i Robertsonianes (**Figura 6.8**).

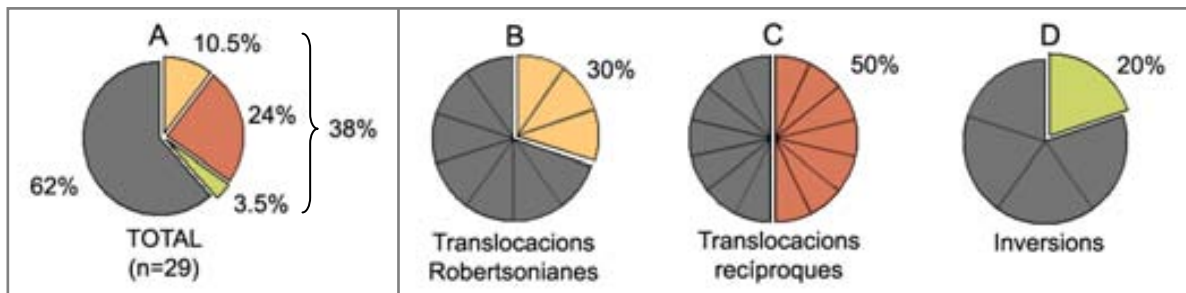


Figura 6.8- Incidències de casos amb ICE positiu en portadors de translocacions Robertsonianes, recíproques i inversions.

Les incidències calculades a partir dels estudis publicats, en els que s'avaluen les freqüències d'aneuploidies per cromosomes que inclouen els sexuals o els del grup G en portadors de reorganitzacions estructurals, no són significativament diferents de les nostres (Test de Fisher; $p > 0.05$).

En el conjunt de dades totals (**Figura 6.9**), les translocacions Robertsonianes apareixen com les reorganitzacions amb major susceptibilitat de presentar increments d'aneuploidies/diploidies (54%), seguides per les translocacions recíproques (46%), mentre que les inversions continuen presentant una incidència més baixa (18%). Aquestes dades posen en relleu que gairebé la meitat dels portadors de reorganitzacions estructurals produeixen una quantitat de gàmetes amb anomalies cromosòmiques numèriques, no relacionades amb la reorganització, més elevada que la resta de la població (**Figura 6.9**).

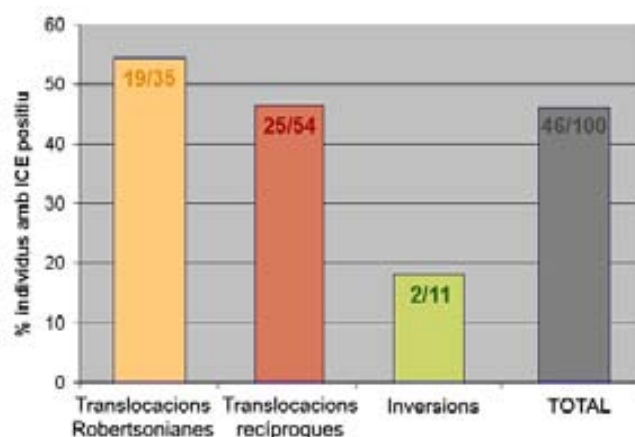


Figura 6.9- Incidència de casos amb ICE positiu entre els portadors de translocacions Robertsonianes, recíproques i inversions (**Annex II**).

6.2.1- ICE EN PORTADORS DE TRANSLOCACIONS ROBERTSONIANES

El fet que les translocacions Robertsonianes siguin les reorganitzacions que mostren una major incidència de casos amb efecte intercromosòmic positiu (ICE+), podria estar relacionat amb les característiques citogenètiques dels cromosomes acrocèntrics:

- Els satèl·lits dels braços p estan formats per heterocromatina polimòrfica que pot donar lloc a heteromorfismes i generar problemes de reconeixement sinàptic entre homòlegs (Solarí et al. 1991; Codina-Pascual et al. 2006b). Això pot afavorir l'aparellament heteròleg amb altres regions asinàptiques (e.g. el bivalent XY) ja sigui per ajustament sinàptic com a mecanisme de rescat meiótic (Saadallah and Hultén 1986) o bé degut a un cert reconeixement d'homologia (veure el punt següent).
- Les regions heterocromàtiques no centromèriques dels cromosomes 15 i Y presenten un elevat grau d'homologia (Burk et al. 1985). Aquest fet s'ha relacionat amb la freqüent associació dels complexos sinaptonemals d'aquests cromosomes (Metzler-Guillemain et al. 1999; Codina-Pascual et al. 2006b). També s'ha observat una certa homologia en seqüències dels braços p dels cromosomes 13, 14, 15 i 21 i la regió subtelomèrica Xp/Yp que podria explicar algunes associacions observades a paquità entre aquests cromosomes (Codina-Pascual et al. 2006b)
- Les propietats descrites en els punts anteriors es poden veure afavorides per una co-localització cromosòmica. En aquest sentit és interessant apuntar que la ubicació dels acrocèntrics en el nucli interfàsic i fins a inicis de paquità està estretament lligada a la formació del nuclèol, estructura que els manté a tots ells molt propers (Stahl et al. 1991; Schwarzacher i Mosgoeller 2000). Per altra banda, també s'ha descrit una aproximació de fragments nucleolars al bivalent XY en la formació de la vesícula sexual (revisat per Tres 2005), que situaria els cromosomes acrocèntrics en regions properes a la dels gonosomes.

El fet que per un mateix tipus de translocació Robertsoniana s'observin casos amb ICE+ i d'altres no, podria estar relacionat amb la presència de variants polimòrfiques distintes en els diversos individus portadors de les reorganitzacions. S'han descrit cromosomes acrocèntrics de mides tan variables que, en casos extrems poden suposar des de la presència d'un braç p pràcticament inexistent

(Earle et al. 1992) fins a un braç *p* més llarg que el braç *q* (Friedrich et al. 1996). Aquestes variacions interindividuais podrien explicar la diferent capacitat d'interferir en la segregació d'altres cromosomes per part de les reorganitzacions que involucren cromosomes acrocèntrics.

6.2.2- ICE EN PORTADORS DE TRANSLOCACIONS RECÍPROQUES

Els factors cromosòmics que poden influir en l'elevada incidència d'ICE en portadors de translocacions recíproques són més diversos donat que la majoria de reorganitzacions impliquen cromosomes i punts de trencament diferents.

Comparant la simetria de les creus de translocació de les 14 reorganitzacions del nostre estudi, no s'observen configuracions preferents entre els casos amb ICE+ o amb ICE- ja que, tal i com es pot observar a la **Figura 6.10**, en els dos grups d'individus hi ha reorganitzacions amb característiques similars.

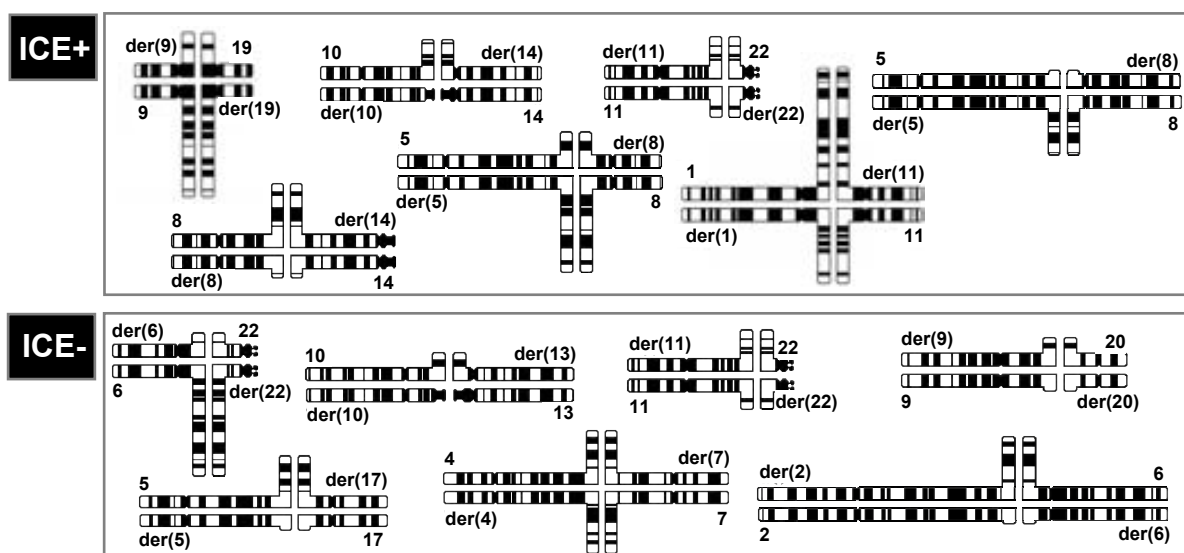


Figura 6.10- Creus de translocació dels individus amb increments d'anomalies cromosòmiques numèriques (ICE+) i dels que no presenten increments (ICE-).

En relació amb els cromosomes implicats, les dades recollides de la bibliografia (**Annex II; Taula II.2**) mostren que alguns d'ells estan més representats que d'altres entre les reorganitzacions amb ICE+ (e.g. cromosomes 8, 11 i 15), tot i que el baix nombre de casos analitzats per cada cromosoma no permet establir una influència directa (**Figura 6.11**).

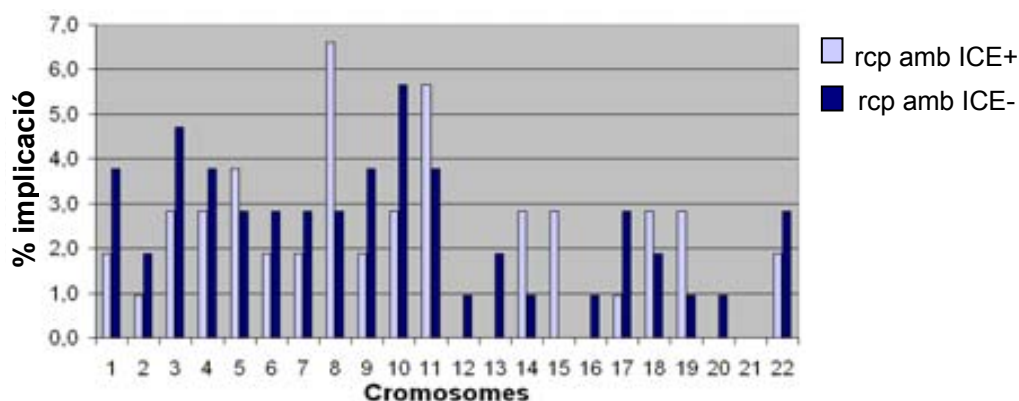


Figura 6.11- Freqüència d'implicació de cada cromosoma en les translocacions recíproques en les que s'han realitzat estudis d'ICE.

De forma genèrica, no s'ha observat una implicació preferent d'autosomes amb regions heterocromàtiques polimòrfiques (cromosomes 1, 9 i 16) en els individus amb ICE+ sinó que, al contrari del que es podria esperar, aquests predominen entre els casos amb ICE- (Test de Fisher; $p=0.019$) (**Figura 6.11**).

Pel que fa als cromosomes acrocèntrics, aquests no mostren una major presència entre les translocacions recíproques amb ICE+ (Test de Fisher; $p=0.371$), fet que no confirma la predisposició d'aquests cromosomes en la generació d'ICE (veure apartat anterior). Tot i això, l'aparellament dels cromosomes implicats en aquest tipus de reorganitzacions combina la participació de més factors que les translocacions Robertsonianes (e.g. cromosomes amb diferents morfologies, centròmers localitzats en posicions externes/internes).

A més, les dades actuals encara són força minses per establir conclusions definitives, ja que tan sols catorze de les translocacions recíproques publicades impliquen cromosomes acrocèntrics (vuit de les quals formen part del grup d'individus amb ICE+) i divuit casos involucren cromosomes amb regions d'heterocromatina polimòrfica (quatre d'ells amb ICE+).

Finalment, els estudis que han avaluat la ocurrencia d'ICE en portadors de la mateixa translocació recíproca (Rousseaux et al. 1995b; Anton et al. 2004b; Wiland et al. 2007; Vozdova et al. 2008) han evidenciat comportaments diversos. L'estudi de Rousseaux et al. (1995b) realitzat en dos germans portadors de la reorganització $t(6;11)(q14;p14)$, va mostrar increments significatius d'aneuploidies en els dos casos. El mateix va ser observat en l'estudi d'un pare i un fill portadors de la $t(4;5)(q15.1;q12)$ (Wiland et al. 2007). En canvi, els resultats observats per

Vozdova et al. (2008) en un pare i un fill portadors de la reorganització t(11;18)(q22;q21.3), només van indicar l'existència d'ICE+ en el progenitor, fet que els autors van atribuir a la diferència d'edat d'aquests individus. Per altra banda, també en el cas de dos germans portadors de la t(11;22)(q23;q11) (Anton et al. 2004b), es va observar ICE+ en només un d'ells. En aquesta ocasió, el resultat es va relacionar amb la presència d'un cromosoma acrocèntric que podria implicar variants polimòrfiques diferents en els dos germans.

6.2.3- ICE EN PORTADORS D'INVERSIONS

En els portadors d'inversions cromosòmiques, el nombre de casos analitzats és força més baix (11 individus) que en les altres reorganitzacions, fet que condiciona la interpretació dels resultats.

Per altra banda, el dos individus on s'han observat ICE+ (Amiel et al. 2001; Anton et al. 2007a) presenten unes reorganitzacions especialment singulars. En el cas del portador de la inv(9qh+) (**Annex II; Taula II.3**), els autors relacionen les elevades incidències d'aneuploïdies detectades, amb la gran diferència de mida de les regions heterocromàtiques dels dos cromosomes 9 (Amiel et al. 2001). Pel que fa a l'altre individu amb ICE+, aquest presenta dues inversions en el seu cariotip: inv(4)(p14p15.3), inv(Y)(p11.1q11.23) (**Taula 4.7**). En aquest cas, els resultats es poden relacionar amb altres factors que també predisposen a la formació d'anomalies numèriques (Anton et al. 2007a):

- Alteració de la capacitat d'orientació del centròmer del cromosoma Y com a resultat del canvi de localització provocat per la inversió, que el situa prop de la regió heterocromàtica Yq13 (heterocromatinització de les zones contigües).
- Disrupció de gens relacionats amb l'espermatogènesi localitzats a la regió Yq com a resultat de la inversió en aquest cromosoma. L'alteració d'aquests gens és present en el 5-10% dels individus infèrtils que, per altra banda, també constitueixen una població amb taxes elevades d'anomalies numèriques en els gàmetes.

Per ajudar a clarificar els resultats obtinguts, considerem que seria necessària la incorporació de més dades sobre la presència d'anomalies numèriques en portadors d'inversions.

6.2.4- ALTRES FACTORS RELACIONATS AMB LA PRODUCCIÓ D'ESPERMATOZOIDES AMB ANOMALIES NUMÈRIQUES

La presència d'aneuploïdies/diploïdies en espermatozoides humans també s'ha associat a altres factors que es discuteixen a continuació.

► Alteracions del seminograma

Els individus infèrtils amb cariotip somàtic normal sovint presenten freqüències incrementades d'espermatozoides amb anomalies numèriques (Machev et al. 2005a; Miharu 2005; Rives 2005). Tal com s'ha comentat anteriorment (apartat 1.2.1), els portadors de variants estructurals, freqüentment també mostren paràmetres seminals alterats. Aquest fet porta a alguns autors a relacionar els increments d'anomalies numèriques detectats en els espermatozoides d'aquests individus amb les alteracions del seminograma, enlloc de considerar-les resultants d'un efecte intercromosòmic (Pellestor et al. 2001). D'acord amb aquesta teoria, l'origen de les anomalies numèriques estaria vinculat a una alteració generalitzada dels processos meiótics (Egozcue et al. 2000), com a resultat de mutacions en gens reguladors de diverses etapes de la meiosi (sinapsi, recombinació i reparació del DNA) (Baarends et al. 2001) i/o de la influència d'un microambient testicular alterat (Mroz et al. 1999).

Una dada que recolza la intervenció d'un efecte intercromosòmic és la comparació de casos amb increments d'anomalies numèriques en el grup d'individus infèrtils amb cariotip normal, respecte als portadors de reorganitzacions: mentre en el primer cas les incidències observades són inferiors al 20% (revisat per Egozcue et al. 2003), en els portadors de variants cromosòmiques, les freqüències són notablement superiors (47%; **Figura 6.9**). La diferència entre aquests valors fa necessària una font d'aneuploïdies addicional en el grup de reorganitzats, on hi tindria cabuda la participació d'un efecte intercromosòmic.

► Edat

Nombrosos estudis han intentat determinar l'efecte de l'edat en la producció d'espermatozoides amb anomalies numèriques (revisat per Slotter et al. 2004; Buwe et al. 2005). Els resultats publicats són molt discordants, des d'estudis que no troben cap relació amb els cromosomes estudiats (Guttenbach i Schmid 1990, 1991; Lahdetie et al. 1996; McInnes et al. 1998; Shi i Martin 2000; Luetjens et al. 2002; Bosch et al. 2003; Wyrobek et al. 2006), altres que en troben, però només per alguns dels cromosomes (Griffin et al. 1995; Martin et al. 1995; Kinakin et al.

1997; Rousseaux et al. 1998; Asada et al. 2000; Guttenbach et al. 2000; Bosch et al. 2001; Lowe et al. 2001), i fins i tot hi ha qui descriu una correlació inversa (Robbins et al. 1995; Robbins et al. 1997b).

El principal handicap de les dades recollides és la heterogeneïtat en quant al nombre d'individus analitzats, rang d'edat dels individus, i cromosomes avaluats. Fins i tot les poblacions control utilitzades per contrastar les dades obtingudes són molt divergents, de manera que resulta difícil obtenir-ne conclusions.

Pel que fa a la nostra poblacions, les edats dels 29 individus estudiats (rang 22-55 anys; **Taula 3.1, 3.2 i 3.3**) no mostren cap relació amb les freqüències detectades en els estudis d'ICE, ni pel que fa a les diploïdies (Coeficient de correlació de Pearson $r=-0.019$; $p=0.992$) (**Figura 6.12**), ni amb les aneuploïdies dels cromosomes sexuals (Coeficient de correlació de Pearson $r=-0.035$; $p=0.858$) (**Figura 6.12**).

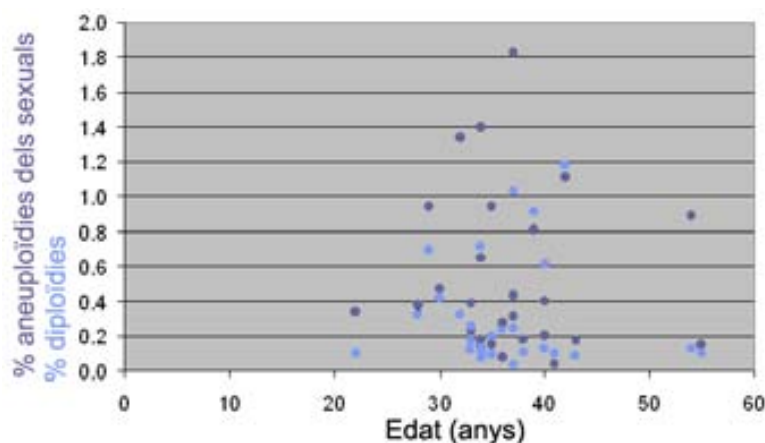


Figura 6.12- Representació gràfica de la relació entre l'edat dels individus estudiats i les freqüències de diploïdies i aneuploïdies dels cromosomes sexuals obtingudes en els estudis d'ICE.

► Substàncies tòxiques

Les anomalies numèriques en espermatozoides també s'han relacionat amb l'efecte de diverses substàncies exògenes. L'espectre de productes avaluats amb els que s'ha trobat relació inclou des de fàrmacs (Baumgartner et al. 2001), agents genotòxics utilitzats en el tractament de processos cancerosos (Monteil et al. 1997; Robbins et al. 1997a; De Mas et al. 2001), pesticides (Padungtod et al. 1999; Recio et al. 2001) i el tabac (Robbins et al. 1997b; Rubes et al. 1998; Shi et al. 2001). Alguns estudis també han avaluat l'efecte de la cafeïna i l'alcohol amb resultats poc concloents (revisat per Robbins et al. 2005).

El cert és que, la majoria d'historials clínics, no recullen informació relativa a aquests factors i per tant, no és possible valorar la seva influència en la producció d'aneuploïdies. De totes maneres, és d'esperar que la seva distribució sigui equivalent en els individus estudiats i en la població control (on tampoc queda recollida aquesta informació) i així, els efectes es vegin compensats.

6.3- CONSELL REPRODUCTIU

Els estudis de FISH en espermatozoides constitueixen un dels recursos que els centres especialitzats ofereixen als portadors de reorganitzacions cromosòmiques. L'absència de criteris definits en la utilització d'aquesta eina de diagnòstic, és un fet que queda confrontat amb les dades recollides en aquest treball. La informació discutida en els apartats anteriors en relació amb els estudis de segregació i ICE realitzats en portadors de translocacions Robertsonianes, recíproques i inversions posa de manifest l'existència d'uns estàndards de comportament que mereixen ser considerats a l'hora d'indicar aquest estudi. Aquestes consideracions es recullen a continuació:

- Portadors de translocacions Robertsonianes

Donat que la producció de gàmetes normals/equilibrats en tots els portadors de translocacions Robertsonianes és molt homogènia, la realització d'estudis de segregació adreçats al consell reproductiu d'aquests individus no estaria indicada ja que no s'espera que aportin informació substancial per millorar la orientació de la parella.

- Portadors de translocacions recíproques

La producció de gàmetes normals/equilibrats en portadors de translocacions recíproques és força més ajustada del que es desprèn de les dades publicades a la literatura. Tot i això, algunes reorganitzacions amb característiques citogenètiques concretes, poden presentar una taxa de gàmetes normals/equilibrats diferent de l'esperada i per tan mereixerien una consideració particular.

Així doncs, tot i que la realització d'estudis de segregació no és necessària en la majoria de portadors de translocacions recíproques, aquests estarien indicats en aquells casos on hi hagi la sospita d'una desviació del comportament estàndard.

- Portadors d'inversions

Els portadors d'inversions petites produeixen una quantitat molt baixa o inexistent d'aneusomies de recombinació, mentre que en portadors d'inversions molt grans, les freqüències són molt elevades. Donat que en aquestes dues tipologies el risc reproductiu és conegut, l'elaboració del pronòstic no requereix la realització d'estudis de segregació particulars.

En canvi, en portadors d'inversions de mides intermèdies, els percentatges d'espermatozoides recombinants produïts poden variar des de valors mínims fins a quantitats substancialment més elevades. En aquests casos, els estudis de segregació sí que estarien indicats ja que podrien ajudar a establir el risc reproductiu de cada individu.

- Efecte intercromosòmic

Els portadors de reorganitzacions cromosòmiques estructurals presenten una tendència més elevada que la població general a formar gàmetes amb anomalies numèriques. Per aquest motiu, els estudis d'ICE mitjançant FISH en espermatozoides estarien indicats en aquests individus, ja que aportarien informació rellevant sobre la predisposició particular de formar gàmetes aneuploides i, per tant, de transmetre aquestes anomalies a la descendència. En aquells casos on es detecti un risc reproductiu addicional, aquesta informació pot ser utilitzada per adequar indicacions posteriors.



7- Conclusions

1a

Les translocacions Robertsonianes presenten un patró de segregació molt similar, amb un clar predomini de la segregació alternant, que es tradueix en una producció de prop del 84% d'espermatozoides normals/equilibrats.

2a

No s'han detectat factors cromosòmics que influenciïn en el patró de segregació de les translocacions Robertsonianes.

3a

Les translocacions recíproques presenten un patró de segregació més similar del que es desprèn de les dades de la literatura. La segregació alternant es confirma com el mode més afavorit, donant lloc a una producció d'espermatozoides normals/equilibrats al voltant del 45%.

4a

Els patrons de segregació de les translocacions recíproques s'han relacionat amb diverses característiques citogenètiques:

- El mode de segregació adjacent I es veu afavorit amb la disminució de la mida del segment translocat més curt.
- El mode de segregació adjacent II es veu afavorit amb la disminució de la mida del segment cèntric més curt.
- La presència de segments translocats extremadament curts, juntament amb la localització del centròmer d'un cromosoma acrocèntric al centre de la creu de translocació, afavoreix les segregacions alternant i adjacent I en detriment dels modes adjacent II i 3:1.

5a

En portadors d'inversions, la producció de gàmetes amb aneusomies de recombinació està directament relacionada amb la mida del segment invertit i sobretot amb la proporció d'aquest segment respecte el cromosoma reorganitzat:

- Els portadors d'inversions petites produeixen un nombre molt baix o nul d'espermatozoides cromosòmicament desequilibrats.

- Els portadors d'inversions de mides intermèdies produeixen una quantitat d'espermatozoides cromosòmicament desequilibrats que varia des de valors desestimables fins a quantitats significatives.
- Els portadors d'inversions grans produeixen una elevada quantitat d'espermatozoides cromosòmicament desequilibrats.

6a

Els portadors de reorganitzacions cromosòmiques presenten, amb elevada incidència, taxes incrementades d'espermatozoides amb anomalies numèriques relacionades amb un efecte intercromosòmic.

7a

No s'han pogut identificar els factors cromosòmics implicats en l'aparició del fenomen d'efecte intercromosòmic.

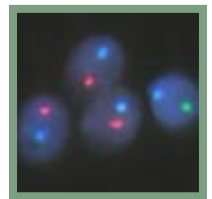
8a

Els estudis de segregació mitjançant FISH en espermatozoides adreçats al consell reproductiu:

- No es consideren indicats en portadors de translocacions Robertsonianes donat que el risc reproductiu d'aquests individus és molt similar.
- Es consideren indicats en portadors d'algunes translocacions recíproques amb característiques citogenètiques que facin sospitar d'una desviació del patró de segregació estàndard.
- Es consideren indicats en portadors d'inversions de mides intermèdies donat que el risc reproductiu d'aquests individus és substancialment variable.

9a

Els estudis d'ICE mitjançant FISH en espermatozoides adreçats al consell reproductiu, es consideren indicats en tots els portadors de reorganitzacions estructurals ja que permeten determinar el risc particular de transmetre anomalies cromosòmiques numèriques a la descendència.



8- Annexes

ANNEX I:
Recull bibliogràfic de dades de segregació

Taula I.1- Dades publicades referents a la segregació de translocacions Robertsonianes.

Translocacions	Tècnica	Edat	Total (n)	Alt (%)	Adj (%)	3:0/2n (%)	Altres (%)	Referències
der(14;21)	1	-	24	87.5	12.5	0.0	-	Balkan i Martin (1983b)
der(13;14)	1	41	78	92.3	7.7	0.0	-	Pellestor et al. (1987)
der(13;14)	1	23	117	74.0	27.0	0.0	-	Martin (1988a)
der(13;15)	1	40	67	89.6	10.4	0.0	-	Pellestor (1990)
der(15;22)	1	35	115	89.6	10.4	0.0	-	Martin et al. (1992)
der(21;22)	1	52	149	96.6	2.7	0.7	-	Syme i Martin (1992)
der(14;21)	2	34	1116	72.2	18.0	0.8	9.0	Rousseaux et al. (1995a)
der(14;21)	2	42	1052	71.0	29.0	0.0	0.0	Yang et al. (1997)
der(21;22)	2	54	350	60.0	36.0	0.0	4.0	Mennicke et al. (1997)
der(13;14)	1	32	45	86.7	8.9	0.0	4.4	Ogawa et al. (2000)
der(13;14)	2	29	1016	73.6	23.3	1.5	1.6	Escudero et al. (2000)
der(13;14)	2	25	1006	77.4	19.1	2.0	1.4	Escudero et al. (2000)
der(14;21)	2	32	16578	88.4	11.3	0.2	0.2	Honda et al. (2000)
der(13;14)	2	28	2984	81.3	18.1	0.6	-	Morel et al. (2001a)
der(13;14)	2	34	1109	82.6	16.3	1.1	-	Morel et al. (2001a)
der(13;14)	2	41	1009	88.9	10.8	0.3	-	Morel et al. (2001a)
der(13;14)	2	38	1045	91.0	9.0	-	-	Frydman et al. (2001)
der(13;14)	2	33	1023	90.0	10.0	-	-	Frydman et al. (2001)
der(13;14)	2	34	1008	87.1	12.9	-	-	Frydman et al. (2001)
der(14;21)	2	38	1033	91.3	8.7	-	-	Frydman et al. (2001)
der(14;21)	2	29	1075	92.8	7.2	-	-	Frydman et al. (2001)
der(14;21)	2	31	963	93.0	7.0	-	-	Frydman et al. (2001)
der(21;21)*	2	36	2230	100	-	-	-	Acar et al. (2002)
der(13;14)	2	33	1361	86.5	12.6	0.4	0.5	Anton et al. (2004a)
der(13;14)	2	37	2901	87.5	12.2	0.0	0.3	Anton et al. (2004a)
der(13;14)	2	35	1012	83.0	14.5	0.2	2.3	Anton et al. (2004a)
der(13;14)	2	33	1002	84.5	14.2	0.2	1.1	Anton et al. (2004a)
der(13;14)	2	30	1272	88.1	11.4	0.4	0.1	Anton et al. (2004a)
der(13;14)	2	32	6128	88.2	11.1	0.3	0.3	Anton et al. (2004a)
der(13;14)	2	33	774	87.7	11.6	0.4	0.3	Anton et al. (2004a)
der(13;14)	2	39	1201	88.8	13.2	0.0	-	Roux et al. (2005)
der(13;14)	2	36	1227	81.8	18.2	0.0	-	Roux et al. (2005)
der(13;14)	2	32	2020	82.1	17.9	0.0	-	Roux et al. (2005)
der(13;22)	2	38	7052	86.7	12.8	0.5	-	Anahory et al. (2005)
der(13;14)	2	-	1001	83.5	16.5	0.0	-	Brugnon et al. (2006)
der(13;14)	2	-	978	85.8	13.5	0.7	-	Brugnon et al. (2006)
der(13;14)	2	-	1003	88.5	7.9	3.6	-	Brugnon et al. (2006)
der(13;15)	2	-	1021	76.0	23.4	0.6	-	Brugnon et al. (2006)
der(21;22)	2	-	1016	85.7	13.6	0.7	-	Brugnon et al. (2006)
der(13;14)	2	-	500	81.8	18.6	0.4	0.0	Ogur et al. (2006)
der(13;14)	2	-	500	78.4	21.2	0.4	0.0	Ogur et al. (2006)
der(13;14)	2	-	1032	85.5	14.3	0.0	0.0	Ogur et al. (2006)
der(13;14)	2	-	507	85.8	13.7	0.6	0.0	Ogur et al. (2006)
der(13;14)	2	-	1001	83.5	16.5	0.0	0.0	Ogur et al. (2006)
der(13;14)	2	-	1016	89.5	10.2	0.6	0.0	Ogur et al. (2006)
der(13;14)	2	-	657	84.3	15.1	0.5	0.0	Ogur et al. (2006)

1=Bandes G en cromosomes d'espermatozoide; 2=FISH en nuclis interfàsics.

* Els resultats d'aquest cas no s'han tingut en compte en el resum de dades totals (final de la taula) degut a les seves característiques particulars.

(Segueix a la pàgina següent)

(Ve de la pàgina anterior)

Translocacions	Tècnica	Edat	Total (n)	Alt (%)	Adj (%)	3:0/2n (%)	Altres (%)	Referències
der(13;15)	2	-	1109	82.7	17.0	0.2	-	Ogur et al. (2006)
der(13;15)	2	-	1021	76.0	23.4	0.6	-	Ogur et al. (2006)
der(14;15)	2	-	819	81.6	15.8	2.0	-	Ogur et al. (2006)
der(14;15)	2	-	1548	86.4	12.8	0.6	-	Ogur et al. (2006)
der(14;21)	2	-	996	87.9	11.9	0.0	-	Ogur et al. (2006)
der(14;21)	2	-	1102	85.7	12.8	1.3	-	Ogur et al. (2006)
der(21;22)	2	-	1016	85.6	13.3	0.7	-	Ogur et al. (2006)
der(13;15)	2	35	891	77.6	20.4	1.0	-	Moradkhani et al. (2006a)
der(13;15)	2	35	5000	91.1	8.3	0.6	-	Moradkhani et al. (2006a)
der(14;15)	2	31	5000	92.8	6.7	0.4	-	Moradkhani et al. (2006a)
der(14;15)	2	40	5000	92.3	7.2	0.5	-	Moradkhani et al. (2006a)
der(14;22)	2	37	5087	78.5	20.9	0.5	-	Moradkhani et al. (2006b)
der(14;22)	2	30	5237	79.0	20.4	0.6	-	Moradkhani et al. (2006b)
der(14;22)	2	34	5428	79.4	20.0	0.6	-	Moradkhani et al. (2006b)
der(13;21)	2	40	10223	88.4	11.1	0.3	-	Hatakeyama et al. (2006)
der(13;14)	2	34	1629	90.9	8.2	0.7	0.2	Kekesi et al. (2007)
der(13;14)	2	38	1096	82.8	16.4	0.8	0.0	Chen et al. (2007)
der(13;14)	2	30	2006	81.3	17.0	0.9	0.9	Chen et al. (2007)
der(13;14)	2	33	430	78.1	19.5	2.3	0.0	Chen et al. (2007)
der(14;22)	2	35	5152	80.5	18.9	0.5	0.1	Chen et al. (2007)
der(13;14)	2	30	516	83.9	14.2	1.6	0.4	Chen et al. (2007)
der(13;21)	2	36	5985	86.9	11.7	0.8	0.7	Chen et al. (2007)
der(13;22)	2	28	1134	85.5	13.9	0.5	0.1	Anton et al. no publicat
der(14;21)	2	-	1102	78.0	21.5	0.3	0.3	Anton et al. no publicat
der(14;21)	2	-	523	85.1	14.7	0.2	0.0	Anton et al. no publicat

1=Bandes G en cromosomes d'espermatozoide; 2=FISH en nuclis interfàsics.

* Els resultats d'aquest cas no s'han tingut en compte en el resum de dades totals (final de la taula) degut a les seves característiques particulars.

Resum dades totals en rob

Màxim	16578	96.6	36.9	3.6	9.0
Mínim	24	60	2.7	0.0	0.0
Mitjana	1965	84.4	14.7	0.9	0.9
±Desviació Estàndard	2638	6.2	5.7	0.6	1.9

Taula I.2- Dades publicades referents a la segregació de translocacions recíproques.

Translocacions	Tècnica	Edat	Total (n)	Alt (%)	N (%)	E (%)	Adj I (%)	Adj II (%)	3:1 (%)	4:0/2n (%)	Referències
t(5;18)(p15;q21)	1b	39	31	80.7	45.2	35.5	16.1	0.0	3.2	0.0	Balkan i Martin (1983a)
t(6;14)(p24;q22)	1b	34	19	68.4	42.1	26.3	31.6	0.0	0.0	0.0	Balkan i Martin (1983a)
t(11;22)(q23;q11)	1b	30	13	23.1	7.7	15.4	38.5	23.1	15.4	0.0	Martin (1984)
t(3;16)(p23;q24)	1b	25	201	37.3	19.9	17.4	41.3	16.4	5.0	0.0	Brandriff et al. (1986)
t(8;15)(p22;q21)	1b	31	226	37.1	19.0	18.1	38.1	21.2	3.5	0.0	Brandriff et al. (1986)
t(7;14)(q11;q24.1) †	1b	36	23	30.4	17.4	13.0	47.8	0.0	17.4	4.3	Burns et al. (1986)
t(5;11)(p13;q23.2) †	1b	36	23	69.6	60.9	8.7	26.1	0.0	4.3	0.0	Burns et al. (1986)
t(2;5)(p11;q15) †	1a	26	75	42.7	-	-	30.7	5.3	21.3	0.0	Templado et al. (1988)
t(9;10)(q34;q11)	1b	30	171	40.4	20.8	19.6	48.2	5.4	5.9	0.0	Martin (1988b)
t(4;17)(q21.3;q23.2)	1c	35	60	56.7	25.0	31.7	35.0	6.7	1.6	0.0	Pellestor et al. (1989)
t(5;13)(q11;q33)	1c	27	57	77.2	42.1	35.1	21.1	1.7	0.0	0.0	Pellestor et al. (1989)
t(6;7)(q27;q22.1)	1c	35	84	51.2	21.4	29.8	48.8	0.0	0.0	0.0	Pellestor et al. (1989)
t(9;18)(p12;q12.1)	1c	26	82	34.2	20.7	13.5	63.4	0.0	2.4	0.0	Pellestor et al. (1989)
t(1;2)(q32;q36)	1a	32	105	40.9	23.8	17.1	41.9	5.7	11.4	0.0	Templado et al. (1990)
t(2;9)(q21;p22)	1b	36	208	43.3	25.0	18.3	28.4	24.1	4.3	0.0	Martin et al. (1990a)
t(4;6)(q28;p23)	1b	25	158	45.6	24.1	21.5	51.9	1.9	0.6	0.0	Martin et al. (1990a)
t(7;14)(q21;q13)	1b	55	19	52.7	31.6	21.2	31.6	15.8	0.0	0.0	Martin et al. (1990a)
t(12;20)(q24.3;q11)	1b	40	113	46.8	22.1	24.7	41.6	9.7	1.8	0.0	Martin et al. (1990b)
t(1;4)(p36.2;q31.3)	1a	38	115	46.0	31.3	14.7	38.2	6.9	8.7	0.0	Estop et al. (1992)
t(1;4)(p36.2;q31.3)	1a	40	90	39.0	20.0	19.0	50.0	7.7	3.3	0.0	Estop et al. (1992)
t(1;9)(q22;q31)	1b	31	173	45.6	27.7	17.9	37.6	13.3	3.5	0.0	Martin (1992)
t(1;11)(p36.3;q13.1)	1b	29	548	33.2	15.9	17.3	42.9	15.9	8.0	0.0	Spriggs et al. (1992)
t(2;17)(q35;p13)	1a	36	18	56.0	50.0	6.0	33.0	11.0	0.0	0.0	Jenderny et al. (1992)
t(3;8)(p13;p21)	1a	29	73	34.2	27.4	6.8	43.8	20.5	1.4	0.0	Jenderny et al. (1992)
t(11;17)(p11.2;q21.3)	1b	24	184	38.6	21.8	16.8	32.1	26.6	2.7	0.0	Spriggs et al. (1992)
t(16;19)(q11.1;q13.3)	1b	39	172	39.5	18.6	20.9	27.9	31.4	1.2	0.0	Martin (1992)
t(3;11)(q25.3;q25)	1b	24	262	47.7	24.4	23.3	45.8	5.7	0.8	0.0	Martin i Hulten (1993)
t(7;20)(q33.2;p13)	1b	37	263	38.3	20.4	17.9	39.9	16.3	5.3	0.0	Martin i Hulten (1993)
t(15;22)(q26.1;q11.2)	1b	31	147	34.0	21.1	12.9	39.5	22.4	4.1	0.0	Martin i Hulten (1993)
t(2;3)(q24;p26)	1b	30	83	55.4	30.1	25.3	36.1	7.2	1.2	0.0	Martin (1994)
t(2;18)(p21;q11.2)	1a	33	165	41.9	16.4	25.5	35.2	14.4	8.4	0.0	Estop et al. (1995)
t(3;15)(q26.2;q26.1)	1a	37	50	48.0	22.0	26.0	36.0	12.0	2.0	2.0	Estop et al. (1995)
t(5;7)(q13;p15.1)	1a	34	157	40.2	20.4	19.8	26.2	16.6	17.0	0.0	Estop et al. (1995)
t(10;12)(q26.1;p13.3)	1a	40	72	61.1	33.3	27.8	26.3	6.9	5.6	0.0	Estop et al. (1995)
t(9;13)(q21.1;q21.2)	1b	33	81	46.9	25.9	21.0	35.8	17.3	0.0	0.0	Martin i Spriggs (1995)
t(7;9)(q33;p21)	1c	34	54	44.4	22.2	22.2	37.0	12.0	5.6	0.0	Pellestor et al. (1997)
t(7;18)(q35;q11)	1c	29	72	33.3	15.3	18.1	43.1	19.5	4.2	0.0	Pellestor et al. (1997)
t(5;7)(q21;q32)	1d	-	296	49.6	28.0	21.6	32.4	16.2	1.7	0.0	Cifuentes et al. (1999a)
t(9;17)(p13;q21.3)	1d	-	131	51.1	30.5	20.6	31.3	14.5	3.1	0.0	Cifuentes et al. (1999b)
t(9;17)(q12;p12)	1d	-	85	51.8	31.8	20.0	27.1	17.6	3.5	0.0	Cifuentes et al. (1999b)
t(4;8)(q28;p23)	1d	31	352	35.4	19.3	16.1	33.2	19.9	11.3	0.0	Oliver-Bonet et al. (2001)
t(1;13)(q41;q22)	1d	-	255	41.3	24.4	16.9	41.6	14.5	2.3	0.0	Oliver-Bonet et al. (2002)
t(3;19)(p21;p13.3)	1d	-	128	39.2	18.0	21.2	35.9	21.8	3.2	0.0	Oliver-Bonet et al. (2002)

1=cromosomes d'espermatozoide: 1a=Bandes G; 1b=Bandes Q; 1c=Bandes R; 1d=WCP.

2=FISH en nuclis interfàsics.

N=normals; E=equilibrats.

† La semblança entre els segments translocats impedeix discriminar entre N/E.

‡ Translocacions en el mateix portador.

§ En els quatre individus es van analitzar un total de 8790.

¶ Dades resumides de 2 recomptes.

(Ve de la pàgina anterior)

Translocacions	Tècnica	Edat	Total (n)	Alt (%)	Adj I (%)	Adj II (%)	3:1 (%)	4:0/2n (%)	Altres (%)	Referències
t(1;10)(p22.1;q22.3)	2	40	4036	48.1	42.5	4.9	3.9	0.3	0.4	Van Hummelen et al. (1997)
t(14;20)(p11.2;p11.1)	2	29	1003	51.0	19.0	21.0	4.0	0.0	5.0	Mennicke et al. (1997)
t(2;18)(p21;q11.2)	2	33	3139	43.6	29.8	10.5	12.8	0.5	2.8	Estop et al. (1998)
t(3;11)(q27.3;q24.3)	2	33	4029	44.3	15.8	6.6	28.9	0.8	3.6	Martini et al. (1998)
t(7;8)(q11.21;cen)	2	30	34527	56.7	25.1	11.1	7.1	0.0	0.0	Mercier et al. (1998)
t(5;8)(q33;q13)	2	42	10344	45.1	38.3	7.0	6.6	1.2	1.8	Blanco et al. (1998a) Anton et al. (acceptat)
t(8;9)(q24.2;q32)	2	39	3118	44.4	41.0	3.1	9.4	0.6	1.4	Estop et al. (1998)
t(3;9)(p25;q32)	2	34	10278	47.2	42.0	14.7	4.5	0.2	0.3	Honda et al. (1999)
t(3;9)(q26.2;q32)	2	32	10022	52.5	35.9	5.4	5.9	0.1	0.0	Honda et al. (1999)
t(11;22)(q23;q11)	2	44	1925	27.4	17.6	12.5	40.1	0.5	1.9	Estop et al. (1999)
t(11;22)(q25;q12)	2	29	1012	29.1	21.2	15.1	34.6	0.0	0.0	Van Assche et al. (1999)
t(4;8)(q28;p23)	2	31	6590	30.5	28.5	20.5	19.5	0.0	0.0	Oliver-Bonet et al. (2001)
t(15;17)(q21;q25)	2	32	8790 ¥	51.2	35.3	8.9	2.8	0.0	1.8	Cora et al. (2002)
t(15;17)(q21;q25)	2	27	¥	49.4	37.7	7.9	3.0	0.0	2.0	Cora et al. (2002)
t(15;17)(q21;q25)	2	24	¥	48.1	40.3	8.5	2.4	0.0	0.8	Cora et al. (2002)
t(15;17)(q21;q25)	2	55	¥	52.7	34.4	10.7	1.5	9.0	0.7	Cora et al. (2002)
t(17;22)(q11;q12)	2	35	700	19.0	12.9	5.8	46.8	0.0	15.5	Geneix et al. (2002)
t(1;6)(p22;p21.3)	2	-	1006	37.4	43.1	7.7	10.7	0.0	1.1	Escudero et al. (2003)
t(1;13)(q42.12;q32.2)	2	-	1005	37.0	29.0	8.2	23.3	0.0	2.6	Escudero et al. (2003)
t(1;18)(p36;q21)	2	-	1000	29.2	9.2	16.6	43.2	0.0	1.8	Escudero et al. (2003)
t(2;18)(q11.2;q21.1)	2	-	1079	31.1	28.8	16.0	24.2	0.0	0.0	Escudero et al. (2003)
t(3;4)(q12;p15.2)	2	-	1000	23.9	14.7	24.5	34.2	0.0	2.7	Escudero et al. (2003)
t(6;9)(p12;q13)	2	-	1015	23.6	14.1	40.1	21.9	0.0	0.4	Escudero et al. (2003)
t(8;22)(q24.22;q11.21)	2	-	1003	23.8	15.0	19.0	41.7	0.0	0.7	Escudero et al. (2003)
t(11;22)(q23;q11)	2	-	1044	21.8	14.4	31.5	30.3	0.0	2.0	Escudero et al. (2003)
t(15;22)(q22;q13)	2	-	1000	18.6	15.9	16.0	43.3	0.0	5.8	Escudero et al. (2003)
t(2;6)(p12;q24)	2	-	7000	49.9	42.4	2.5	4.2	0.0	0.0	Lim et al. (2003)
t(9;10)(q11;p11.1)	2	25	5157	56.3	12.9	9.4	21.4	0.0	0.0	Rives et al. (2003a)
t(9;22)(q21;q11.2)§	2	32	4124	55.9	26.4	10.6	6.2	0.6	0.3	Morel et al. (2004a)
t(7;8)(q11.21;cen)	2	-	10023	62.8	17.6	12.8	6.5	0.3	0.0	Morel et al. (2004b)
t(10;14)(q24;q32)	2	-	3111	44.6	38.6	11.9	4.9	0.0	0.0	Oliver-Bonet et al. (2004)
t(11;17)(q13.1;p11.2)	2	-	5371	40.8	26.1	25.7	7.4	0.0	0.0	Oliver-Bonet et al. (2004)
t(1;13)(q24;q10)	2	-	124	37.1	34.7	11.2	15.2	-	-	Yakut et al. (2006)
t(1;2)(q25;q23)	2	-	996	56.0	38.8	0.6	4.6	0.0	-	Brugnon et al. (2006)
t(1;2)(q42;q21)	2	-	1008	46.0	40.5	4.6	9.0	0.2	-	Brugnon et al. (2006)
t(2;22)(q33;p11)	2	-	1026	54.0	43.8	0.3	2.0	0.0	-	Brugnon et al. (2006)
t(4;18)(q31.1;p11.2)	2	-	1049	46.0	41.3	2.0	10.3	0.0	-	Brugnon et al. (2006)
t(4;11)(q35;q13)	2	-	1000	33.0	30.0	4.0	32.0	1.0	-	Brugnon et al. (2006)
t(7;15)(p15.3;q26)	2	-	500	37.6	4.6	5.8	51.8	0.2	-	Brugnon et al. (2006)
t(10;17)(q22.1;q21.3)	2	-	1002	58.8	30.2	0.8	10.2	0.0	-	Brugnon et al. (2006)
t(6;13)(p21.1;q32)	2	-	1220	39.5	31.0	10.4	17.0	-	-	Yakut et al. (2006)
t(7;10)(q21;q22)	2	-	1286	51.3	27.3	12.1	7.5	-	-	Yakut et al. (2006)
t(15;17)(q11;p12)	2	-	1201	40.5	36.3	16.7	6.0	-	-	Yakut et al. (2006)

1=cromosomes d'espermatozoide: 1a=Bandes G; 1b=Bandes Q; 1c=Bandes R; 1d=WCP.

2=FISH en nuclis interfàsics.

N=normals; E=equilibrats.

† La semblança entre els segments translocats impedeix discriminar entre N/E.

‡ Translocacions en el mateix portador.

¥ En els quatre individus es van analitzar un total de 8790.

§ Dades resumides de 2 recomptes.

(Segueix a la pàgina següent)

(Ve de la pàgina anterior)

Translocacions	Tècnica	Edat	Total (n)	Alt (%)	Adj I (%)	Adj II (%)	3:1 (%)	4:0/2n (%)	Altres (%)	Referències
t(7;13)(q34;q13)	2	36	5000	34.0	23.5	8.7	29.4	-	5.9	Midro et al. (2006)
t(1;17)(p11;q11)	2	41	1575	53.7	38.0	7.0	-	1.3	-	Kekesi et al. (2007)
t(4;6)(q31.1;p25)	2	25	1050	54.0	33.6	-	12.2	0.2	-	Kekesi et al. (2007)
t(4;5)(p15.1;p12)	2	35	≥3500	34.4	24.6	15.5	20.1	-	5.4	Wiland et al. (2007)
t(4;5)(p15.1;p12)	2	65	≥3500	34.8	23.1	17.1	19.7	-	5.3	Wiland et al. (2007)
t(2;7)(p11.2;q22)	2	43	2500	34.2	33.2	14.9	12.7	0.0	5.0	Wiland et al. (2007)
t(2;11)(q35;q14)	2	34	3300	48.8	16.9	7.6	25.6	1.1	-	Nishikawa et al. (2008)
t(3;10)(q23;q24)	2	25	3255	54.0	17.1	11.5	17.5	0.4	-	Nishikawa et al. (2008)
t(6;17)(p25;q23)	2	28	3400	40.7	24.7	11.3	22.1	1.2	-	Nishikawa et al. (2008)
t(7;12)(q22;q24.1)	2	30	3200	42.9	17.6	10.6	28.6	0.3	-	Nishikawa et al. (2008)
t(11;18)(q23;q23)	2	27	1000	59.9	19.3	14.0	4.9	0.2	1.2	Vozdova et al. (2008)
t(11;18)(q22;q21.3)	2	27	1007	44.5	28.4	10.1	10.2	0.7	6.6	Vozdova et al. (2008)
t(11;18)(q22;q21.3)	2	53	1010	44.6	30.0	15.4	8.3	0.3	1.5	Vozdova et al. (2008)
t(4;7)(q31.1;q32)	2	40	1046	45.3	38.0	9.8	6.1	0.1	0.4	Anton et al. (acceptat)
t(1;11)(q12;q13)	2	37	648	51.2	21.8	16.7	8.0	1.9	0.5	Anton et al. (acceptat)
t(2;6)(q37;p21)	2	37	1005	39.5	33.8	12.2	13.6	0.2	0.6	Anton et al. (acceptat)
t(5;8)(q35.1;p11.2)	2	54	2531	47.7	34.5	9.6	7.0	0.1	1.2	Anton et al. (acceptat)
t(5;15)(q35;q22)	2	-	1032	45.9	44.1	0.7	8.3	0.0	1.0	Anton et al. (acceptat)
t(5;17)(q31;p13)	2	34	1453	45.1	37.0	14.6	3.2	0.1	0.0	Anton et al. (acceptat)
t(6;22)(q13;q13)	2	-	1163	46.7	33.5	16.0	3.4	0.0	0.4	Anton et al. (acceptat)
t(8;14)(q22;q32)	2	39	641	41.5	35.3	4.4	12.3	1.7	4.8	Anton et al. (acceptat)
t(9;20)(p24;q13.1)	2	22	1006	37.1	29.5	25.4	7.1	0.2	0.8	Anton et al. (acceptat)
t(10;14)(q24;p11.2)	2	40	1051	56.7	38.3	1.4	2.3	0.6	0.4	Anton et al. (acceptat)
t(9;19)(q10;p10)	2	34	1054	43.5	32.4	17.8	4.7	1.2	0.4	Anton et al. (acceptat)
t(10;13)(p13;p13)	2	36	1054	61.8	34.4	0.2	2.5	0.5	0.8	Anton et al. (acceptat)
t(11;22)(q23;q11)	2	35	3596	42.9	33.3	13.2	9.8	0.1	0.6	Anton et al. (acceptat) Anton et al. (2004b)
t(11;22)(q23;q11)	2	34	4058	45.0	29.8	15.9	8.6	0.2	0.5	Anton et al. (acceptat) Anton et al. (2004b)

1=cromosomes d'espermatozoide: 1a=Bandes G; 1b=Bandes Q; 1c=Bandes R; 1d=WCP.

2=FISH en nuclis interfàsics.

N=normals; E=equilibrats.

† La semblança entre els segments translocats impedeix discriminar entre N/E.

‡ Translocacions en el mateix portador.

¥ En els quatre individus es van analitzar un total de 8790.

§ Dades resumides de 2 recomptes.

A partir de tots els estudis en rcp

Màxim	34527	80.7	63.4	40.1	51.8	9.0	15.5
Mínim	13	18.6	4.6	0.0	0.0	0.0	0.0
Mitjana	1926	44.2	32.0	11.8	11.0	0.3	1.9
±Desviació Estàndard	3837	11.1	10.2	7.7	11.6	1.0	2.7

A partir dels estudis de FISH en rcp

Màxim	34527	62.8	44.1	40.1	51.8	9.0	15.5
Mínim	124	18.6	4.6	0.2	1.5	0.0	0.0
Mitjana	2973	43.2	29.0	11.5	14.9	0.4	1.9
±Desviació Estàndard	4522	10.5	9.8	7.4	12.8	1.2	2.7

Taula I.3- Dades publicades referents a la segregació d'inversions.

Inversions	Tècnica	Edat	Total (n)	AR (%)	Mida inv (Mpb)	Cr. invertit (%)	Referències
inv(3)(p11q11)	1	-	111	0.0	7.0	3.5	Balkan et al. (1983)
inv(7)(q11q22)	1	-	94	0.0	50.0	31.7	Martin (1986)
inv(3)(p25q21)	1	37	144	30.8	124.0	62	Martin (1991)
inv(20)(p13q11.2)	1	32	26	0.0	37.0	58.7	Jenderny et al. (1992)
inv(8)(p23q22) †	1	23	166	11.4	105.0	71.9	Martin (1993)
inv(7)(p13q36)	1	38	140	25.0	118.0	74.7	Navarro et al. (1993)
inv(1)(p31q12) †	1	39	159	0.0	75.0	30.5	Martin et al. (1994)
inv(9)(p11q13)	1	34	314	0.0	20.0	14.7	Colls et al. (1997)
inv(9)(q32q34.3)	3	36	282	0.0	32.0	23.5	Brown et al. (1998)
inv(1)(p31q12) †	2	39	6006	0.4	75.3	30.5	Jaarola et al. (1998)
inv(8)(p23q22) †	2	23	3168	13.1	104.9	71.9	Jaarola et al. (1998)
inv(14)(q24.1q32.1)	1	41	120	0.0	27.0	25.7	Martin (1999)
inv(2)(q14.2q24.3)	2	35	496	0.8	49.1	20.2	Devine et al. (2000)
inv(6)(p23q25)	2	37	10049	37.9	150.8	88.2	Anton et al. (2002)
inv(1)(p34q21)	2	36	1636	16.0	118.6	48.0	Yakut et al. (2003)
inv(2)(p23q33)	2	36	1005	34.5	180.1	74.1	Mikhaail-Philips et al. (2004)
inv(17)(p13.1q25.3)	2	36	2000	26.5	71.9	91.1	Mikhaail-Philips et al. (2005)
inv(2)(p11.2q13)	2	38	5460	0.0	28.9	11.9	Anton et al. (2006)
inv(4)(p16q21)	2	36	6406	0.8	85.0	44.5	Anton et al. (2006)
inv(4)(p14p15.3),inv(Y)	2	29	8158	0.0	11.1	5.8	Anton et al. (2006)
inv(10)(p13q22.3)	2	55	10723	3.4	65.1	48.2	Anton et al. (2006)
inv(1)(p36.3q43)	2	33	69	30.4	234.7	95.0	Morel et al. (2007)
inv(2)(p11q13)	2	29	702	0.0	24.3	10.0	Morel et al. (2007)
inv(8)(p12q21)	2	35	3402	1.4	45.3	31.0	Morel et al. (2007)
inv(8)(p12q24.1)	2	30	2601	37.7	89.1	61.0	Morel et al. (2007)
inv(12)(p11q23)	2	36	5051	7.5	67.3	51.0	Morel et al. (2007)
inv(20)(p12.3q13.33)	2	28	625	18.2	52.1	84.0	Morel et al. (2007)
inv(21)(p12q22.3)	2	40	3400	32.6	44.1	93.8	Morel et al. (2007)
inv(1)(p22q42)	2	30	2133	14.8	150.0	60.7	Chantot-Bastaraud et al. (2007)
inv(8)(p12q21)	2	35	3402	1.4	64.0	31.0	Caer et al. (2007)
inv(8)(p12q24.1)	2	30	2601	37.7	97.0	61.0	Caer et al. (2007)
inv(8)(p23q24)	2	43	2045	37.7	135.0	80.0	Caer et al. (2007)
inv(5)(q13.3q33.1)	2	-	128	7.0	79.0	43.6	Bhatt et al. (2007)
inv(14)(q23.2q32.1)	2	-	250	4.0	34.2	32.2	Bhatt et al. (2007)
inv(11)(q13.2q14.3)	2	43	1001	0.4	25.2	18.8	Vialard et al. (2007)
inv(12)(q15q24.1)	2	40	1000	0.5	47.0	35.6	Vialard et al. (2007)

1=Bandes G en cromosomes d'espermatozoide; 2=FISH en nuclis interfàsics.

AR=aneusomies de recombinació.

†, † mateixos pacients.

A partir dels estudis en inv

Màxim	10723	37.9	234.7	95.0
Mínim	26	0.0	11.1	5.8
Mltjana	2363	12.0	75.7	47.8
±Desviació Estàndard	2889	14.4	51.0	27.1

ANNEX II:
Recull bibliogràfic de dades d'ICE

Taula II.1- Dades publicades referents a la valoració de l'ICE en portadors de translocacions Robertsonianes.

Translocacions	Cromosomes analitzats																			Referències
	1	4	6	9	13	15	16	17	18	20	21	22	X	XY*	Y	2n				
der(14;21)	0.67												0.00	0.52	0.00	1.42	Rousseaux et al. (1995a)			
der(13;22)		0.12							0.29							0.21	Blanco et al. (2000)			
der(13;14)								0.77	0.80				0.20	0.23	0.60	0.83	Morel et al. (2001)			
der(13;14)								0.78	0.49				0.10	0.20	0.10	0.88	Morel et al. (2001)			
der(13;14)								0.30	0.40	0.00	0.10	0.00	0.00	0.10	0.00	0.10	Morel et al. (2001)			
der(13;14)								0.00	0.11	0.00	0.23		0.23			0.25	Anton et al. (2004a)			
der(13;14)								0.11	0.10	0.10	0.44		0.44			0.03	Anton et al. (2004a)			
der(13;14)								0.12	0.07	0.07	0.94		0.94			0.10	Anton et al. (2004a)			
der(13;14)								0.00	0.06	0.17	0.18		0.18			0.18	Anton et al. (2004a)			
der(13;14)								0.05	0.31	0.18	0.47		0.47			0.42	Anton et al. (2004a)			
der(13;14)								0.00	0.66	0.08	1.34		1.34			0.32	Anton et al. (2004a)			
der(13;14)								0.00	0.23	0.23	0.39		0.39			0.12	Anton et al. (2004a)			
der(13;14)								0.17	0.16		0.28	0.30	0.25	0.23		0.23	Douet-Guilbert et al. (2005)			
der(14;21)					0.12			0.12			0.18	0.16	0.08	0.24		0.24	Douet-Guilbert et al. (2005)			
der(13;14)								0.16			0.16		0.16			0.67	Baccetti et al. (2005)			
der(13;14)								0.23			0.58		0.58			0.58	Baccetti et al. (2005)			
der(13;14)								0.14			0.66		0.66			1.09	Baccetti et al. (2005)			
der(13;14)								0.05			0.29		0.29			0.67	Baccetti et al. (2005)			
der(13;21)								0.32			0.48		0.48			0.57	Baccetti et al. (2005)			
der(14;22)								0.40			0.62		0.62			5.66	Baccetti et al. (2005)			
der(13;14)	0.33					0.87		0.35			0.05	0.13	0.02	0.03		0.03	Machev et al. (2005b)			
der(13;14)	1.63										0.21	0.21	0.36	0.18		0.18	Machev et al. (2005b)			
der(13;14)	2.21					1.87	0.50				0.20	0.08	0.40	0.03		0.03	Machev et al. (2005b)			
der(13;15)	0.78					0.57	0.27				0.14	0.18	0.34	0.14		0.14	Machev et al. (2005b)			
der(13;21)								0.03			0.15		0.15			0.05	Hatakeyama et al. (2006)			
der(13;14)								0.20			0.06	0.06	0.40	0.30		0.30	Kekesi et al. (2007)			
der(13;14)								0.00			0.67		0.67			0.19	Chen et al. (2007)			
der(13;14)								0.09			0.57		0.57			0.47	Chen et al. (2007)			
der(13;14)								0.00			4.56		4.56			6.46	Chen et al. (2007)			
der(13;14)								0.00			0.29		0.29			3.01	Chen et al. (2007)			
der(14;22)								0.00			0.12		0.12			0.04	Chen et al. (2007)			
der(13;21)								0.08			0.17		0.17			0.42	Chen et al. (2007)			
der(13;22)								0.03			0.38		0.38			0.34	Anton et al. no publicat			
der(14;21)								0.09			0.17		0.17			0.09	Anton et al. no publicat			
der(14;21)								0.09			0.04		0.04			0.09	Anton et al. no publicat			

Valors en **negreta**=diferències significatives *versus* controls.

* En absència de valors per disomies XX o YY, representa el valor total de disomies dels cromosomes sexuals.

Taula II.2- Dades publicades referents a la valoració de l'ICE en portadors de translocacions recíproques.

Translocacions	Cromosomes analitzats														Referències	
	1	6	7	8	9	13	15	16	17	18	21	X	XY*	Y		2n
t(6;11)(q14;p14)	0.30									0.01	0.07	0.02	0.02	0.02	0.21	Rousseaux et al. (1995b)
t(6;11)(q14;p14)	0.49									0.00	0.65	0.00	0.00	0.21	0.21	Rousseaux et al. (1995b)
t(2;14)(p23.1;q31)	0.39									0.01	0.43	0.01	0.27	0.27	0.27	Rousseaux et al. (1995b)
t(3;11)(q27.3;q24.3)					0.00					0.27						Martini et al. (1998)
t(1;10)(p22.1;q22.3)									0.01	0.07	0.02	0.02	0.34	0.34	0.34	Van Hummelen et al. (1997)
t(5;8)(q33;q13)	0.12								0.23	0.04	1.01	0.06	1.18	1.18	1.18	Blanco et al. (1998); Anton et al. (acceptat)
t(7;8)(q11.21;cen)									1.21				0.44	0.44	0.44	Mercier et al. (1998)
t(5;7)(q21;q32)									0.03	0.23	0.01	0.07	0.07	0.10	0.10	Cifuentes et al. (1999)
t(3;9)(q26.2;q32)									0.19	0.11	0.12	0.12	0.15	0.15	0.15	Honda et al. (1999)
t(3;9)(p25;q32)									0.23	0.13	0.12	0.14	0.16	0.16	0.16	Honda et al. (1999)
t(3;15)(p25;q15)	0.48								1.90				5.71	5.71	5.71	Blanco et al. (2000)
t(10;12)(p26.1;p13.3)									0.03	0.01	0.04	0.02				Estop et al. (2000)
t(2;8)(p21;q11.2)						0.13			0.21	0.03	0.09	0.02				Estop et al. (2000)
t(3;19)(p25;q12)						0.10			0.05	0.26	0.04	0.09	0.03			Estop et al. (2000)
t(5;8)(q33;q13)						0.05			0.12	0.13	0.03	0.34	0.00			Estop et al. (2000)
t(1;22)(q23;q11)						0.12			0.05	0.27	0.03	0.13	0.00			Estop et al. (2000)
t(3;4)(p25;p16)						0.14			0.03	0.24	0.03	0.12	0.00			Estop et al. (2000)
t(8;9)(q24.2;q32)						0.03			0.00	0.11	0.12	0.14	0.00			Estop et al. (2000)
t(10;18)(q24.1;p11.2)						0.07			0.19	0.04	0.20	0.02				Estop et al. (2000)
t(4;10)(q33;p12.2)						0.02			0.01	0.16	0.03	0.09	0.01			Estop et al. (2000)
t(4;8)(q28;p23)									0.40	0.55	0.62	0.14	0.46			Oliver-Bonet et al. (2001)
t(1;13)(q41;q22)									0.07	0.21	0.11	0.14	0.15	0.36	0.36	Oliver-Bonet et al. (2002)
t(3;19)(p21;p13.3)									0.05	0.23	0.13	0.26	0.14	0.18	0.18	Oliver-Bonet et al. (2002)
t(9;10)(q11;p11.1)									0.01	0.04	0.07	0.02	0.00			Rives et al. (2003)
t(10;15)(q26;q12)									0.81	0.17	0.17	0.14	1.44			Baccetti et al. (2002)
t(7;8)(q11.21;cen)									0.04	0.13	0.16	0.30	0.30			Morel et al. (2004)
t(10;14)(q24;q32)	0.09								0.06	0.12	0.05	0.09	0.09	0.28	0.28	Oliver-Bonet et al. (2004)
t(11;17)(q13.1;p11;2)	0.09								0.04	0.24	0.07	0.15	0.14	0.24	0.24	Oliver-Bonet et al. (2004)
t(1;17)(q32;p12)		0.11			0.19	0.22			0.02	0.14	0.04	0.10	0.06	0.31	0.31	Douet-Guilbert et al. (2005)

Valors en **negreta**=diferències significatives *versus* controls.

* En absència de valors per disomies XX o YY, representa el valor total de disomies pels cromosomes sexuals.

(ve de la pàgina anterior)

Cromosomes analitzats

Translocacions	1	6	7	8	9	13	15	16	17	18	21	X	XY*	Y	2n	Referències
t(9;16)(q34.2;p12)			0.14			0.16			0.08	0.16	0.00	0.12	0.06	0.38		Douet-Guilbert et al. (2005)
t(9;22)(q21;q11.2)			0.17			0.09			0.02	0.31	0.04	0.04	0.02	0.35		Douet-Guilbert et al. (2005)
t(8;18)(p22;q21)			0.11			0.03			NT	0.21	0.02	0.11	0.02	0.80		Douet-Guilbert et al. (2005)
t(3;17)(q23;q21)	0.60					0.55			0.21		0.00	0.11	0.07	0.07		Machev et al. (2005b)
t(15;19)(q11;q11)	3.34						2.16	1.30			0.00	0.79	0.28	0.68		Machev et al. (2005b)
t(1;7)(p11;q11)									0.20		0.06	0.10	0.20	0.06		Kekesi et al. (2007)
t(4;6)(q31.1;p25)									0.00		0.06	0.00	0.06	0.06		Kekesi et al. (2007)
t(4;5)(q15.1;q12)						1.31	0.51		0.32	0.26	0.10	0.29	0.09	0.20		Wiland et al. (2007)
t(4;5)(q15.1;q12)						0.29	0.14		0.28	0.44	0.21	0.32	0.17	0.10		Wiland et al. (2007)
t(11;18)(q23;q23)			0.00	0.07					0.31	0.02	0.43	0.18	0.44			Vozdova et al. (2008)
t(11;18)(q22;q21.3)			0.02	0.01					0.16	0.01	0.12	0.12	0.28			Vozdova et al. (2008)
t(11;18)(q22;q21.3)			0.06	0.08					0.18	0.02	0.47	0.21	0.58			Vozdova et al. (2008)
t(9;19)(q10;p10)									0.06	0.07	0.05	0.71				Anton et al. (acceptat)
t(1;11)(q12;q13)									0.06	1.70	0.06	1.02				Anton et al. (acceptat)
t(4;7)(q31.1;q32)									0.04	0.10	0.06	0.12				Anton et al. (acceptat)
t(2;6)(q37;p21)									0.03	0.20	0.08	0.04				Anton et al. (acceptat)
t(8;14)(q22;q32)									0.29	0.22	0.30	0.91				Anton et al. (acceptat)
t(5;8)(q35.1;p11.2)									0.18	0.16	0.55	0.13				Anton et al. (acceptat)
t(5;17)(q31;p13)									0.60	0.30	0.50	0.13				Anton et al. (acceptat)
t(9;20)(p24;q13.1)									0.22	0.04	0.08	0.10				Anton et al. (acceptat)
t(10;13)(p13;p13)									0.02	0.21	0.05	0.25				Anton et al. (acceptat)
t(10;14)(q24;p11.2)									0.06	0.18	0.16	0.62				Anton et al. (acceptat)
t(11;22)(q23;q11)						0.13			0.03	0.06	0.03	0.09	0.03	0.19		Anton et al. (2004b; acceptat)
t(11;22)(q23;q11)						0.07			0.11	0.08	0.17	0.09	0.39	0.10		Anton et al. (2004b; acceptat)
t(6;22)(q13;q13)									0.03	0.08	0.03	0.08				Anton et al. (acceptat)

Valors en **negreta** = diferències significatives *versus* controls.

* En absència de valors per disomies XX o YY, representa el valor total de disomies pels cromosomes sexuals.

Taula II.3- Dades publicades referents a la valoració de l'ICE en portadors d'inversions.

Inversions	Cromosomes analitzats									Referències
	6	8	13	18	21	X	XY	Y	2n	
inv(9)(p12q12)	0.02				0.19				0.29	Blanco et al. (2000)
inv(9qh+)		3.60		4.50		2.70	2.40	2.90		Amiel et al. (2001)
inv(6)(p23q25)				0.01		0.15	0.12	0.16	0.24	Anton et al. (2002)
inv(2)(p23q33)			0.19		0.20	0.03	0.57	0.03	0.39	Mikhaail-Philips et al. (2004)
inv(17)(p13.1q25.3)			0.06		0.18	0.03	0.24	0.02	0.21	Mikhaail-Philips et al. (2005)
inv(2)(p11.2q13)				0.00		0.01	0.14	0.03	0.10	Anton et al. (2006)
inv(4)(p16q21)				0.00		0.01	0.04	0.03	0.23	Anton et al. (2006)
inv(4)(p14p15.3),inv(Y)				0.09		0.17	0.54	0.23	0.69	Anton et al. (2006)
inv(10)(p13q22.3)				0.01		0.04	0.03	0.08	0.11	Anton et al. (2006)
inv(11)(q13.2q14.3)				¥		¥	¥	¥	0.00	Vialard et al. (2007)
inv(12)(q15q24.1)				‡		‡	‡	‡	0.00	Vialard et al. (2007)

Valors en **negreta**=Diferències significatives *versus* controls.

¥ Freqüència global de disomies=0.16

‡ Freqüència global de disomies=0.50

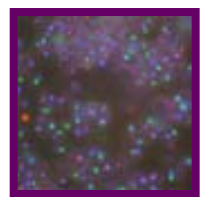
ANNEX III:
Recull de sondes utilitzades

Taula III- Combinacions de sondes utilitzades en els estudis de segregació i d'efecte inter cromosòmic.

ESTUDIS DE SEGREGACIÓ	Sondes			
rob				
der(13;14)	TelVysion 14q	LSI 13- RB1		
der(13;22)	TelVysion 13q	LSI 22-bcr		
der(14;21)	LSI 21q22	TEL 14q*		
rcp				
t(9;19)(q10;p10)	TelVysion 19q	TelVysion 19p	LSI 9q34	
t(1;11)(q12;q13)	TelVysion 1q	TelVysion 1p	CEP 11	
t(5;8)(q33;q13)	LSI 8q24 C-myc	LSI 5p15.2	CEP 8	CEP 8
t(4;7)(q31.1;q32)	TelVysion 4q	TelVysion 7p	CEP 4	
t(2;6)(q37;p21)	TelVysion 2q	TelVysion 2p	CEP 6	
t(8;14)(q22;q32)	TelVysion 14q	TEL 8q*	CEP 8	
t(5;8)(q35.1;p11.2)	LSI 8p22	LSI 8q24 C-myc	CEP 8	LSI 5p15.2
t(5;17)(q31;p13)	TelVysion 5q	TelVysion 17p	CEP 17	
t(9;20)(p24;q13.1)	TelVysion 20q	TelVysion 20p	LSI 9q34	
t(10;13)(p13;p13)	LSI 13q14	TelVysion 10p	CEP 10	
t(10;14)(q24;p11.2)	TelVysion 10q	TEL 14q*	CEP 10	
t(11;22)(q23;q11)	TelVysion 11q	LSI 22-bcr	CEP 11	
t(6;22)(q13;q13)	TelVysion 6q	LSI 22-bcr	CEP 6	
inv				
inv(2)(p11.2q13)	TelVysion 2q	TelVysion 2p		
inv(4)(p16q21)	TelVysion 4q	TelVysion 4p		
inv(4)(p14p15.3),inv(Y)	TelVysion 4q	TelVysion 4p		
inv(6)(p23q25)	TelVysion 6q	TelVysion 6p		
inv(10)(p13q22.3)	TelVysion 10q	TelVysion 10p		

ESTUDIS D'ICE	Sondes		
Avaluació X/Y/18	CEP Y ^a	CEP X ^a	CEP 18 ^a
Avaluació 13/21	LSI 21q22 ^b	LSI 13q14 ^b	
Avaluació 21/22	LSI 21q22	LSI 22-bcr	

Totes les sondes són de Vysis Inc. excepte les assenyalades amb * que són de QBiogene Inc.
^{a,b} Sondes AneuVysion® Assay.



9- Bibliografia

A

- Acar H, Yildirim MS, Cora T, Ceylaner S (2002) Evaluation of segregation patterns of 21;21 Robertsonian translocation along with sex chromosomes and interchromosomal effects in sperm nuclei of carrier by FISH technique. *Mol Reprod Dev* 63:232-236
- Amiel A, Sardos-Albertini F, Fejgin MD, Sharony R, Diukman R, Bartoov B (2001) Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv 9) and C-heterochromatin. *J Hum Genet* 46:245-250
- Anahory T, Hamamah S, Andreo B, Hedon B, Claustres M, Sarda P, Pellestor F (2005) Sperm segregation analysis of a (13;22) Robertsonian translocation carrier by FISH: a comparison of locus-specific probe and whole chromosome painting. *Hum Reprod* 20:1850-1854
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2002) Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion inv6p23q25 carrier using FISH on decondensed sperm nuclei. *Cytogenet Genome Res* 97:149-154
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2004a) Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod* 19:1345-1351
- Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J (2004b) Preferential alternate segregation in the common t(11;22)(q23;q11) reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers. *Reprod Biomed Online* 9:637-644
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2005) Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 111:297-304
- Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J (2006) Genetic reproductive risk in inversion carriers. *Fertil Steril* 85:661-666
- Anton E, Blanco J, Vidal F (2007a) Recombination in heterozygote inversion carriers. *Hum Reprod* 22:1192
- Anton E, Vidal F, Blanco J (2007b) Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod* 22:2088-2092
- Anton E, Vidal F, Blanco J (Acceptat) Reciprocal translocations: tracing their meiotic behaviour. *Genetics in Medicine*
- Armstrong SJ, Hulten MA (1998) Meiotic segregation analysis by FISH investigations in sperm and spermatocytes of translocation heterozygotes. *Eur J Hum Genet* 6:430-431
- Asada H, Sueoka K, Hashiba T, Kuroshima M, Kobayashi N, Yoshimura Y (2000) The effects of age and abnormal sperm count on the nondisjunction of spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 17:51-59

B

- Baarends WM, van der Laan R, Grootegoed JA (2001) DNA repair mechanisms and gametogenesis. *Reproduction* 121:31-39
- Baccetti B, Capitani S, Collodel G, Estenoz M, Gambera L, Piomboni P (2002) Infertile spermatozoa in a human carrier of robertsonian translocation 14;22. *Fertil Steril* 78:1127-1130

- Baccetti B, Collodel G, Marzella R, Moretti E, Piomboni P, Scapigliati G, Serafini F (2005) Ultrastructural studies of spermatozoa from infertile males with Robertsonian translocations and 18, X, Y aneuploidies. *Hum Reprod* 20:2295-2300
- 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
- Balkan W, Martin RH (1983a) Chromosome segregation into the spermatozoa of two men heterozygous for different reciprocal translocations. *Hum Genet* 63:345-348
- Balkan W, Martin RH (1983b) Segregation of chromosomes into the spermatozoa of a man heterozygous for a 14;21 Robertsonian translocation. *Am J Med Genet* 16:169-172
- Baumgartner A, Schmid TE, Schuetz CG, Adler ID (2001) Detection of aneuploidy in rodent and human sperm by multicolor FISH after chronic exposure to diazepam. *Mutat Res* 490:11-19
- Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J (2005) Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 111:281-290
- Bhatt S, Moradkhani K, Mrasek K, Puechberty J, Lefort G, Lespinasse J, Sarda P, Liehr T, Hamamah S, Pellestor F (2007) Breakpoint characterization: a new approach for segregation analysis of paracentric inversion in human sperm. *Mol Hum Reprod* 13:751-756
- Blanco J, Egozcue J, Clusellas N, Vidal F (1998a) FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and interchromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenet Cell Genet* 83:275-280
- Blanco J, Gabau E, Gomez 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 syndrome: increased incidence in cases of paternal origin. *Am J Hum Genet* 63:1067-1072
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2000) Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 106:500-505
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2001) Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47,XXY, mosaic 46,XY/47,XXY and 47,XYY) assessed by fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 16:887-892
- Blanco J, Rubio C, Simon 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
- Bosch M, Rajmil O, Martinez-Pasarell O, Egozcue J, Templado C (2001) Linear increase of diploidy in human sperm with age: a four-colour FISH study. *Eur J Hum Genet* 9:533-538
- Bosch M, Rajmil O, Egozcue J, Templado C (2003) Linear increase of structural and numerical chromosome 9 abnormalities in human sperm regarding age. *Eur J Hum Genet* 11:754-759
- Brandriff B, Gordon L, Ashworth LK, Littman V, Watchmaker G, Carrano AV (1986) Cytogenetics of human sperm: meiotic segregation in two translocation carriers. *Am J Hum Genet* 38:197-208

- Brown GM, Leversha M, Hulten M, Ferguson-Smith MA, Affara NA, Furlong RA (1998) Genetic analysis of meiotic recombination in humans by use of sperm typing: reduced recombination within a heterozygous paracentric inversion of chromosome 9q32-q34.3. *Am J Hum Genet* 62:1484-1492
- Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, Janny L, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A (2006) Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod* 21:685-693
- Burk RD, Szabo P, O'Brien S, Nash WG, Yu L, Smith KD (1985) Organization and chromosomal specificity of autosomal homologs of human Y chromosome repeated DNA. *Chromosoma* 92:225-233
- Burns JP, Koduru PR, Alonso ML, Chaganti RS (1986) Analysis of meiotic segregation in a man heterozygous for two reciprocal translocations using the hamster in vitro penetration system. *Am J Hum Genet* 38:954-964
- Buwe A, Guttenbach M, Schmid M (2005) Effect of paternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 111:213-228

C

- Caer E, Perrin A, Douet-Guilbert N, Amice V, De Braekeleer M, Morel F (2007) Differing mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8. *Fertil Steril*
- Cifuentes P, Navarro J, Blanco J, Vidal F, Miguez L, Egozcue J, Benet J (1999a) 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
- Cifuentes P, Navarro J, Egozcue J, Benet J (1999b) Segregation analysis on sperm chromosomes of two carriers of a t(9;17) reciprocal translocation: whole chromosome painting study. *Hum Reprod* 14:239
- Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Campillo M, Garcia F, Egozcue S, Abad C, Egozcue J, Benet J (2005) Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum Reprod* 20:2133-2139
- Codina-Pascual M, Campillo M, Kraus J, Speicher MR, Egozcue J, Navarro J, Benet J (2006a) Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and effects on human male meiosis. *Mol Hum Reprod* 12:123-133
- Codina-Pascual M, Navarro J, Oliver-Bonet M, Kraus J, Speicher MR, Arango O, Egozcue J, Benet J (2006b) Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes. *Hum Reprod* 21:1490-1497
- Colls P, Blanco J, Martinez-Pasarell O, Vidal F, Egozcue J, Marquez 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
- Cora T, Acar H, Kaynak M (2002) Molecular cytogenetic detection of meiotic segregation patterns in sperm nuclei of carriers of 46,XY,t(15;17)(q21;q25). *J Androl* 23:793-798

- Chandley AC, Speed RM, McBeath S, Hargreave TB (1986) A human 9;20 reciprocal translocation associated with male infertility analyzed at prophase and metaphase I of meiosis. *Cytogenet Cell Genet* 41:145-153
- Chantot-Bastaraud S, Ravel C, Berthaut I, McElreavey K, Bouchard P, Mandelbaum J, Siffroi JP (2007) Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility. *Mol Hum Reprod* 13:55-59
- Cheng EY, Chen YJ, Disteche CM, Gartler SM (1999) Analysis of a paracentric inversion in human oocytes: nonhomologous pairing in pachytene. *Hum Genet* 105:191-196
- Chen Y, Huang J, Liu P, Qiao J (2007) Analysis of meiotic segregation patterns and interchromosomal effects in sperm from six males with Robertsonian translocations. *J Assist Reprod Genet* 24:406-411

D

- De Braekeleer M, Dao TN (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6:245-250
- De Braekeleer M, Perrin A, Morel F (eds) (2006) Chromosomal abnormalities in male infertility. Transworld Research Network, Kerala, India
- de la Chapelle A, Schroder J, Stenstrand K, Fellman J, Herva R, Saarni M, Anttolainen I, Tallila I, Tervila L, Husa L, et al. (1974) Pericentric inversions of human chromosomes 9 and 10. *Am J Hum Genet* 26:746-766
- De Mas P, Daudin M, Vincent MC, Bourrouillou G, Calvas P, Mieusset R, Bujan L (2001) Increased aneuploidy in spermatozoa from testicular tumour patients after chemotherapy with cisplatin, etoposide and bleomycin. *Hum Reprod* 16:1204-1208
- Devine DH, Whitman-Elia G, Best RG, Edwards JG (2000) Paternal paracentric inversion of chromosome 2: a possible association with recurrent pregnancy loss and infertility. *J Assist Reprod Genet* 17:293-296
- Douet-Guilbert N, Bris MJ, Amice V, Marchetti C, Delobel B, Amice J, Braekeleer MD, Morel F (2005) Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature. *Int J Androl* 28:372-379

E

- Eaker S, Pyle A, Cobb J, Handel MA (2001) Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci* 114:2953-2965
- Earle E, Voullaire LE, Hills L, Slater H, Choo KH (1992) Absence of satellite III DNA in the centromere and the proximal long-arm region of human chromosome 14: analysis of a 14p- variant. *Cytogenet Cell Genet* 61:78-80
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J (2000) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 6:93-105

- Egozcue J, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Sarrate Z, Vidal F (2003) Genetic analysis of sperm and implications of severe male infertility--a review. *Placenta* 24 Suppl B:S62-65
- Escudero T, Lee M, Carrel D, Blanco J, Munne S (2000) Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13;14)(q10;q10) carriers. *Prenat Diagn* 20:599-602
- Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M, Munne S (2003) Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertil Steril* 79:1528-1534
- Estop AM, Levinson F, Cieply K, Vankirk V (1992) The segregation of a translocation t(1;4) in two male carriers heterozygous for the translocation. *Hum Genet* 89:425-429
- Estop AM, Van Kirk V, Cieply K (1995) Segregation analysis of four translocations, t(2;18), t(3;15), t(5;7), and t(10;12), by sperm chromosome studies and a review of the literature. *Cytogenet Cell Genet* 70:80-87
- Estop AM, Cieply KM, Wakim A, Feingold E (1998) Meiotic products of two reciprocal translocations studied by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 83:193-198
- Estop AM, Cieply KM, Munne 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
- Estop AM, Cieply K, Munne S, Surti U, Wakim A, Feingold E (2000) Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? Sperm FISH studies. *Hum Genet* 106:517-524
- Evers JL (2002) Female subfertility. *Lancet* 360:151-159

F

- Faraut T, Mermet MA, Demongeot J, Cohen O (2000) Cooperation of selection and meiotic mechanisms in the production of imbalances in reciprocal translocations. *Cytogenet Cell Genet* 88:15-21
- Ferlin A, Vinanzi C, Garolla A, Selice R, Zuccarello D, Cazzadore C, Foresta C (2006) Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65:606-610
- Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C (2007) Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online* 14:734-745
- Foresta C, Moro E, Ferlin A (2001) Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 22:226-239
- Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B (2002) Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum Genet* 10:303-312
- Friedrich U, Caprani M, Niebuhr E, Therkelsen AJ, Jorgensen AL (1996) Extreme variant of the short arm of chromosome 15. *Hum Genet* 97:710-713
- Frydman N, Romana S, Le Lorc'h M, Vekemans M, Frydman R, Tachdjian G (2001) Assisting reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation. *Hum Reprod* 16:2274-2277

G

- Gabriel-Robez O, Ratomponirina C, Dutrillaux B, Carre-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
- Gardner R, Sutherland G (2004) *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. New York, Oxford University Press.
- Geneix A, Schubert B, Force A, Rodet K, Briancon G, Boucher D (2002) Sperm analysis by FISH in a case of t(17; 22) (q11; q12) balanced translocation: case report. *Hum Reprod* 17:325-331
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munne S, Balicchia B, Escudero T, Crippa A (2002) Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod* 17:3201-3207
- Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, Menchini Fabris GF, Voliani S, Ferraretti AP (2005) Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum Reprod* 20:2140-2152
- Griffin DK, Abruzzo MA, Millie EA, Sheean LA, Feingold E, Sherman SL, Hassold TJ (1995) Non-disjunction in human sperm: evidence for an effect of increasing paternal age. *Hum Mol Genet* 4:2227-2232
- 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* 46:553-558
- 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, Kohn FM, Engel W, Schmid M (2000) Meiotic nondisjunction of chromosomes 1, 17, 18, X, and Y in men more than 80 years of Age. *Biol Reprod* 63:1727-1729

H

- Habbema JD, Collins J, Leridon H, Evers JL, Lunenfeld B, te Velde ER (2004) Towards less confusing terminology in reproductive medicine: a proposal. *Hum Reprod* 19:1497-1501
- Hastings RJ, Cavani S, Bricarelli FD, Patsalis PC, Kristoffersson U (2007) *Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance: a common European framework for quality assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigations*. *Eur J Hum Genet* 15:525-527
- Hatakeyama C, Gao H, Harmer K, Ma S (2006) Meiotic segregation patterns and ICSI pregnancy outcome of a rare (13;21) Robertsonian translocation carrier: a case report. *Hum Reprod* 21:976-979
- Honda H, Miharu N, Samura O, He H, Ohama K (2000) Meiotic segregation analysis of a 14;21 Robertsonian translocation carrier by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 106:188-193

Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Honda N, Hara T, Ohama K (1999) Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers, t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triple-color fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 105:428-436

I

ISCN (2005) An International System for Human Cytogenetic nomenclature. Shaffer LG, Tommerup N (eds). S. Karger, Basel, Switzerland

J

Jaarola M, Martin RH, Ashley T (1998) Direct evidence for suppression of recombination within two pericentric inversions in humans: a new sperm-FISH technique. *Am J Hum Genet* 63:218-224

Jakubiczka S, Bettecken T, Stumm M, Nickel I, Musebeck J, Krebs P, Fischer C, Kleinstein J, Wieacker P (1999) Frequency of CFTR gene mutations in males participating in an ICSI programme. *Hum Reprod* 14:1833-1834

Jenderny J, Gebauer J, Rohrborn G, Ruger A (1992) Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 20. *Hum Genet* 89:117-119

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

K

Kaiser P (1984) Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics. *Hum Genet* 68:1-47

Kekesi A, Erdei E, Torok M, Dravucz S, Toth A (2007) Segregation of chromosomes in spermatozoa of four Hungarian translocation carriers. *Fertil Steril* 88:212 e215-211

Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, Meisner L, Chandley A, Gouchy G, Jorgensen L, et al. (1999) Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev* 53:27-41

Kinakin B, Rademaker A, Martin R (1997) Paternal age effect of YY aneuploidy in human sperm, as assessed by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 78:116-119

Kupker W, Schwinger E, Hiort O, Ludwig M, Nikolettos N, Schlegel PN, Diedrich K (1999) Genetics of male subfertility: consequences for the clinical work-up. *Hum Reprod* 14 Suppl 1:24-37

L

Lacadena J (1996) *Citogenética*. Editorial Complutense S.A., Madrid, Spain.

- Lahdetie J, Ajospenpaa-Saari M, Mykkanen J (1996) Detection of aneuploidy in human spermatozoa of normal semen donors by fluorescence in situ hybridization. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 3:629-632
- Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E (2004) Klinefelter's syndrome. *Lancet* 364:273-283
- Laurie DA, Hulten MA (1985) Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann Hum Genet* 49 (Pt 3):189-201
- Layman LC (2002) Human gene mutations causing infertility. *J Med Genet* 39:153-161
- Lejeune J (1963) Autosomal Disorders. *Pediatrics* 32:326-337
- Lim AS, Lim TH, Kee SK, Chieng R, Tay SK (2003) Sperm segregation patterns by fluorescence in situ hybridization studies of a 46,XY,t(2;6) heterozygote giving rise to a rare triploid product of conception with a 69,XXY,t(2;6)(p12;q24)der(6)t(2;6)(p12;q24)pat karyotype. *Am J Med Genet A* 117:172-176
- Lowe X, Eskenazi B, Nelson DO, Kidd S, Alme A, Wyrobek AJ (2001) Frequency of XY sperm increases with age in fathers of boys with Klinefelter syndrome. *Am J Hum Genet* 69:1046-1054
- Luetjens CM, Rolf C, Gassner P, Werny JE, Nieschlag E (2002) Sperm aneuploidy rates in younger and older men. *Hum Reprod* 17:1826-1832

M

- Machev N, Gosset P, Viville S (2005a) Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 111:352-357
- Machev N, Gosset P, Warter S, Treger M, Schillinger M, Viville S (2005b) Fluorescence in situ hybridization sperm analysis of six translocation carriers provides evidence of an interchromosomal effect. *Fertil Steril* 84:365-373
- Malan V, Pipiras E, Sifer C, Kanafani S, Cedrin-Durnerin I, Martin-Pont B, Hugues JN, Wolf JP, Benzacken B (2006) Chromosome segregation in an infertile man carrying a unique pericentric inversion, inv(21)(p12q22.3), analysed using fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei: significance for clinical genetics. A case report. *Hum Reprod* 21:2052-2056
- Martin RH (1984) Analysis of human sperm chromosome complements from a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Clin Genet* 25:357-361
- Martin RH (1986) Sperm chromosome analysis in a man heterozygous for a paracentric inversion of chromosome 7 (q11q22). *Hum Genet* 73:97-100
- Martin RH (1988a) Cytogenetic analysis of sperm from a male heterozygous for a 13;14 Robertsonian translocation. *Hum Genet* 80:357-361
- Martin RH (1988b) Meiotic segregation of human sperm chromosomes in translocation heterozygotes: report of a t(9;10)(q34;q11) and a review of the literature. *Cytogenet Cell Genet* 47:48-51
- Martin RH, Barclay L, Hildebrand K, Ko E, Fowlow SB (1990a) Cytogenetic analysis of 400 sperm from three translocation heterozygotes. *Hum Genet* 86:33-39
- Martin RH, McGillivray B, Barclay L, Hildebrand K, Ko E (1990b) Sperm chromosome analysis in a man heterozygous for a reciprocal translocation 46,XY t(12;20)(q24.3;q11). *Hum Reprod* 5:606-609

- 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 (1992) Sperm chromosome analysis of two men heterozygous for reciprocal translocations: t(1;9)(q22;q31) and t(16;19)(q11.1;q13.3). *Cytogenet Cell Genet* 60:18-21
- Martin RH, Ko E, Hildebrand K (1992) Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a robertsonian translocation 45,XY,t(15q;22q). *Am J Med Genet* 43:855-857
- 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, Hulten M (1993) Chromosome complements in 695 sperm from three men heterozygous for reciprocal translocations, and a review of the literature. *Hereditas* 118:165-175
- Martin RH (1994) Sperm chromosome complements in a man heterozygous for a reciprocal translocation t(2;3)(q24;p26). *Hum Reprod* 9:1512-1515
- 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
- Martin RH, Spriggs EL (1995) Sperm chromosome complements in a man heterozygous for a reciprocal translocation 46,XY,t(9;13)(q21.1;q21.2) and a review of the literature. *Clin Genet* 47:42-46
- Martin RH, Spriggs E, Ko E, Rademaker AW (1995) The relationship between paternal age, sex ratios, and aneuploidy frequencies in human sperm, as assessed by multicolor FISH. *Am J Hum Genet* 57:1395-1399
- Martin RH (1999) Sperm chromosome analysis in a man heterozygous for a paracentric inversion of chromosome 14 (q24.1q32.1). *Am J Hum Genet* 64:1480-1484
- Martini E, von Bergh AR, Coonen E, de Die-Smulders CE, Hopman AH, Ramaekers FC, Geraedts JP (1998) 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
- Matzuk MM, Lamb DJ (2002) Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol* 4 Suppl:s41-49
- Mau-Holzmann UA (2005) Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res* 111:317-336
- McInnes B, Rademaker A, Martin R (1998) Donor age and the frequency of disomy for chromosomes 1, 13, 21 and structural abnormalities in human spermatozoa using multicolour fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 13:2489-2494
- Mennicke K, Diercks P, Schlieker H, Bals-Pratsch M, al Hasani S, Diedrich K, Schwinger E (1997) Molecular cytogenetic diagnostics in sperm. *Int J Androl* 20 Suppl 3:11-19
- Mercier S, Morel F, Fellman F, Roux C, Bresson JL (1998) Molecular analysis of the chromosomal equipment in spermatozoa of a 46, XY, t(7;8) (q11.21;cen) carrier by using fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 102:446-451
- Metzler-Guillemain C, Mignon C, Depetris D, Guichaoua MR, Mattei MG (1999) Bivalent 15 regularly associates with the sex vesicle in normal male meiosis. *Chromosome Res* 7:369-378
- Midro AT, Wiland E, Panasiuk B, Lesniewicz R, Kurpisz M (2006) Risk evaluation of carriers with chromosome reciprocal translocation t(7;13)(q34;q13) and

- concomitant meiotic segregation analyzed by FISH on ejaculated spermatozoa. *Am J Med Genet A* 140:245-256
- Miharu N (2005) Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 111:347-351
- Mikhaail-Philips MM, Ko E, Chernos J, Greene C, Rademaker A, Martin RH (2004) Analysis of chromosome segregation in sperm from a chromosome 2 inversion heterozygote and assessment of an interchromosomal effect. *Am J Med Genet A* 127:139-143
- Mikhaail-Philips MM, McGillivray BC, Hamilton SJ, Ko E, Chernos J, Rademaker A, Martin RH (2005) Unusual segregation products in sperm from a pericentric inversion 17 heterozygote. *Hum Genet* 117:357-365
- Monteil M, Rousseaux S, Chevret E, Pelletier R, Cozzi J, Sele B (1997) Increased aneuploid frequency in spermatozoa from a Hodgkin's disease patient after chemotherapy and radiotherapy. *Cytogenet Cell Genet* 76:134-138
- Moradkhani K, Puechberty J, Bhatt S, Lespinasse J, Vago P, Lefort G, Sarda P, Hamamah S, Pellestor F (2006a) Rare Robertsonian translocations and meiotic behaviour: sperm FISH analysis of t(13;15) and t(14;15) translocations: a case report. *Hum Reprod* 21:3193-3198
- Moradkhani K, Puechberty J, Bhatt S, Vago P, Janny L, Lefort G, Hamamah S, Sarda P, Pellestor F (2006b) Meiotic segregation of rare Robertsonian translocations: sperm analysis of three t(14q;22q) cases. *Hum Reprod* 21:1166-1171
- Morel F, Fellmann F, Roux C, Bresson JL (2001a) Meiotic segregation analysis by FISH investigation of spermatozoa of a 46,Y,der(X),t(X;Y)(qter-->p22::q11-->qter) carrier. *Cytogenet Cell Genet* 92:63-68
- Morel F, Roux C, Bresson JL (2001b) FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype. *Mol Hum Reprod* 7:483-488
- Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Marchetti C, Lefebvre V, Delobel B, Amice V, Amice J, De Braekeleer M (2004a) Lack of intraindividual variation of unbalanced spermatozoa frequencies from a 46,XY,t(9;22)(q21;q11.2) carrier: case report. *Hum Reprod* 19:2227-2230
- Morel F, Douet-Guilbert N, Roux C, Tripogney C, Le Bris MJ, De Braekeleer M, Bresson JL (2004b) Meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21;cen) translocation in two carrier brothers. *Fertil Steril* 81:682-685
- Morel F, Laudier B, Guerif F, Couet ML, Royere D, Roux C, Bresson JL, Amice V, De Braekeleer M, Douet-Guilbert N (2007) Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 22:136-141
- Mroz K, Carrel L, Hunt PA (1999) Germ cell development in the XXY mouse: evidence that X chromosome reactivation is independent of sexual differentiation. *Dev Biol* 207:229-238
- Munné S, Escudero T, Sandalinas M, Sable D, Cohen J (2000) Gamete segregation in female carriers of Robertsonian translocations. *Cytogenet Cell Genet* 90:303-308
- Munné S, Escudero T, Fischer J, Chen S, Hill J, Stelling JR, Estop A (2005) Negligible interchromosomal effect in embryos of Robertsonian translocation carriers. *Reprod Biomed Online* 10:363-369

N

- 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
- Nielsen J, Wohler M (1991) Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet* 87:81-83
- Nishikawa N, Sato T, Suzumori N, Sonta S, Suzumori K (2008) Meiotic segregation analysis in male translocation carriers by using fluorescent in situ hybridization. *Int J Androl* 31:60-66

O

- Ogawa S, Araki S, Araki Y, Ohno M, Sato I (2000) Chromosome analysis of human spermatozoa from an oligoasthenozoospermic carrier for a 13;14 Robertsonian translocation by their injection into mouse oocytes. *Hum Reprod* 15:1136-1139
- Ogur G, Van Assche E, Vegetti W, Verheyen G, Tournaye H, Bonduelle M, Van Steirteghem A, Liebaers I (2006) Chromosomal segregation in spermatozoa of 14 Robertsonian translocation carriers. *Mol Hum Reprod* 12:209-215
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Carrera M, Egozcue J, Benet J (2001) Meiotic segregation analysis in a t(4;8) carrier: comparison of FISH methods on sperm chromosome metaphases and interphase sperm nuclei. *Eur J Hum Genet* 9:395-403
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Carrera M, Egozcue J, Benet J (2002) Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Mol Hum Reprod* 8:958-963
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Abad C, Guitart M, Egozcue J, Benet J (2004) From spermatocytes to sperm: meiotic behaviour of human male reciprocal translocations. *Hum Reprod* 19:2515-2522
- Oliver-Bonet M, Benet J, Sun F, Navarro J, Abad C, Liehr T, Starke H, Greene C, Ko E, Martin RH (2005) Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Hum Reprod* 20:683-688

P

- Padungtod C, Hassold TJ, Millie E, Ryan LM, Savitz DA, Christiani DC, Xu X (1999) Sperm aneuploidy among Chinese pesticide factory workers: scoring by the FISH method. *Am J Ind Med* 36:230-238
- Pellestor F, Sele 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, Sele 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 (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
- Pieters MH, Geraedts JP, Meyer H, Dumoulin JC, Evers JL, Jongbloed RJ, Nederlof PM, van der Flier S (1990) Human gametes and zygotes studied by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 53:15-19
- Pellestor F, Girardet A, Coignet L, Andreo B, Lefort G, Charlieu JP (1997) Cytogenetic analysis of meiotic segregation in sperm from two males heterozygous for reciprocal translocations using PRINS and hamster techniques. *Cytogenet Cell Genet* 78:202-208
- Pellestor F, Imbert I, Andreo B, Lefort G (2001) Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization and primed in-situ labelling techniques. *Hum Reprod* 16:1155-1164

R

- Recio R, Robbins WA, Borja-Aburto V, Moran-Martinez J, Froines JR, Hernandez RM, Cebrian ME (2001) Organophosphorous pesticide exposure increases the frequency of sperm sex null aneuploidy. *Environ Health Perspect* 109:1237-1240
- Rickards GK (1983) Orientation behavior of chromosome multiples of interchange (reciprocal translocation) heterozygotes. *Annu Rev Genet* 17:443-498
- Rives N, Jarnot M, Mousset-Simeon N, Joly G, Mace B (2003a) Fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis of chromosome segregation and interchromosomal effect in spermatozoa of a reciprocal translocation t(9,10)(q11;p11.1) carrier. *J Hum Genet* 48:535-540
- Rives N, Simeon N, Milazzo JP, Barthelemy C, Mace B (2003b) Meiotic segregation of sex chromosomes in mosaic and non-mosaic XYY males: case reports and review of the literature. *Int J Androl* 26:242-249
- Rives NM (2005) Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: asthenozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 111:358-362
- Robbins WA, Baulch JE, Moore D, 2nd, Weier HU, Blakey D, Wyrobek AJ (1995) Three-probe fluorescence in situ hybridization to assess chromosome X, Y, and 8 aneuploidy in sperm of 14 men from two healthy groups: evidence for a paternal age effect on sperm aneuploidy. *Reprod Fertil Dev* 7:799-809
- Robbins WA, Meistrich ML, Moore D, Hagemester FB, Weier HU, Cassel MJ, Wilson G, Eskenazi B, Wyrobek AJ (1997a) Chemotherapy induces transient sex chromosomal and autosomal aneuploidy in human sperm. *Nat Genet* 16:74-78
- Robbins WA, Vine MF, Truong KY, Everson RB (1997b) Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to assess effects of smoking, caffeine, and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. *Environ Mol Mutagen* 30:175-183
- Robbins WA, Elashoff DA, Xun L, Jia J, Li N, Wu G, Wei F (2005) Effect of lifestyle exposures on sperm aneuploidy. *Cytogenet Genome Res* 111:371-377
- Roeder GS, Bailis JM (2000) The pachytene checkpoint. *Trends Genet* 16:395-403

- Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Delafontaine D, Sele B (1995a) 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, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Devillard F, Lespinasse J, Sele B (1995b) Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocations: analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 71:240-246
- Rousseaux S, Hazzouri M, Pelletier R, Monteil M, Usson Y, Sele 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
- Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann F, Clavequin MC, Bresson JL (2005) Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenet Genome Res* 111:291-296
- Rubes J, Lowe X, Moore D, 2nd, Perreault S, Slott V, Evenson D, Selevan SG, Wyrobek AJ (1998) Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. *Fertil Steril* 70:715-723
- Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi R (1978) Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 274:911-913

S

- Saadallah N, Hulten M (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 (Pt 4):369-383
- Schulz S, Jakubiczka S, Kropf S, Nickel I, Muschke P, Kleinstein J (2006) Increased frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males. *Fertil Steril* 85:135-138
- Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK (2003) The genetic basis of infertility. *Reproduction* 126:13-25
- Shi Q, Martin RH (2000) Spontaneous frequencies of aneuploid and diploid sperm in 10 normal Chinese men: assessed by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 90:79-83
- Shi Q, Martin RH (2001) Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction* 121:655-666
- Shi Q, Ko E, Barclay L, Hoang T, Rademaker A, Martin R (2001) Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. *Mol Reprod Dev* 59:417-421
- Skakkebaek NE, Giwercman A, de Kretser D (1994) Pathogenesis and management of male infertility. *Lancet* 343:1473-1479
- Sloter E, Nath J, Eskenazi B, Wyrobek AJ (2004) Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents. *Fertil Steril* 81:925-943
- Soares SR, Templado C, Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2001) Numerical chromosome abnormalities in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 of paternal origin: generalised tendency to meiotic non-disjunction. *Hum Genet* 108:134-139

- Solari AJ, Ponzio R, Rey Valzacchi G (1991) Synaptonemal complex karyotyping in an oligospermic patient with heterochromatin duplication in chromosome n. 9. *Medicina (B Aires)* 51:217-221
- Solari AJ, Rey Valzacchi G (1997) The prevalence of a YY synaptonemal complex over XY synapsis in an XYY man with exclusive XYY spermatocytes. *Chromosome Res* 5:467-474
- Spriggs EL, Martin RH, Hulten M (1992) Sperm chromosome complements from two human reciprocal translocation heterozygotes. *Hum Genet* 88:447-452
- Stahl A, Wachtler F, Hartung M, Devictor M, Schofer C, Mosgoller W, de Lanversin A, Fouet C, Schwarzacher HG (1991) Nucleoli, nucleolar chromosomes and ribosomal genes in the human spermatocyte. *Chromosoma* 101:231-244
- Sun F, Trpkov K, Rademaker A, Ko E, Martin RH (2005) Variation in meiotic recombination frequencies among human males. *Hum Genet* 116:172-178
- Schwarzacher HG, Mosgoeller W (2000) Ribosome biogenesis in man: current views on nucleolar structures and function. *Cytogenet Cell Genet* 91:243-252
- Sybenga J (1975) General cytogenetics. Sybenga J (ed). North-Holland Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands.
- Syme RM, Martin RH (1992) Meiotic segregation of a 21;22 Robertsonian translocation. *Hum Reprod* 7:825-829

T

- Templado C, Navarro J, Benet J, Genesca A, Perez 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
- Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, Moutou C, Robinson MD, Schmutzler AG, Scriven PN, et al. (2005) ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum Reprod* 20:35-48
- Tres LL (2005) XY chromosomal bivalent: nucleolar attraction. *Mol Reprod Dev* 72:1-6

V

- 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
- Vialard F, Delanete A, Clement P, Simon-Bouy B, Aubriot FX, Selva J (2007) Sperm chromosome analysis in two cases of paracentric inversion. *Fertil Steril* 87:418 e411-415

- Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Kohn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, et al. (1996) Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5:933-943
- Vozdova M, Oracova E, Horinova V, Rubes J (2008) Sperm fluorescence in situ hybridization study of meiotic segregation and an interchromosomal effect in carriers of t(11;18). *Hum Reprod* 23:581-588

W

- Wiland E, Midro AT, Panasiuk B, Kurpisz M (2007) The analysis of meiotic segregation patterns and aneuploidy in the spermatozoa of father and son with translocation t(4;5)(p15.1;p12) and the prediction of the individual probability rate for unbalanced progeny at birth. *J Androl* 28:262-272
- Wiland E, Hobel CJ, Hill D, Kurpisz M (2008) Successful pregnancy after preimplantation genetic diagnosis for carrier of t(2;7)(p11.2;q22) with high rates of unbalanced sperm and embryos: a case report. *Prenat Diagn* 28:36-41
- World Health Organization (1999) WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, Glaser RL, Pearson FS, Evenson D (2006) Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9601-9606

Y

- Yakut T, Acar H, Egeli U, Kimya Y (2003) Frequency of recombinant and nonrecombinant products of pericentric inversion of chromosome 1 in sperm nuclei of carrier: by FISH technique. *Mol Reprod Dev* 66:67-71
- Yakut T, Ercelen N, Acar H, Kimya Y, Egeli U (2006) Meiotic segregation analysis of reciprocal translocations both in sperms and blastomeres. *Am J Med Genet A* 140:1074-1082
- Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ (1976) The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 15:471-476
- Yang SP, Bidichandani SI, Figuera LE, Juyal RC, Saxon PJ, Baldini A, Patel PI (1997) Molecular analysis of deletion (17)(p11.2p11.2) in a family segregating a 17p paracentric inversion: implications for carriers of paracentric inversions. *Am J Hum Genet* 60:1184-1193

AGRAÏMENTS

Bé, després de tota aquesta feïnada, ara em toca escriure la part que possiblement es llegirà més gent. No és que m'estranyi la veritat, però que voleu que us digui, fa una miqueta de ràbia... enteneu-me, han estat uns quants anys, molts mals de cap, de cervicals, per no parlar dels ulls... Però entenc que ara mateix us sembli que no és un bon moment i preferiu deixar-ho per... en fi.

El cert és que aquesta ha estat una magnífica experiència i en gran part ha sigut gràcies a tota la gent amb qui he compartit aquest camí. Per això voldria intentar fer-vos arribar el meu sincer agraïment amb aquestes línies.

Com que a aquestes alçades una mica més de rotllo ja no ve d'aquí, us posaré una mica en antecedents: Aquesta història va començar quan un dia, per allò que se'n diu "casualitats de la vida", vaig anar a petar al despatx de la millor *jefa* que podia trobar (sense exagerar!). La seva energia i tota la seva experiència són una ajuda inestimable per tirar endavant un projecte, però a més a més, amb la seva manera de fer, aconsegueix que un equip de treball sigui molt més que això.

Però per si això no fos prou, amb el pack també venia un altre *chollo* de *jefe* que a part de ser estupend era de Reus. Ell ha estat el punt d'oposició necessari a totes les discussions, una referència alternativa i imprescindible per tota la feina feta.

I no puc deixar de mencionar els anys de recerca compartits amb el *Big Boss*, algú a qui sempre li podies demanar ajuda perquè tenia totes les respostes a la màniga. És un plaer treballar amb gent que de la feina en fa una afició.

Però a banda de tot aquest munt d'alts comandaments, un equip no seria el que és sense la resta de membres de la tripulació. Per això vull agrair a la resta de grumets d'aquest *dream-team* (al qual podríem anomenar per exemple C.C.), tots els moments que hem compartit tant en les situacions de calma com en les d'estrès total (Viatge a Viena et al. 2002).

També vull donar les gràcies a tots els companys de la unitat (tant els que hi són com els que hi van ser), des dels que m'han aguantat al laboratori cada cop que els hi he apagat tots els llums (ara ja us ho puc confessar: les FISH surten igual amb el llum obert), als que han compartit les hores fosques dels microscopis (i a tot el repertori de músics que ens han acompanyat), als amants i detractors del

Quiñonero amb qui he pogut compartir les penes i glòries dels dinars, i tots aquells als que he pogut recórrer perquè em donessin pistes per avançar pels camins pedregosos de la ciència (e.g. té algun sentit estadístic tot plegat?), de la docència (e.g. com ionitzar els alumnes), o de la informàtica (e.g. què carai li passa al ordinador?!).

També vull agrair a la gent del *Department of Genetics* de l'*Alberta Children's Hospital* (Canadà) i del *Department of Human Genetics* de l'*Emory University School of Medicine* (EUA) que m'acollissin tan bé com ho van fer, i em deixessin treballar amb ells, aprenent molt més del que es pot ensenyar en un laboratori.

Però fora dels laboratoris també hi ha hagut vida, (últimament poca, però vaja) i per això també vull agrair el suport de tots els Amics que m'han aguantat/animat/ajudat durant aquesta etapa, ja sigui en directe (majoritàriament els *Calçotets amb samfaina*), o bé telemàticament des de Reus, la Febró, o Washington.

I finalment, com no podia ser d'una altra manera, vull donar les gràcies al Txema per estar on calia en tots els moments fàcils i difícils. I també a tota la meua família (la de sempre i la més nova) per tot el que han fet per mi, especialment als meus pares, que sempre han vist constel·lacions en tot el que jo feia. Segurament sonarà tòpic, però sense ells, res de tot això hagués estat possible.

Gràcies per tot!

