

Freqüència i origen d'anomalies meiòtiques  
en individus fèrtils:

Mecanismes de no disjunció

TESI DOCTORAL

**Laia Uroz Brosa**

Juny 2009

**UAB**

Universitat Autònoma  
de Barcelona

# **Freqüència i origen d'anomalies meiòtiques en individus fèrtils: Mecanismes de no disjunció**

Memòria presentada per

**Laia Uroz Brosa**

Per optar al títol de

**Doctor en Biologia Cel·lular**

Tesi dirigida per

**Dra. Cristina Templado Meseguer**

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

**Directora**

**Doctoranda**

**Cristina Templado**

**Laia Uroz**

Bellaterra, juny de 2009

Aquest treball s'ha realitzat amb el següent finançament:

- Ministerio de Educación y Ciencia, projecte BFI2002-01193
- Generalitat de Catalunya, 2005SGR-00495
- Generalitat de Catalunya, beca 2005FI-00399
- Generalitat de Catalunya, beca 2007BE-100087

***Al Joan***

***Als meus pares***

# Sumari

<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	1
1.1. Anomalies cromosòmiques a l'espècie humana	3
1.2. Meiosi masculina	7
Aparellament i sinapsi meiótica	10
Recombinació meiótica i formació de quiasmes	11
Segregació cromosòmica durant la meiosi	12
Control de la meiosi masculina	14
1.3. Mecanismes de no disjunció meiótics	15
1.4. Estudis de la meiosi masculina	17
1.5. Estudis cromosòmics a l'espermatozoide humà	19
1.6. Objectius	21
<b>2. MATERIAL I MÈTODES</b>	23
2.1. Material biològic	25
2.2. Extensions de metafases d'espermatòcit	26
2.3. Tinció amb DAPI	27
2.4. Tècnica de FISH múltiplex (M-FISH)	27
2.5. Tècnica de cenM-FISH	30
2.6. Captura i anàlisi d'imatges	31
2.7. Anàlisi citogenètica de metafases d'espermatòcit	31
2.8. Extensions d'espermatozoides	32
2.9. Tècnica de FISH amb sondes	33
2.10. Anàlisi estadística de les dades	35

<b>3. RESULTATS</b>	37
3.1. Estudis meiòtics en individus fèrtils	39
Anomalies meiòtiques amb tinció de DAPI	39
Anomalies meiòtiques analitzades amb cenM-FISH	44
Anomalies meiòtiques analitzades amb M-FISH	45
3.2. Estudi meiòtic en un individu infèril	52
Anomalies meiòtiques analitzades amb M-FISH	52
Freqüència de quiasmes per cromosoma	55
Anomalies numèriques en caps d'espermatozoide	56
<b>4. DISCUSSIÓ</b>	57
4.1. Valoració de les tècniques d'anàlisi meiòtica	59
4.2. Heterogeneïtat en individus fèrtils	61
4.3. Freqüència basal d'anomalies meiòtiques en individus fèrtils	62
Anomalies sinàptiques	63
Anomalies numèriques	64
Anomalies estructurals	65
Anomalies meiòtiques i edat paterna	66
4.4. Mecanismes de no disjunció meiòtica	66
No disjunció a meiosi I	66
No disjunció a meiosi II	68
4.5. Estan incrementant les anomalies meiòtiques a la població masculina?	69
<b>5. CONCLUSIONS</b>	71
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	75

#### ARTICLES

1. Frequencies and origin of meiotic chromosome abnormalities in fertile men
2. Centromere-specific multicolour fluorescence *in situ* hybridization on human spermatocyte I and II metaphases
3. Premature separation of sister chromatids in human male meiosis

#### AGRAÏMENTS

# ***Llista d'abreviacions***

I	univalent
II	bivalent
III	trivalent
cenM-FISH	hibridació <i>in situ</i> fluorescent múltiplex centromèrica
CEP	sonda centromèrica
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	àcid desoxiribonucleic
DSB	trencament de doble cadena
espermatòcit I	espermatòcit primari
espermatòcit II	espermatòcit secundari
FISH	hibridació <i>in situ</i> fluorescent
LSI	sonda <i>locus</i> específica
MI	metafase d'espermatòcit primari
MII	metafase d'espermatòcit secundari
meiosi I	primera divisió meiòtica
meiosi II	segona divisió meiòtica
M-FISH	hibridació <i>in situ</i> fluorescent múltiplex
PSSC	separació prematura de cromàtides germanes
Q	quiasma
R	punt de recombinació
t	translocació





# ***1. Introducció***



## 1.1. Anomalies cromosòmiques a l'espècie humana

Les anomalies cromosòmiques són la causa principal de retard mental, retard del desenvolupament, infertilitat i esterilitat a l'espècie humana, afectant al voltant d'un 50% dels avortaments espontanis, un 6% de les morts perinatals i un 1% dels nounats (revisat per Jacobs i Hassold, 1995). No obstant, aquestes freqüències subestimen la freqüència real d'anomalies cromosòmiques al moment de la concepció, ja que moltes són letals als primers estadis del desenvolupament embrionari, donant lloc a fallades d'implantació i avortaments no detectables clínicament. La taxa de supervivència en cadascun dels estadis del desenvolupament embrionari és diferent segons el tipus d'anomalia cromosòmica (Taula 1), sent compatibles amb la vida únicament les trisomies pels cromosomes 13, 18, 21 i sexuals, la monosomia X, i gran part de les trisomies i monosomies parcials que afecten a fragments petits.

**Taula 1.** Freqüència d'anomalies cromosòmiques a l'espècie humana<sup>a</sup>

<b>Gestacions</b> (setmanes)	0 — 6-8 — 20 — 40			
	<b>Gestacions clínicas<sup>b</sup></b>	<b>Avortaments espontanis</b>	<b>Morts perinatals</b>	<b>Nounats</b>
Trisomies	4,3	26,8	3,9	0,30
Monosomia X	1,3	8,6	0,3	<0,01
Poliploïdies	1,5	9,8	0,6	<0,01
A. Estructurals	0,8	2,0	0,4	0,60
Altres	0,2	0,7	0,6	0,02
<b>TOTAL</b>	<b>8,1</b>	<b>47,9</b>	<b>5,7</b>	<b>0,93</b>

<sup>a</sup>Revisat per Jacobs i Hassold (1995)

<sup>b</sup>Freqüències estimades assumint un 15% d'avortaments espontanis i un 1% de morts perinatals, sense tenir en compte la taxa de fallades d'implantació

La gran majoria de les anomalies cromosòmiques són d'origen meiòtic, només analitzables directament en cèl·lules germinals (86%) (Hassold i col, 2007). Segons

els estudis de polimorfismes de DNA en avortaments o nounats amb anomalies cromosòmiques, el 90% de les anomalies numèriques s'originen per errors materns durant la meiosi (Hassold i col, 1996), mentre que el 70-80% de les anomalies estructurals són d'origen patern (Olson i Magenis, 1988; Thomas i col, 2006) (Taula 2).

**Taula 2.** Origen parental d'anomalies cromosòmiques a l'espècie humana<sup>a</sup>

	n	% Origen meiòtic		%Origen
		matern	patern	post-zigòtic
<b>Trisomia</b>				
2	18	66,6	27,8	5,6
7	14	42,9	0,0	57,1
8	12	50,0	0,0	50,0
13	74	90,5	8,1	1,4
14	26	63,6	19,2	7,7
15	34	85,3	14,7	0,0
16	104	100,0	0,0	0,0
18	150	92,0	0,0	8,0
21	782	93,3	4,0	2,7
22	130	96,4	1,8	1,8
XXX	46	80,4	0,0	19,6
XXY	224	40,6	50,9	8,5
XYY	19	0,0	84,2	15,8
<b>Monosomia X</b>	93	25,8	74,2	
<b>Triploidia</b>	61	29,5	68,9	1,6
<b>A. Estructurals</b>				
t Robertsonianes	15	93,3	6,7	
t desequilibrades	21	38,0	62,0	
Duplicacions	12	42,0	58,0	
Delecions intersticials/anells	44	16,0	84,0	
Delecions terminals	39	31,0	69,0	

<sup>a</sup>Adaptat de Hall i col (2006, 2007), Zaragoza i col (2000), Page i Shaffer (1997) i Thomas i col (2006)

## Aneuploïdia

L'aneuploïdia consisteix en un nombre de cromosomes que no és múltiple exacte del nombre haploide normal i s'origina generalment com a resultat d'una mala segregació cromosòmica, principalment per mecanismes de no disjunció (veure apartat 1.3). En l'espècie humana, les aneuploïdies més freqüents en cèl·lules somàtiques són la trisomia ( $2n+1$ ) i la monosomia ( $2n-1$ ), mentre que en els gàmetes són la disomia ( $n+1$ ) i la nul·lisomia ( $n-1$ ).

Les trisomies autosòmiques són majoritàriament d'origen matern, sent causades per errors de la meiosi paterna en un 0-30% dels casos. Els autosomes més implicats en trisomies d'origen patern són el cromosoma 2 (Zaragoza i col, 1998) i els cromosomes acrocèntrics (revisat per Hassold i col, 2007), especialment els parells 14 (Hall i col, 2007) i 15 (Zaragoza i col, 1998). Les trisomies de cromosomes sexuals són molt més variables, tenint origen patern en el 10% de les dones 47,XXX, al voltant del 50% dels homes 47,XXY i un 100% dels homes 47,XYY (Hall i col, 2006).

L'origen de les monosomies autosòmiques és difícil de determinar, ja que són letals en estadis molt primerencs del desenvolupament embrionari. La monosomia X és d'origen patern en un 74-75% de les pacients Turner (Jacobs i col, 1997; Martínez-Pasarell, 1999).

## Triploïdia

La triploïdia, dotació cromosòmica tres vegades la haploide ( $3n$ ), s'ha estimat que afecta al voltant d'un 1,5% de les gestacions clíniques a l'espècie humana (veure Taula 1). En la majoria dels casos la triploïdia és letal, donant lloc principalment a avortaments espontanis, tot i que en comptades ocasions s'ha descrit el naixement de nadons triploides, sempre amb temps de supervivència molt curts (revisat per Kang i Rosenwaks, 2008).

La triploïdia s'origina majoritàriament per la fecundació d'un oòcit per dos espermatozoides (dispèrmia) (60%). També es poden formar zigots triploides per la fecundació d'un gàmeta normal i un gàmeta diploide per errors en la meiosi femenina (26,2%) o masculina (8,2%), o per la fusió de dos oòcits (3,3%). En menor grau, la triploïdia també pot originar-se per errors en la mitosi post-zigòtica (1,6%) (Zaragoza i col, 2000).

## Anomalies estructurals

Les anomalies estructurals més freqüents en la població general són les reorganitzacions equilibrades: translocacions recíproques (1/625) i translocacions Robertsonianes (1/1000). Entre les desequilibrades les més freqüents són els cromosomes marcadors (1/2000), seguit de delecions intersticials (1/4000), duplicacions intersticials (1/4000) i delecions terminals (1/5000) (revisat per Shaffer i Lupski, 2000).

Al voltant del 90% de les translocacions Robertsonianes són d'origen matern (Page i Shaffer, 1997), mentre que estudis preliminars han determinat que la t(11;22) *de novo* és d'origen patern en el 100% dels casos estudiats (Kurahashi i col, 2009). Un 70-85% de les reorganitzacions desequilibrades s'originen durant la gametogènesi paterna (Olson i Magenis, 1988; Thomas i col, 2006), sent les més freqüents les delecions intersticials (84%) (Thomas i col, 2006) (veure Taula 2).

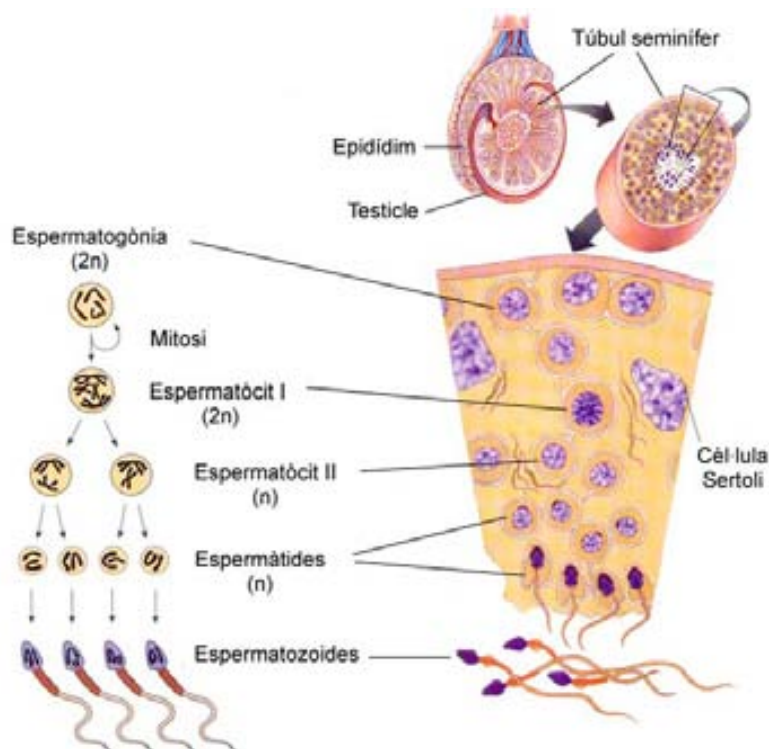
Perquè tingui lloc la formació d'anomalies estructurals és necessària la ocurrència de trencaments de doble cadena (*double strand breaks*, DSB), seguits d'errors o absència de reparació del DNA. En el cas d'absència de reparació, el fragment acèntric generat es perd en les següents divisions cel·lulars. La majoria de reorganitzacions cromosòmiques *de novo* originades per errors de reparació del DNA tenen lloc durant la meiosi, per l'entrecruament de cromàtides mal alineades (revisat per Gu i col, 2008).

L'elevada contribució paterna a l'origen de les anomalies estructurals *de novo* s'explica per l'alt nombre de divisions de les espermatogònies al llarg de la vida reproductiva i a l'absència de mecanismes de reparació en estadis tardans de l'espermatogènesi. L'alta compactació de la cromatina des de l'estadi d'espermàtide fins al d'espermatozoide madur dificulta o anul·la l'accessibilitat del DNA als enzims de reparació. Les possibles lesions cromosòmiques originades durant l'espermiogènesi no es reparen fins després de la fecundació, en el zigot, aprofitant la maquinària de reparació proporcionada per l'oòcit (Sega, 1979; Balhorn, 1982; revisat per Marchetti i Wyrobek, 2005).

## 1.2. Meiosi masculina

La meiosi és un tipus de divisió cel·lular especialitzada en la producció de gàmetes que té lloc únicament en les cèl·lules germinals. Durant la meiosi, dues divisions consecutives del nucli sense síntesi de DNA entre elles, donen lloc a cèl·lules amb la meitat de cromosomes que la cèl·lula mare. A més, aquestes cèl·lules són genèticament diferents, gràcies a l'intercanvi de material cromosòmic (recombinació) d'origen patern i matern. La meiosi és un procés indispensable per mantenir constant el nombre de cromosomes i per assegurar la variabilitat genètica a la població.

La meiosi forma part d'un procés més ampli, l'espermatogènesi, pel qual una cèl·lula germinal diploide (espermatogònia) es transforma en cèl·lules haploides altament especialitzades (espermatozoides) (Figura 1). Aquest procés de producció d'espermatozoides es posa en marxa a la pubertat, sota control hormonal, i té lloc al testicle, a l'epiteli dels túbuls seminífers.



**Figura 1.** Localització de l'espermatogènesi, estratificació de l'epiteli seminífer i divisions cel·lulars que tenen lloc durant aquest procés

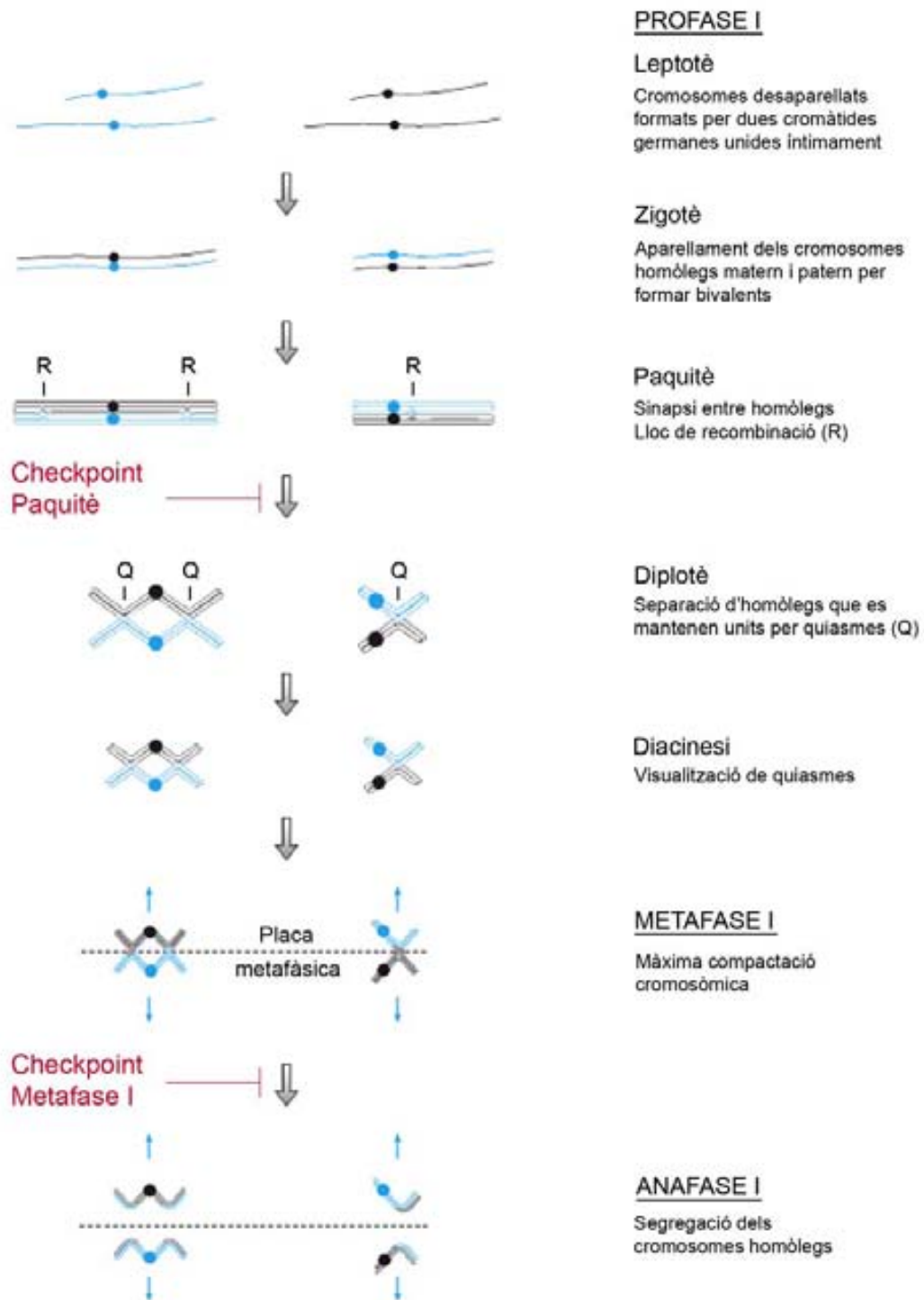
L'espermatogènesi es divideix en tres fases: (1) La *proliferació d'espermatogònies* mitjançant divisions mitòtiques, per mantenir un pool d'espermatogònies A i produir espermatogònies B que es diferenciaran en espermatòcits I, (2) la *meiosi*, que permet obtenir cèl·lules haploides (espermàtides) a partir d'espermatòcits I i (3) l'*espermiogenesis*, on les espermàtides es diferencien en espermatozoides a través d'un procés de diferenciació cel·lular que implica canvis morfològics, citoplasmàtics i nuclears.

L'espermatogènesi, localitzada als túbuls seminífers, s'inicia cíclicament a intervals regulars de 16 dies i dura aproximadament 74 dies (Heller i Clermont, 1964). A nivell histològic, es pot distingir una estratificació de l'epiteli seminífer, amb les espermatogònies tocant la làmina basal i els espermatozoides alliberant-se a la llum del túbul seminífer (veure Figura 1).

Durant la primera divisió meiótica (meiosi I) es segreguen els cromosomes homòlegs, produint espermatòcits II haploides. Perquè tingui lloc una correcta segregació cromosòmica és necessari el bon funcionament de múltiples processos, específics tots ells de la meiosi I, tals com aparellament, sinapsi i recombinació entre cromosomes homòlegs, pèrdua gradual de la cohesió entre cromàtides germanes i coorientació de centròmers de cromàtides germanes (revisat per Brar i Amon, 2008) (veure següents subapartats). Aquests processos tenen lloc en gran part durant la profase I, la fase meiótica més llarga, amb una durada d'uns 23 dies a l'espècie humana, i que està dividida convencionalment en 5 subestadis: leptotè, zigotè, paquitè, diplotè i diacinesi (Figura 2).

Durant la segona divisió meiótica (meiosi II), els centròmers units al fus acromàtic s'alineen a la placa equatorial i les cromàtides es segreguen a pols oposats degut a la pèrdua de la cohesió centromèrica (Tóth i col, 2000), al igual que en la mitosi. De tot el procés meiótic en resulten quatre espermàtides, la meitat portadores del cromosoma X i l'altra meitat portadores del Y.

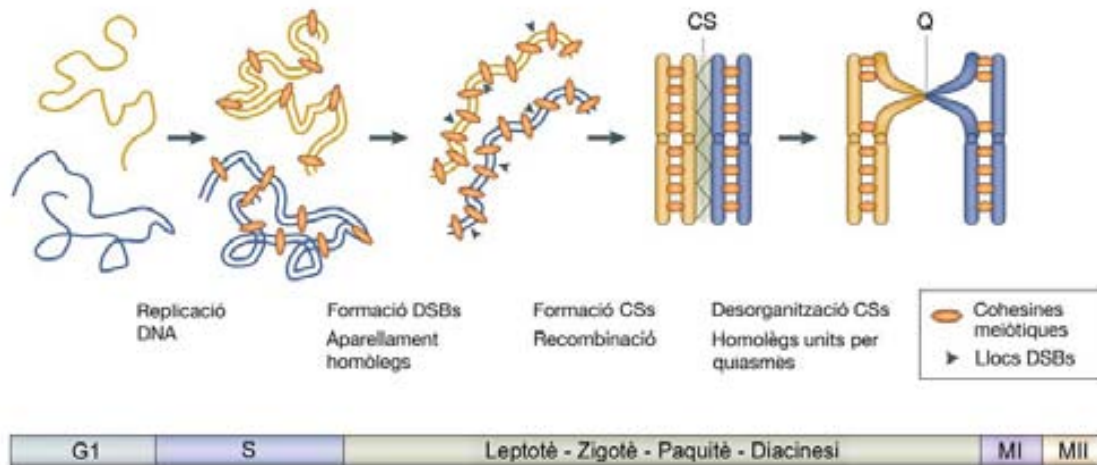




**Figura 2.** Processos específics de la meiosi I masculina i punts de control meiótics (*checkpoints*). A la imatge únicament es mostren dos parells d'homòlegs

### Aparellament i sinapsi meiótica

L'aparellament s'inicia a leptotè i consisteix en el reconeixement d'homologia i l'alineament dels cromosomes homòlegs, mentre que la sinapsi estableix l'aparellament amb la unió física entre els cromosomes homòlegs mitjançant la formació del complex sinaptonemal, una estructura proteica tripartita (Heyting, 1996; Pawlowski i Cande, 2005) (Figura 3).



**Figura 3.** Aparellament, sinapsi i recombinació meiótica a l'espècie humana (Modificat de Brar i Amon, 2008). DSB= trencaments de doble cadena, CS= complex sinaptonemal, Q= quiasma

Després de la replicació, les cromàtides germanes queden unides pel complex de cohesines, una estructura proteica al llarg de tot el cromosoma formada en part per cohesines específiques de meiosi (Revenkova i Jessberger, 2006). Els cromosomes es troben associats a l'embolcall nuclear pels telòmers que es concentren al voltant del centrosoma per acabar formant a finals de leptotè la configuració de *bouquet*. Aquesta configuració facilita l'aparellament entre cromosomes homòlegs (revisat per Scherthan, 2001). La producció de DSB en aquest estadi afavoreix la cerca d'homologia, gràcies al mecanisme de reparació per recombinació homòloga. També a leptotè, s'inicia l'estructuració al llarg de cada cromosoma de l'element axial, en íntima relació amb el

complex de cohesines i contribuint a la compactació i l'aparellament entre cromosomes homòlegs (Eijpe i col, 2000).

La sinapsi s'inicia a zigotè, amb l'estructuració de l'element central com a eix de unió entre els dos elements laterals (anomenats elements axials a leptotè) del complex sinaptinomal. En el cas dels espermatòcits humans, la sinapsi entre cromosomes homòlegs comença a les zones subtelmèriques dels braços p i q, menys en els cromosomes acrocèntrics que s'inicia només als braços q. La sinapsi va avançant al llarg dels bivalents direcció a centròmer, on queda aturada (Rasmussen i Holm, 1978; Brown i col, 2005).

A paquitè els telòmers ja no estan concentrats, segueix la condensació cromosòmica i la sinapsi és completa en totes les zones homòlogues. Els cromosomes sexuals, últim parell en sinapsar, es condensen formant la vesícula sexual. Els cromosomes X i Y només presenten dues regions d'homologia denominades regió pseudoautosòmiques (PAR), localitzades a la part distal del braç curt (PAR1) i del braç llarg (PAR2). Malgrat que la recombinació pot donar-se en ambdues regions, en el 98% dels casos es dona a la regió PAR1 (Li i Hamer, 1995; Blaschke i Rappold, 2006).

Mentre que el procés d'aparellament es produeix només entre zones homòlogues, a finals de paquitè pot produir-se el fenomen d'heterosinapsi entre zones no homòlogues per formar estructures topològicament més estables, denominat ajustament sinàptic. L'ajustament sinàptic té lloc en regions sense sinapsar (asinapsi) o amb inestabilitat sinàptica, les quals es resoldran amb pèrdua de la sinapsi amb homologia (desinapsi) i establiment d'heterosinapsi (Moses i col, 1982; revisat per Egozcue i col, 2005).

A diplotè té lloc la disgregació progressiva i asincrònica dels 23 complexos sinaptinomals, coincidint amb la compactació dels bivalents. A diacinesi el complex sinaptinomal ja ha desaparegut totalment i els cromosomes homòlegs només resten units pels quiasmes.

### **Recombinació meiótica i formació de quiasmes**

La recombinació meiótica entre els cromosomes homòlegs s'inicia a l'estadi de leptotè amb la creació de trencaments de doble cadena (DSB), distribuïts uniformement al llarg dels cromosomes. Aquests punts queden senyalitzats pels nòduls de recombinació primerencs, estructures ja observables a leptotè, formades per

complexes proteics que contenen la maquinària necessària per modificar els extrems de DNA generats, preparant-los per a la invasió d'una cromàtide homòloga, assegurant un alt grau d'homologia.

La reparació dels DSB s'inicia a zigotè, a través de la recombinació homòloga. Com a resultat es formen ponts entre cromosomes homòlegs, la majoria del quals es resoldran sense intercanvi de material genètic (conversió gènica), mentre que alguns esdevindran llocs de recombinació meiótica (revisat per Baudat i de Massy, 2007). Aquests punts de recombinació acostumen a trobar-se en zones determinades dels cromosomes (punts calents) i, a més, la seva distribució està condicionada pel fenomen d'interferència que impedeix la formació de dos punts de recombinació massa pròxims (Hultén, 1974; revisat per Cromie i Smith, 2007). Els nòduls de recombinació tardans, formats per proteïnes específiques com la MLH1, senyalen els punts de recombinació i, a més, sembla que podrien correspondre als punts d'iniciació del complex sinaptnemal (Henderson i Keeney, 2005). De fet, la recombinació meiótica és un procés íntimament relacionat amb l'aparellament (revisat per Pawlowski i Cande, 2005) i la sinapsi (Hamer i col, 2008b) entre cromosomes homòlegs.

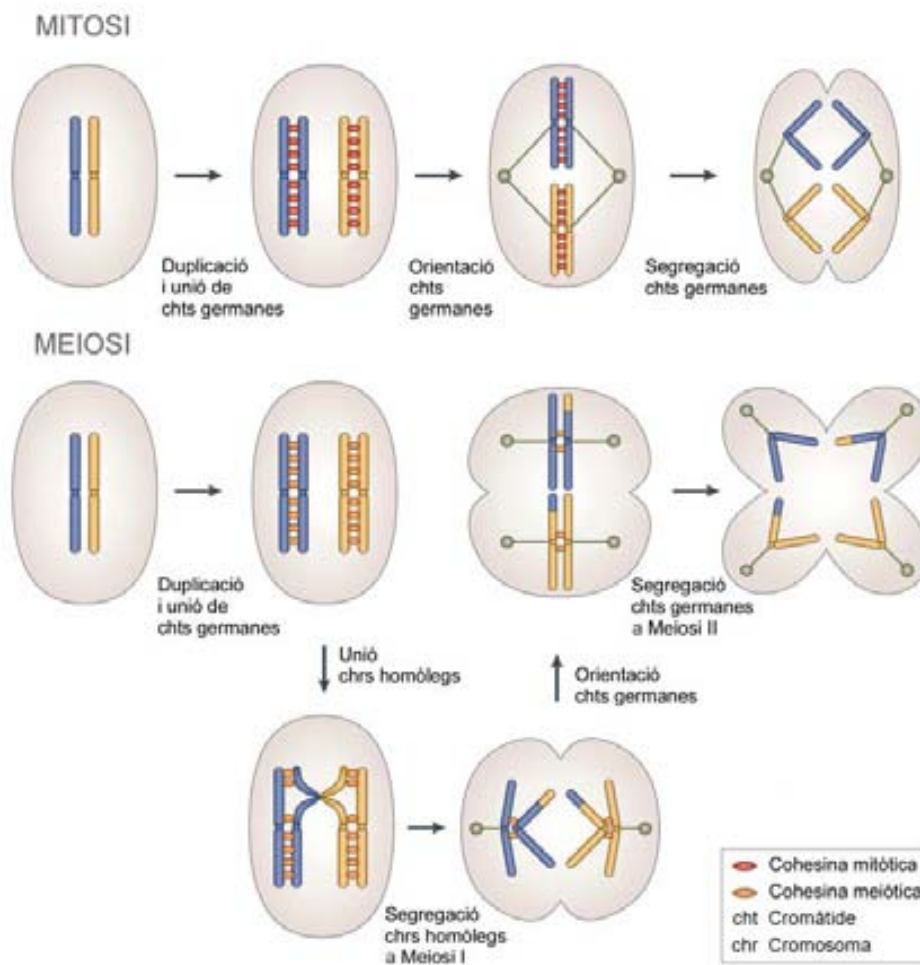
A diplotè, i especialment a diacinesi i metafase I, els entrecreuaments de cromàtides homòlogues resultants de la recombinació, coneguts amb el nom de quiasmes, mantenen la unió física entre cromosomes homòlegs (veure Figura 3). L'anàlisi de la seva freqüència i distribució al llarg dels bivalents ha estat l'aproximació més utilitzada a l'estudi de la recombinació meiótica. La presència de quiasmes en cadascun dels bivalents és essencial per la correcta segregació dels cromosomes homòlegs durant la meiosi I, sent els responsables de la unió entre homòlegs i del manteniment de la tensió cap a pols oposats a metafase I (Page i Hawley, 2003).

### **Segregació cromosòmica durant la meiosi**

Per la correcta segregació cromosòmica meiótica, són necessaris tres processos que tenen lloc durant la profase I: la cohesió entre cromàtides germanes, la sinapsi entre cromosomes homòlegs i la localització i freqüència de recombinació meiótica (quiasmes).

Durant la mitosi, les cromàtides germanes queden unides per un eix de cohesines, i és la seva desestructuració durant la transició metafase/anafase la que permet una

correcta segregació cromosòmica. A la meiosi, la segregació cromosòmica és més complexa, ja que requereix de la formació de quiasmes i de la pèrdua gradual de la cohesió i la coorientació de les cromàtides germanes (revisat per Petronczki i col, 2003) (Figura 4).



**Figura 4.** Similituds i diferències entre la segregació cromosòmica a mitosi i meiosi (Modificat de Brar i Amon, 2008)

A metafase I, els dos cromosomes homòlegs de cada bivalent es mantenen units per quiasmes que no es resolen gràcies als eixos de cohesines entre cromàtides

germanes (veure Figura 4). D'altra banda, cada cromosoma homòleg té el centrosoma unit a les fibres del fus acromàtic, tibant-los cap a pols oposats. Quan tots els bivalents es troben alineats a la placa metafàsica i bi-orientats a ambdós pols s'inicia l'anafase I, amb la pèrdua de cohesió dels braços cromosòmics i la resolució dels quiasmes, migrant cadascun dels homòlegs cap a un pol cel·lular diferent.

La segregació gradual de les quatre cromàtides d'un bivalent en dos etapes és possible gràcies a la desaparició de les cohesines al llarg dels braços cromosòmics a anafase I, mentre que en la regió centromèrica la cohesió es manté fins a anafase II (Kitajima i col, 2004; revisat per Revenkova i Jessberger, 2005). A més, durant la meiosi I, cal que els cinetocors de les cromàtides germanes s'uneixin als microtúbuls del mateix pol cel·lular per assegurar la seva segregació conjunta.

La segregació de cromàtides a meiosi II és molt similar a la que té lloc durant la mitosi, amb la única diferència que a meiosi II l'eix de cohesines es localitza només a la zona del centròmer. Després de la seva co-orientació durant la meiosi I, les dues cromàtides germanes s'uneixen ara a microtúbuls procedents de pols oposats, assegurant la seva correcta segregació.

### **Control de la meiosi masculina**

Els processos cel·lulars rellevants per la supervivència de la cèl·lula estan sotmesos a mecanismes de control o *checkpoints* que bloquegen o eliminen les cèl·lules "amb errors". Durant la meiosi, aquests mecanismes de control redueixen la freqüència de gàmetes anormals i, en conseqüència, de concepcions amb anomalies cromosòmiques. Fins al moment s'han descrit dos punts de control meiòtics als estadis de paquitè i metafase (veure Figura 2).

El *punt de control de paquitè (Pachytene Checkpoint)* monitoritza tant els processos d'aparellament i sinapsi com de recombinació meiòtica. Aquest *checkpoint* detecta zones sense aparellar i lesions en el DNA que no s'han reparat, i atura la progressió meiòtica a paquitè fins que aquests dos processos han finalitzat correctament. En cas que l'error no pugui ser reparat, s'indueix l'entrada de la cèl·lula en apoptosi (revisat per Roeder i Bailis, 2000), produint un bloqueig meiòtic que pot arribar a ser causa de infertilitat masculina (Guichaoua i col., 2005).

El *punt de control de metafase (Spindle Assembly Checkpoint)* s'encarrega d'assegurar la correcta segregació cromosòmica tant a mitosi com a meiosi I i II (revisat per Malmanche i col, 2006), controlant errors tant en la formació del fus (Woods i col, 1999) com en l'alineament dels cromosomes a la placa metafàsica (Li i Nicklas, 1995; Burke, 2000). Aquest mecanisme de vigilància inhibeix l'alliberament de les cohesines fins que la tensió en el fus acromàtic assegura que els cromosomes estiguin correctament bi-orientats.

A l'espècie humana, l'eficiència dels *checkpoints* meiòtics és superior a la meiosi masculina (revisat per Hunt i Hassold, 2002; Morelli i Cohen, 2005), causant bloqueig meiòtic que, en casos extrems, pot produir infertilitat. La menor eficiència d'aquests *checkpoints* en dones explicaria l'increment d'anomalies cromosòmiques presents en oòcits i el major origen matern de les trisomies.

### 1.3. Mecanismes de no disjunció meiòtics

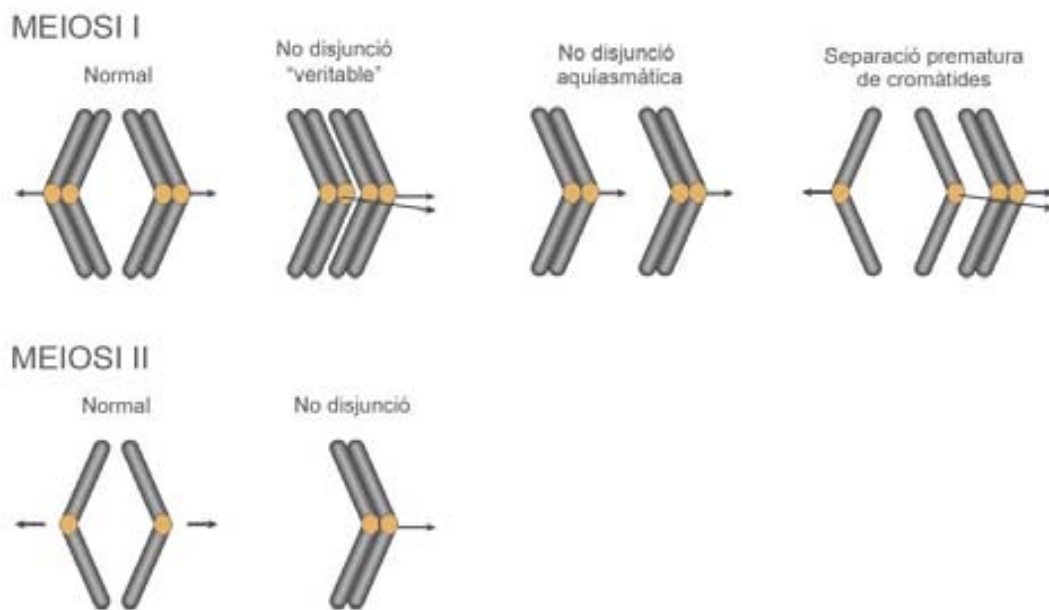
La majoria d'estudis de l'origen d'anomalies cromosòmiques són indirectes, i s'han realitzat mitjançant l'anàlisi de polimorfismes de DNA en avortaments o nadons amb trisomia per determinar l'origen parental i l'estadi on s'ha produït l'error de segregació, però no poden analitzar amb certesa els mecanismes implicats. Segons aquests estudis, el principal mecanisme d'origen d'aneuploïdies és la no disjunció que consisteix en la segregació al mateix pol cel·lular d'ambdós cromosomes homòlegs (meiosi I) o d'ambdues cromàtides germanes (meiosi II), originant gàmetes nul·lisòmics i disòmics amb la mateixa proporció (1:1). Estudis directes a metafase II en oòcits humans van permetre a Angell (1991) descriure un nou mecanisme de no disjunció anomenat separació prematura de cromàtides germanes (PSSC) o predivisió que implica la segregació de cromàtides germanes a meiosi I.

#### No disjunció a meiosi I

Fins al moment, s'han proposat tres mecanismes de no disjunció a meiosi I a l'espècie humana (Hassold i Hunt, 2001) (Figura 5).

El primer mecanisme és la no disjunció veritable, o segregació conjunta de dos cromosomes homòlegs possiblement per la incapacitat de resoldre els quiasmes que

els manté units. Un altre mecanisme és la no disjunció aquiasmàtica, en el que dos cromosomes separats (univalents) segreguen a l'atzar, amb una probabilitat del 50% de migrar al mateix pol. El tercer mecanisme de no disjunció implica la separació prematura de cromàtides germanes (PSSC) resultant en la migració d'un cromosoma i una cromàtide homòloga a un mateix pol.



**Figura 5.** Mecanismes de no disjunció meiótica (Modificat de Hassold i Hunt, 2001)

La no disjunció meiótica pot tenir el seu origen en alteracions de la recombinació meiótica o de la cohesió entre les cromàtides germanes (Warren i Goringe, 2006). La localització dels quiasmes sembla ser rellevant en la generació d'aneuploïdies, ja que els quiasmes són zones sense cohesió entre cromàtides germanes (Koehler i col, 1996; revisat per Lamb i col, 2005). Un quiasma molt proper a centròmer pot afavorir la separació prematura de cromàtides germanes durant l'anafase I, quan només queden unides per cohesines en la regió centromèrica. D'altra banda, un quiasma molt proper a telòmer pot resoldre's prematurament i donar lloc a no disjunció aquiasmàtica (revisat per McDougall i col, 2005).



## No disjunció a meiosi II

La no disjunció a meiosi II resulta de la segregació de les dues cromàtides germanes al mateix pol (veure Figura 5). Teòricament, es pot originar pel manteniment de la cohesió a anafase II, obligant les dues cromàtides a migrar conjuntament. També pot ser causada per una pèrdua prematura de la seva cohesió, amb la subseqüent segregació a l'atzar i formació de gàmetes aneuploides en la meitat dels casos (Hassold i Hunt, 2001).

### 1.4. Estudis de la meiosi masculina

Les anomalies cromosòmiques meiotiques poden donar lloc, d'una banda, a la producció d'espermatozoides amb anomalies cromosòmiques que poden produir avortaments espontanis o descendència afectada. D'altra banda, poden causar bloqueigs meiotics, originant oligozoospermia o azoospermia en funció del grau de bloqueig meiotic.

#### *Estudis citogenètics clàssics*

La majoria d'estudis cromosòmics meiotics s'han dut a terme en metafases I d'espermatòcits d'individus infèrtils i estèrils amb tècniques de tinció uniforme per conèixer les causes meiotiques de la seva infertilitat (Kjessler, 1966; Luciani, 1970; McDermott, 1973; Chandley i col, 1976; Koulisher i col, 1982; Egozcue i col, 1983; Laurie i Hultén, 1985a, 1985b). Segons aquests estudis, un 18% dels pacients presenten bloqueig meiotic (Egozcue i col, 1983) i un 6% anomalies cromosòmiques meiotiques (revisat per Egozcue i col, 2000) que poden arribar a valors del 17,6% en pacients amb oligoastenozoospermia severa (Vendrell i col, 1999). En totes les sèries publicades, les principals anomalies meiotiques són les sinàptiques, tals com baixa freqüència de quiasmes (Hultén i col, 1970; Pearson i col, 1970; Templado i col, 1976), presència d'univalents (Luciani, 1970) i desinapsi individual de bivalents (Templado i col, 1981). La presència a metafase I dels cromosomes sexuals dissociats ha estat descrita en la majoria d'estudis meiotics, amb freqüències mitjanes entre el 4,4% (Kjessler, 1966) i el 27% (Sasaki i Makino, 1965). Alguns autors han proposat que la dissociació dels cromosomes sexuals amb freqüències superiors al 30% podia ser causa d'infertilitat (Luciani i Stahl, 1978), ja que individus amb percentatges alts d'aquesta anomalia presenten sovint un descens del nombre de metafases II i bloqueig

a meiosi I (Chandley i col, 1976). Amb menor freqüència, també s'han descrit anomalies numèriques i estructurals ("fragments petits extrems"), no detectades al cariotip somàtic (Skakkebaek i col, 1973).

L'anàlisi de la meiosi en individus fèrtils és indispensable per establir les freqüències basals i tipus d'anomalies meiòtiques a la població general. No obstant, aquests estudis són escassos degut a la dificultat d'obtenció de biòpsies testiculars en individus amb fertilitat provada. Únicament dos estudis han analitzat la meiosi en individus fèrtils, amb l'objectiu de comparar els resultats amb els de les seves sèries d'individus infèrtils i estèrils (Skakkebaek i col, 1973; Lamont i col, 1981). Aquests estudis descriuen únicament la presència d'anomalies sinàptiques, majoritàriament cromosomes sexuals dissociats (Skakkebaek i col, 1973; Lamont i col, 1981), seguit d'univalents autosòmics petits (Skakkebaek i col, 1973).

Les anomalies meiòtiques en espermatòcits II s'han analitzat només en dues sèries d'infèrtils amb tècniques de citogenètica clàssica (Laurie i col, 1985; Guichaoua i col, 1986). El baix nombre de cèl·lules analitzades (200 i 100 espermatòcits II) en aquestes sèries és degut a la dificultat d'interpretació de les figures meiòtiques en aquest estadi amb la tècnica de tinció uniforme que requereix metafases II molt ben exteses.

### *Estudis del complex sineptinemat*

L'anàlisi de complexos sinapteinemals a paquitè s'ha utilitzat majoritàriament per la detecció d'anomalies sinàptiques en individus infèrtils i estèrils, especialment en pacients amb bloqueig meiòtic (revisat per Vidal i col, 1987). Aquesta tècnica ha permès determinar que gran part dels individus amb bloqueig a profase I presenten anomalies sinàptiques (Vidal i col, 1982). Posteriorment, l'aplicació de tècniques d'immunocitogenètica per la detecció del complex sinapteinemat i els llocs de recombinació ha possibilitat l'anàlisi simultània de la sinapsi i la recombinació meiòtica a profase I (Barlow i Hultén, 1996 i 1998). Mitjançant aquesta tècnica s'ha observat que la presència d'anomalies sinàptiques afecta la distribució de la recombinació meiòtica, no solament en el mateix bivalent sinó també en altres parells cromosòmics (Sun i col, 2005, 2007). La principal limitació de la tècnica d'immunocitofluorescència és que pot infravalorar el percentatge d'anomalies sinàptiques degut el fenomen d'ajustament sinàptic (Egozcue i col, 2005).

L'aplicació de la tècnica de hibridació *in situ* fluorescent (FISH) múltiplex (M-FISH) (Speicher i col, 1996) en cromosomes meiótics (Sarrate i col, 2004) ha permès la identificació simultània de tots els cromosomes a metafase I (MI) i metafase II (MII). Aquesta tècnica és especialment útil per identificar els cromosomes implicats en anomalies i augmentar el nombre d'espermatòcits analitzables, especialment a metafase II (Sarrate i col, 2004). D'altra banda, la tècnica de FISH múltiplex específica de centròmer (cenM-FISH) (Nietzel i col, 2001) ha possibilitat la identificació de tots els cromosomes en espermatòcits a l'estadi de paquitè (Oliver-Bonet i col, 2003), però no s'ha aplicat a l'estadi de metafase.

### **1.5. Estudis cromosòmics a l'espermatozoide humà**

Els estudis cromosòmics en espermatozoides només han estat possibles gràcies a dues metodologies: l'anàlisi del cariotip d'espermatozoides amb el sistema hámster-humà i la tècnica de FISH en nuclis descondensats d'espermatozoide. Ambdues tècniques s'han utilitzat per descriure la freqüència d'anomalies en espermatozoides d'individus control.

#### **Cariotip d'espermatozoides (sistema hámster-humà)**

La fusió d'òocits de hámster amb espermatozoides humans, seguida del bloqueig del procés a la primera divisió del zigot (Rudak i col, 1978), ha fet possible la observació directa dels cromosomes de l'espermatozoide. L'anàlisi del cariotip haploide de l'espermatozoide amb bandes G permet la detecció d'anomalies numèriques i estructurals a la vegada. Les principals limitacions d'aquesta tècnica són la complexitat de la metodologia, que limita el nombre d'espermatozoides analitzats per individu, i la impossibilitat de detectar la diploïdia. Les sèries més llargues en individus normals amb aquesta tècnica (Martin i col, 1987; Brandriff i col, 1988; Estop i col, 1995; Templado i col, 1996) han descrit freqüències d'anomalies estructurals de 6,6% i d'aneuploïdia conservativa de 1,8% (revisat per Templado i col, 2005). La majoria d'anomalies estructurals a espermatozoide són trencaments cromosòmics, afectant amb major freqüència al cromosoma 9 (Brandriff i col, 1988; Estop i col, 1995), mentre que els cromosomes més implicats en disomies són el 21 i els cromosomes sexuals (Templado i col, 1996).

### **FISH en nuclis descondensats d'espermatozoide**

La tècnica de FISH amb sondes en nuclis descondensats d'espermatozoide (Williams i col, 1993; Martin i col, 1993) possibilita l'anàlisi d'anomalies numèriques a través de la hibridació amb sondes de DNA i el posterior recompte de senyals d'hibridació. Aquesta tècnica permet estudiar un alt nombre d'espermatozoides per individu, i la seva principal limitació és que només pot analitzar uns pocs cromosomes en cada hibridació. En individus control, les freqüències mitjanes d'aneuploïdia conservativa i diploïdia descrites amb aquesta tècnica són 4,5% i 0,19%, respectivament (revisat per Templado i col, 2005). Tal i com ja s'havia descrit en cariotips d'espermatozoide, els cromosomes 21, X i Y són els que es troben més freqüentment implicats en disomies (Blanco i col, 1996; revisat per Templado i col, 2005).

En pacients infèrtils, la freqüència de disomia pels autosomes i pels cromosomes sexuals és superior a la descrita en individus control (Moosani i col, 1995; Lahdetie i col, 1999; Acar i col, 2000; revisat per Martin, 2008). El risc d'anomalies en aquests individus varia en funció de les característiques del seminograma. Mentre els pacients astenozoospermics presenten percentatges similars d'espermatozoides amb anomalies numèriques que a individus control (revisat per Rives, 2005), els teratozoospermics tenen, en general, aquestes freqüències incrementades (Templado i col, 2002; revisat per Machev i col, 2005). En pacients amb oligozoospermia i azoospermia les freqüències d'aneuploïdia són elevades (Nagvenkar i col, 2005; revisat per Burrello i col, 2005; Miharu, 2005) i mostren una correlació negativa amb el nombre d'espermatozoides (Sarrate i col, 2009). D'altra banda, individus infèrtils amb anomalies sinàptiques (Aran i col, 1999) mostren elevades freqüències de diploïdia a espermatozoide, i aquells amb història d'avortaments espontanis (Rubio i col, 1999) presenten incrementades la disomia XY i la diploïdia.

### **1.6. Objectius**

El principal objectiu d'aquest treball ha estat estudiar la freqüència i origen d'anomalies cromosòmiques meiòtiques en una població d'individus fèrtils amb els següents objectius concrets:

1. Establir la freqüència basal d'anomalies cromosòmiques meiòtiques en individus fèrtils
2. Conèixer els mecanismes que originen aquestes anomalies meiòtiques



## ***2. Material i mètodes***



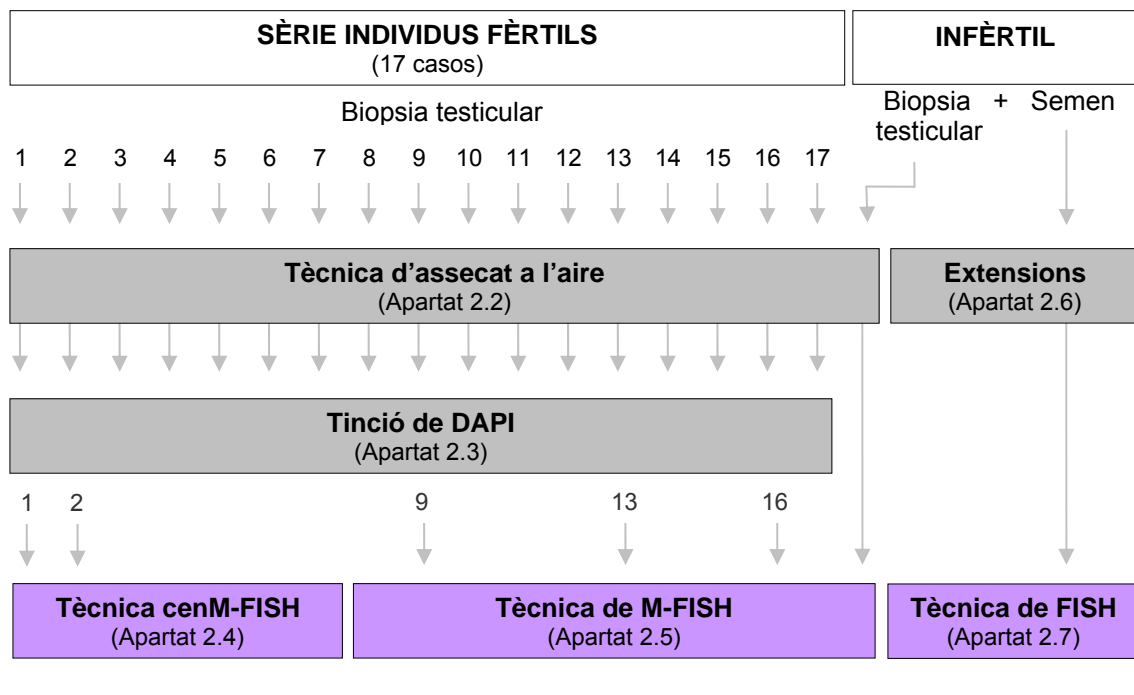


## 2.1. Material biològic

### *Sèrie d'individus fèrtils*

S'ha portat a terme l'estudi de la meiosi en biòpsies testiculars procedents d'una sèrie de 17 individus fèrtils, amb edats compreses entre 28 i 47 anys. Tots ells eren individus amb fills sotmesos a una intervenció de vasectomia, i que van acceptar participar en el present estudi.

En cadascun dels 17 individus fèrtils, l'estudi de la meiosi s'ha realitzat en extensions d'espermatòcit tenyides amb la tinció de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). A més, en tres dels individus (casos 9, 13 i 16) s'ha utilitzat la tècnica de M-FISH. Paral·lelament, en dos dels individus (casos 1 i 2) s'ha posat a punt la tècnica de cenM-FISH en cromosomes meiòtics d'espermatòcit (Figura 6).



**Figura 6.** Estudi meiótic en 17 individus fèrtils i en un pacient infèrtil teratozoospèrmic

### *Individu infèrtil*

S'ha analitzat la meiosi en un individu infèrtil de 38 anys amb cariotip somàtic 46,XY i història clínica de dos avortaments espontanis que no van poder ser cariotipats. El seu seminograma va revelar teratozoospèrmia, amb un 1% de formes morfològicament normals segons els criteris estrictes de Kruger (Kruger i col, 1988). El recompte espermàtic ( $28 \times 10^6$  espermatozoides/ml) i la motilitat progressiva ( $15,4 \times 10^6$  espermatozoides/ml) estaven dins dels paràmetres normals establerts per la OMS (1999).

L'estudi meiòtic s'ha realitzat en extensions d'espermatòcits amb la tècnica de M-FISH i en extensions d'espermatozoides seminals amb la tècnica de FISH amb sondes pels cromosomes 9, 10, 15, 21, X i Y (veure Figura 6).

Cap dels individus estudiats tenia història coneguda d'exposició a mutàgens, clastògens, drogues o radiacions. Set dels individus fèrtils eren fumadors (casos 1, 3, 4, 10, 14, 15 i 16).

Les mostres van ser facilitades pel Servei d'Andrologia de la Fundació Puigvert de Barcelona. Tots els donants, prèviament informats, van donar el seu consentiment abans de l'estudi, el qual va ser aprovat pel Comitè d'Ètica en Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona i pel Comitè d'Ètica de la Fundació Puigvert.

### **2.2. Extensions de metafases d'espermatòcit**

Les biòpsies testiculars s'obtenen per intervenció quirúrgica amb anestèsia local i es col·loquen en medi hipotònic (1% citrat sòdic) a temperatura ambient fins l'arribada al laboratori. El protocol de fixació de material testicular utilitzat en aquest treball és una modificació de la tècnica d'assecat a l'aire descrita per Evans i col (1964).

Després del tractament hipotònic durant 1h-1,5h, la mostra es disgrega uns 15 minuts amb tisores de dissecció, per alliberar les cèl·lules de l'interior dels túbuls seminífers. Es transfereix la suspensió cel·lular a un tub de centrífuga i es pipeteja amb una pipeta Pasteur per alliberar el major nombre de cèl·lules. Es deixa reposar per tal que sedimentin els fragments de túbuls, es recupera el sobrenedant i es transfereix a un altre tub que es centrifuga a 600g durant 5 minuts. Es decanta el sobrenedant i es

resuspèn el botó cel·lular en Carnoy (3 metanol:1 àcid acètic) gota a gota, agitant el tub en un vòrtex. Es centrifuga a 600g durant 5 minuts i es repeteixen tants rentats com calguin, fins que el botó quedi net (mínim 3 rentats). Abans de fer l'últim rentat, es deixen sedimentar els fragments i agregats. Es resuspèn el botó cel·lular ja rentat en un volum de 0,5 ml aproximadament, de manera que quedi una suspensió lleugerament tèrbola.

Es deixa caure una gota de la suspensió cel·lular al centre d'un portaobjectes net des d'una distància d'uns 20cm, i es deixa assecar en condicions d'humitat elevada, en una cambra humida preescalfada a 37°. Es verifica que la concentració cel·lular sigui la correcta sota microscopi de contrast de fases. Els portaobjectes es guarden a -20°C fins el moment de la seva tinció amb DAPI i hibridació amb M-FISH o cenM-FISH.

### 2.3. Tinció amb DAPI

Els portaobjectes amb les extensions d'espermatoïcits es sotmeten a una sèrie de rentats, en agitació, en solucions de 1xPBS, 0,4xSSC/0,3% NP40 a 73°C durant 2 minuts i 2xSSC/0,1% NP40 a temperatura ambient durant 5 minuts, seguit d'una deshidratació en sèrie d'etanols (70%, 85%, 100%). Després de deixar assecar, s'aplica DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a una concentració de 125 ng/ml en una solució *antifade* (Vectashield) i es col·loca un cubreobjectes a sobre. Les preparacions es guarden a 4°C o -20°C fins el moment de l'anàlisi meiótica.

### 2.4. Tècnica de FISH múltiplex (M-FISH)

La tècnica de M-FISH utilitza 24 llibreries de DNA, cadascuna d'elles marcada amb una combinació de fluorocroms diferent que permeten la identificació simultània de tots els cromosomes humans (Figura 7). El protocol de M-FISH aplicat a cromosomes meiótics en aquest treball és una adaptació del recomanat per la casa comercial per a cromosomes somàtics (Spectravision Assay, Vysis) (Figura 8), i consta de tractaments pre-hibridació, desnaturalització de DNA i hibridació *in situ* i rentats post-hibridació.

#### *Tractaments pre-hibridació*

Després d'analitzar les extensions de cromosomes meiótics amb la tinció amb DAPI, es retiren els cubreobjectes de les preparacions i es renten en una solució de

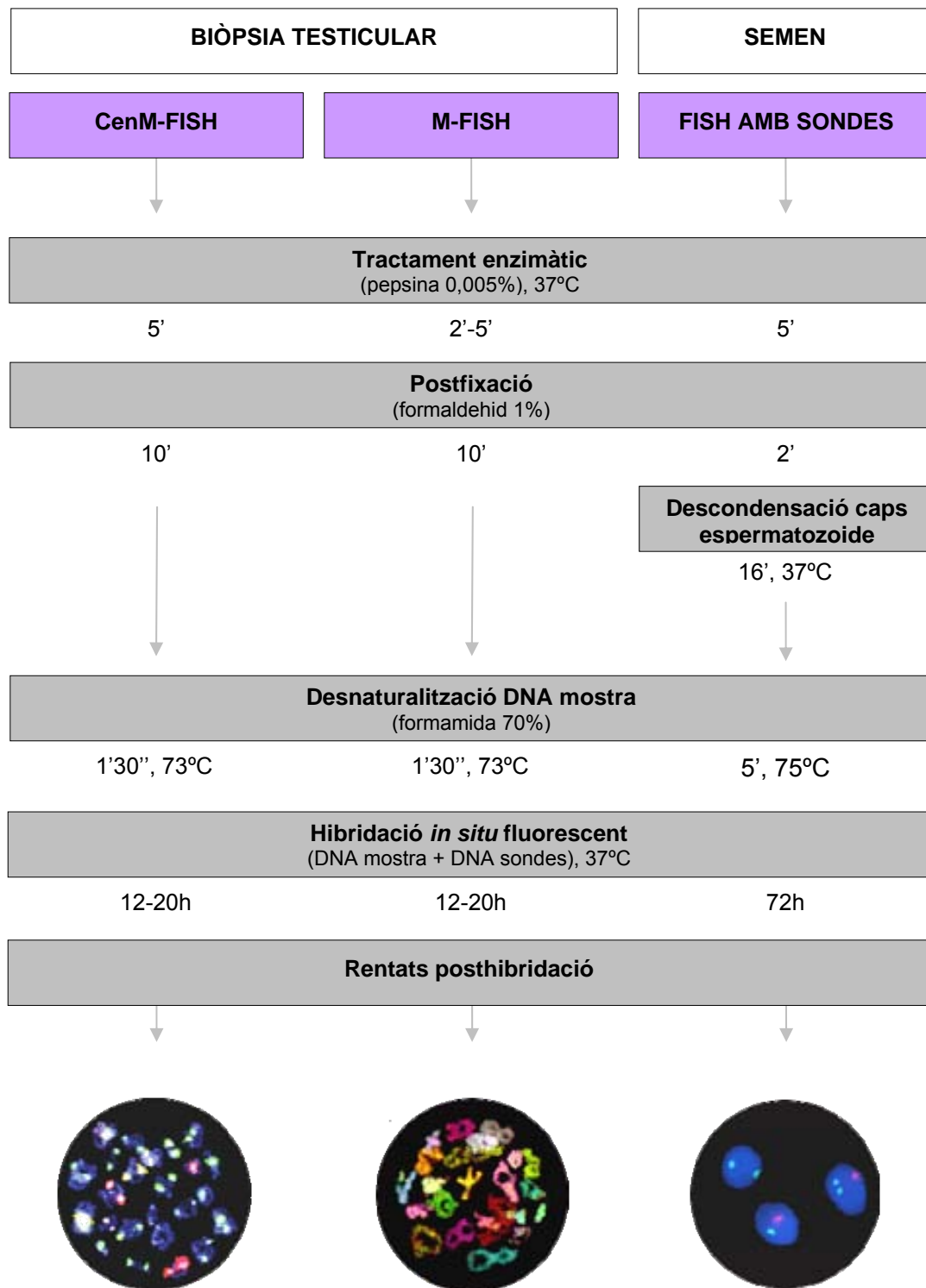
2xSSC/0,1% NP-40 en agitació durant 5 minuts, seguit d'una deshidratació en sèrie d'etanols (70%, 85%, 100%). A continuació, es fa un tractament enzimàtic de 5 minuts per eliminar el citoplasma amb una solució de pepsina al 0,005% en 0,01N HCl a 37°C. És molt important afegir la pepsina a la solució d'HCl just abans de posar-hi la mostra. El porta es renta amb 2xSSC, es fa un tractament de postfixació de 10 minuts amb formaldehid al 1%, es renta amb 1xPBS i es deshidrata en una sèrie d'etanols (70%, 85%, 100%). Es mira el portaobjectes al microscopi òptic de contrast de fases per assegurar que no hi hagi restes de citoplasma.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Spectrum Green				Green		Green						Green	Green	Green		Green	Green		Green		Green	Green		
Spectrum Red		Red		Red				Red	Red		Red			Red	Red		Red	Red		Red		Red		
Spectrum Far Red					Far Red		Far Red	Far Red		Far Red						Far Red	Far Red	Far Red	Far Red	Far Red		Far Red	Far Red	
Spectrum Gold	Gold				Gold				Gold	Gold		Gold		Gold	Gold			Gold	Gold		Gold		Gold	Gold
Spectrum Aqua			Aqua							Aqua	Aqua		Aqua		Aqua				Aqua	Aqua	Aqua	Aqua		

**Figura 7.** Combinació de fluorocroms per a cada cromosoma amb la tècnica de M-FISH

*Desnaturalització de DNA i hibridació in situ*

Prèviament a la hibridació de les sondes amb el cromosomes meiòtics, cal desnaturalitzar el DNA de la mostra i el DNA de les sondes per separat. El portaobjectes amb les cèl·lules meiòtiques es tracten en una solució, preparada al moment, de formamida al 70% en 2xSSC (pH=7,0) a 73°C durant 1,5 minuts per tal de desnaturalitzar el DNA, i es deshidraten en una sèrie d'etanols (70%, 85%, 100%). Paral·lelament, es desnaturalitza el DNA de les sondes a 73-75°C durant 5 minuts. Un cop assecat el portaobjectes, s'apliquen 5 µl de barreja de sondes sobre la zona a hibridar, prèviament marcada amb llapis de diamant, i es col·loca un cubreobjectes de 20mmx20mm que es sella amb goma aràbiga. Es deixa hibridar entre 12 i 20 hores en una cambra humida a 37°C.



**Figura 8.** Tècniques d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) utilitzades en aquest estudi

*Rentats post-hibridació*

Una vegada finalitzada la hibridació, es retira el cubreobjectes amb l'ajuda d'unes pinces i es renten els portaobjectes, primer, en una solució de 0,4xSSC/0,3% NP40 a 73°C durant 2 minuts i, després, en una solució de 2xSSC/0,1% NP40 a temperatura ambient durant 2 minuts, en agitació. Es deshidraten les preparacions en sèrie d'etanols (70%, 85%, 100%). Finalment, un cop assecat el portaobjectes, s'afegeixen 15 µl de DAPI (125ng/ml) en *antifade* (Vectashield) i es col·loca un cubreobjectes. Les preparacions es guarden a 4°C o -20°C, fins el moment d'analitzar.

**2.5. Tècnica de cenM-FISH**

La cenM-FISH utilitza 55 sondes centromèriques o subcentromèriques no comercials que permeten la identificació simultània de tots els centròmers humans amb combinacions específiques de cinc fluorocroms diferents (Figura 9). Els centròmers 13 i 21 tenen la mateixa combinació, ja que presenten seqüències centromèriques molt similars. La tècnica emprada és una adaptació de la descrita en cromosomes somàtics per Nietzel i col·laboradors (2001) (veure Figura 8).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y	
Spectrum Green	Green	Green	Green				Green	Green	Green				Green		Green					Green	Green				Green
Spectrum Orange	Red		Red			Red	Red	Red		Red	Red					Red	Red	Red				Red			
Spectrum Red				Magenta	Magenta	Magenta	Magenta		Magenta	Magenta		Magenta				Magenta		Magenta		Magenta					
Biotina-Cianina5			Yellow		Yellow	Yellow				Yellow	Yellow		Yellow	Yellow								Yellow	Yellow		Yellow
Diethylaminocumarina				Cyan	Cyan	Cyan		Cyan		Cyan		Cyan	Cyan			Cyan	Cyan	Cyan			Cyan		Cyan		Cyan

**Figura 9.** Combinació de fluorocroms per a cada cromosoma amb la tècnica de cenM-FISH

Els tractaments pre-hibridació, la desnaturalització del DNA de la mostra i la hibridació *in situ* són comuns als de la tècnica de M-FISH i ja s'han descrit a l'apartat 2.4. La desnaturalització de les sondes i els rentats post-hibridació són diferents per tal d'aconseguir la detecció amb anticossos requerida per la cenM-FISH.

*Desnaturalització de les sondes*

Totes les sondes es desnaturalitzen a 75°C durant 5 minuts. Les sondes pels cromosomes 5 i 6, a més, requereixen una pre-hibridació a 37°C durant 30 minuts.

*Rentats post-hibridació*

Acabada la hibridació, les preparacions es renten, primer, amb 0,4xSSC a 64°C durant 5 minuts i, després, amb 4xSSC/0,05% Tween 20 a temperatura ambient durant 5 minuts. A continuació, es detecta la biotina mitjançant anticossos: s'afegeixen 1,2µl de l'anticòs streptoavidina-cianina5 a una solució de llet en pols en 2xSSC, i s'afegeix al portaobjectes encara humit. S'incuba a 37°C en una cambra humida entre 30 i 40 minuts, es renta en una solució de 1xPBS i es deshidrata en una sèrie d'etanols (70%, 85%, 100%).

**2.6. Captura i anàlisi d'imatges**

Les metafases tenyides amb DAPI i les metafases hibridades amb la tècnica de M-FISH s'han capturat amb un microscopi d'epifluorescència (Olympus Bx60) i una càmera CCD (*charge-coupled device*) d'alta sensibilitat (Photometrics Sensys/Olympus U-SPT) acoblada a un Power Macintosh G3 i, posteriorment, s'han analitzat amb els programes SmartCapture (Digital Scientific) i SpectraVysion (Digital Scientific), respectivament. Les metafases hibridades amb la tècnica de cenM-FISH s'han capturat i analitzat sota un microscopi d'epifluorescència (Zeiss Axioplan), amb una càmera CCD acoblada a un ordinador equipat amb el programa de captura i anàlisi d'imatges MetaSystems. En les metafases hibridades, cadascun dels cinc fluorocroms hibridats i el DAPI es capturen per separat. La superposició de les cinc imatges resulta en un color diferent per a cada cromosoma que permet cariotipar la metafase.

**2.7. Anàlisi citogenètica de metafases d'espermatòcit**

L'anàlisi citogenètica de metafases meiòtiques s'ha dut a terme amb la contratinció amb DAPI, mentre que la identificació cromosòmica s'ha realitzat amb les imatges de FISH resultants de la composició dels 5 fluorocroms (M-FISH) o dels 5 fluorocroms i el DAPI (cenM-FISH). Cada metafase contratenyida amb DAPI s'ha analitzat per dues persones i les anomalies cromosòmiques s'han classificat d'acord amb l'ISCN

(*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) (Shaffer i Tommerup, 2005). L'aneuploïdia conservativa s'ha estimat com el doble de la hiperploïdia per tal d'evitar la sobreestimació de la hipoploïdia a causa de les pèrdues artefactuals de cromosomes durant la tècnica d'extensió. Les metafases hipoploides que presentaven altres anomalies s'han tingut en compte i han estat classificades d'acord amb l'anomalia. Només les metafases II nucleades amb 46 cromosomes distribuïts a l'atzar s'han considerat diploides. Les metafases II no es van estudiar amb la tinció amb DAPI degut a la dificultat d'individualitzar cada cromosoma en aquest estadi, on les cromàtides de cada cromosoma estan obertes i hi ha moltes sobreposicions.

### **2.8. Extensions d'espermatozoides**

Per a l'obtenció de les extensions d'espermatozoides s'ha seguit el protocol descrit anteriorment pel nostre grup (Bosch i col, 2001). La mostra de semen s'obté per masturbació, prèvia abstinència de tres dies, i es manté a temperatura ambient en un recipient de plàstic estèril fins la seva liquèfacció.

La mostra es transfereix en un tub de centrifuga i s'hi afegix hipotònic (KCl 0,075M) gota a gota, agitant al vòrtex. Es centrifuga 5 minuts a 600g i es descarta el sobrenedant. El botó cel·lular es resuspèn novament en hipotònic, i es fan tants rentats com calgui per eliminar el plasma seminal (mínim tres). Després es resuspèn el botó cel·lular en fixador (Carnoy; 3:1 metanol:àcid acètic) gota a gota, agitant el tub al vòrtex, i es centrifuga 5 minuts a 600g. Després de repetir dos rentats més amb Carnoy, es resuspèn en un volum de 0,5 ml de fixador per tal d'obtenir una concentració d'espermatozoides òptima.

Es deixa caure una gota de la suspensió cel·lular al centre del portaobjectes net des d'una distància d'uns 20cm, i es deixa assecar. Es verifica la concentració amb el microscopi de contrast de fases i s'extén la mostra a la resta de portaobjectes que es guarden a -20°C fins el moment de la seva utilització.



## 2.9. Tècnica de FISH amb sondes

S'ha aplicat la tècnica de FISH amb sondes a nuclis descondensats d'espermatozoides (veure Figura 8), utilitzant sondes comercials (Vysis) per a sis cromosomes diferents, tant centromèriques (CEP) com *locus* específiques (LSI) (Figura 10). El protocol seguit és el ja descrit anteriorment per Bosch i col·laboradors (2001).

	Hibridació 1			Hibridació 2		
	CEP9	CEP10	LSI21	CEP15	CEPX	CEPY
Spectrum Green						
Spectrum Orange						
Spectrum Aqua						

**Figura 10.** Tipus de sondes i fluorocroms utilitzats en la tècnica de FISH aplicada a nuclis descondensats d'espermatozoide

### *Tractament pre-hibridació: tractament enzimàtic*

Els portaobjectes amb els espermatozoides fixats es renten en una solució de 2xSSC i es deshidraten en sèrie d'etanols (70%, 85%, 100%). Les preparacions es tracten 5 minuts en una solució de pepsina al 0,005% en 0,01N HCl a 37°C, es renten dues vegades en solució de 2xSSC, es postfixen en solució de formaldehid al 1% durant 2 minuts, es renten dues vegades en solució de 1xPBS i es deshidraten en una sèrie d'etanols (70%, 85%, 100%). Les preparacions s'observen al microscopi òptic de contrast de fases per assegurar que el temps del tractament enzimàtic ha estat òptim.

### *Tractaments pre-hibridació: descondensació dels caps d'espermatozoide*

Degut a l'alta condensació de la cromatina en el nucli de l'espermatozoide, cal fer un tractament previ a la hibridació per facilitar l'accés de les sondes al DNA nuclear. Les extensions d'espermatozoides es submergeixen en una solució de DTT (5mM ditiotretitol, 0,1M Tris, 0,1% Triton X-100) a 37°C durant 16 minuts, es renten en una solució de 2xSSC i es deshidraten en sèrie d'etanols (70%, 85%, 100%). Cal controlar

sota microscopi òptic de contrast de fases el grau de descondensació dels nuclis d'espermatozoide.

### *Desnaturalització de DNA i hibridació in situ*

Els portaobjectes amb els nuclis d'espermatozoide descondensats es tracten en una solució, preparada al moment, de formamida al 70% en 2xSSC (pH=7,0) a 75°C, durant 5 minuts, per desnaturalitzar el DNA, i es deshidraten en una sèrie d'etanols (70%, 85%, 100%). Paral·lelament, es col·loquen 5 µl de barreja de sondes en un tub Eppendorf i es desnaturalitzen a 75°C durant 5 minuts. S'apliquen les sondes sobre la zona a hibridar del portaobjectes i es col·loca un cubreobjectes de 20mmx20mm que es sella amb goma aràbiga. Es deixa hibridar en una cambra humida a 37°C durant 72 hores.

### *Rentats post-hibridació*

Al cap de 72 hores, s'extreu el cubreobjectes amb l'ajuda d'unes pinces i es procedeix als rentats post-hibridació, primer, en una solució de 0,4xSSC/0,3% NP40 a 75°C durant 2 minuts i, després, en una solució de 2xSSC /0,1% NP40 a temperatura ambient durant 2 minuts, en agitació. Es deshidrata en sèrie d'etanols (70%, 85%, 100%), en agitació. L'agitació enèrgica dels portaobjectes durant els rentats post-hibridació és molt important per tenir una hibridació neta, facilitant molt el recompte posterior de senyals. S'apliquen 15 µl de DAPI (125ng/ml) en *antifade* (Vectashield) sobre el porta i es col·loca un cubreobjectes. Les preparacions es guarden a 4°C o -20°C, fins a la seva anàlisi.

## **Captura d'imatges i recompte de senyals**

Pel recompte de senyals d'hibridació s'ha utilitzat un microscopi d'epifluorescència (Olympus Bx60), i per la captura d'imatges s'ha fet servir una càmera CCD d'alta sensibilitat (Photometrics Sensys/Olympus U-SPT) acoblada a un ordinador Power Macintosh G3 equipat amb el programa SmartCapture (Digital Scientific).

El recompte de senyals d'hibridació només s'ha portat a terme en preparacions amb un 99% d'eficiència d'hibridació, i en nuclis intactes, sense superposicions i amb una cua visible. S'ha comptat un mínim de 10.000 espermatozoides per experiment, i totes les senyals dubtoses es van analitzar, com a mínim, per un segon observador. S'han

fet servir els criteris estrictes prèviament descrits pel nostre grup (Bosch i col, 2001), que són els següents:

- Es considera nul·lisomia quan no es detecta senyal per la sonda corresponent, però el nucli conté una senyal per a cada un dels altres cromosomes analitzats
- Es comptabilitza com a disomia dues senyals en un mateix nucli amb la mateixa mida i intensitat i que es troben separades, com a mínim, per una distància equivalent al diàmetre d'una d'elles
- S'inclouen com a diploides els nuclis que tenen dues senyals per a cada autosoma i pels cromosomes sexuals

### **2.10. Anàlisi estadística de les dades**

L'anàlisi estadístic s'ha dut a terme amb el programa estadístic SAS. Per realitzar l'anàlisi de variabilitat i per comparar freqüències d'anomalies cromosòmiques s'ha fet servir el test exacte de Fisher, excepte per la comparació de les freqüències d'anomalies numèriques entre espermatòcit II i espermatozoide de l'individu infèril que s'ha utilitzat el test de  $\chi^2$  amb correcció de Bonferroni per múltiples comparacions. Per comparar la mitjana de quiasmes entre espermatòcits amb els cromosomes sexuals junts i separats en l'individu infèril s'ha fet servir el test t-Student i, per comparar mitjanes de quiasmes entre diversos individus s'ha utilitzat el test no paramètric de Kruskal-Wallis. Per analitzar la correlació entre edat i freqüència d'anomalies meiótiques es va utilitzar el test de correlació no paramètric d'Spearman.



### ***3. Resultats***



L'estudi meiòtic es va realitzar en espermatòcits I d'una sèrie de 17 individus fèrtils amb la tinció amb DAPI. En tres d'aquests individus es va utilitzar la tècnica de M-FISH per una millor caracterització de les anomalies cromosòmiques meiòtiques i per estudiar els mecanismes que les originen (veure article 1 a l'Annex). La tècnica de cenM-FISH es va posar a punt en cromosomes meiòtics de dos dels individus de la sèrie (veure article 2 a l'Annex), i els resultats obtinguts no han estat inclosos en l'anàlisi meiòtica general. També es va estudiar un individu infèril amb cariotip normal i sospita d'anomalies meiòtiques per presentar teratozoospermia i història clínica d'avortaments espontanis. En aquest individu es van combinar les tècniques d'M-FISH en espermatòcits i FISH amb sondes en espermatozoides (veure article 3 a l'Annex). Tenint en compte els 18 individus i les diverses tècniques d'anàlisi utilitzades, en aquest treball s'han estudiat un total de 1998 espermatòcits I, 401 espermatòcits II i 20.193 espermatozoides.

### 3.1. Estudis meiòtics en individus fèrtils

#### Anomalies meiòtiques amb tinció DAPI

Quatre dels 17 individus estudiats (23,5%) tenien bivalents de mida mitjana amb un únic quiasma terminal (bivalents desinàptics), tres d'ells (17,6%) univalents autosòmics i dos dels casos (11,8%) presentaven ambdós tipus d'anomalies sinàptiques. Les anomalies estructurals i numèriques afectaven un 82,4% i un 23,5% dels donants, respectivament. Tots els individus estudiats presentaven metafases I amb els cromosomes sexuals dissociats, amb freqüències entre un 3,2% i un 43,7%.

Es van analitzar un total de 1407 metafases I procedents dels donants fèrtils amb la tinció amb DAPI (Figura 11a). Les freqüències d'anomalies sinàptiques, numèriques i estructurals per cadascun d'ells es mostren a la Taula 3 i els cariotips amb anomalies a la Taula 4.

La freqüència total d'anomalies meiòtiques en espermatòcits I era 27,4%. Les anomalies sinàptiques observades eren cromosomes sexuals dissociats (22,1%) (Figura 12a), bivalents desinàptics (0,9%) i autosomes petits separats (univalents) (0,4%), probablement del grup G (Figura 12b). Un dels individus (cas 12) presentava una freqüència d'anomalies meiòtiques superior ( $P < 0,0001$ ) a la mitjana.

**Taula 3.** Anomalies cromosòmiques meiotiques en espermatòcits I i II de 17 donants fèrtils i 1 individu infèrtil analitzades amb les tècniques de tinció amb DAPI, cenM-FISH i M-FISH <sup>a</sup>

Donant	Edat	Metafase I								Mitjana de quiasmes	Metafase II					
		Total MI	Anomalies sinàptiques (%)		Anomalies numèriques (%)		A. estructurals (%)	A. meiotiques totals (%)	Total MII		Separació cromàtides (%)	Anomalies numèriques (%)			A. estructurals (%)	A. meiotiques totals (%)
			X,Y	Autosomes	Hiperploïdia	Aneuploïdia <sup>b</sup>						Diploïdia	Hiperploïdia	Aneuploïdia <sup>b</sup>		
<i>tinció DAPI</i>																
1	45	125	23 (18,4)	2 (1,6)	1 (0,8)	2 (1,6)	5 (4,0)	32 (25,6)	52,2±3,9							
2	39	203	33 (16,3)	3 (1,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (3,9)	44 (21,7)	50,3±2,1							
3	39	30	12 (40,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	12 (40,0)	47,9±3,6							
4	47	115	30 (26,1)	1 (0,9)	1 (0,9)	2 (1,7)	2 (1,7)	35 (30,4)	52,3±2,6							
5	38	161	43 (26,7)	1 (0,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (4,3)	51 (31,7)	48,7±3,3							
6	30	62	2 (3,2)	1 (1,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,2)	5 (8,1)	50,8±2,1							
7	35	92	24 (26,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,1)	25 (27,2)	53,4±2,8							
8	36	56	5 (8,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,6)	7 (12,5)	52,0±2,8							
9	33	53	13 (24,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (7,5)	17 (32,1)	48,8±2,9							
10	43	25	5 (20,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,0)	6 (24,0)	47,4±2,9							
11	36	67	17 (25,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,5)	18 (26,9)	52,3±2,3							
12	37	71	31 (43,7)	3 (4,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (7,0)	39 (54,9)	50,0±2,7							
13	41	95	25 (26,3)	3 (3,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	28 (29,5)	50,9±2,5							
14	40	17	2 (11,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (11,8)	51,0±2,5							
15	41	70	12 (17,1)	0 (0,0)	2 (2,9)	4 (5,7)	3 (4,3)	19 (27,1)	47,6±4,0							
16	28	97	25 (25,8)	1 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (3,1)	29 (29,9)	48,3±3,0							
17	43	68	9 (13,2)	2 (2,9)	1 (1,5)	2 (2,9)	3 (4,4)	16 (23,5)	51,1±2,4							
<b>Total</b>	<b>38,3</b>	<b>1407</b>	<b>311 (22,1)</b>	<b>17 (1,2)</b>	<b>5 (0,4)</b>	<b>10 (0,7)</b>	<b>47 (3,3)</b>	<b>385 (27,4)</b>	<b>50,3±3,3</b>							
<i>cenM-FISH</i>																
1		99	16 (16,2)	1 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (4,0)	21 (21,2)		30	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,3)	1 (3,3)
2		69	12 (17,4)	0 (0,0)	2 (2,9)	4 (5,8)	2 (2,9)	18 (26,1)		36	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,8)	1 (2,8)
<b>Total</b>		<b>168</b>	<b>28 (16,7)</b>	<b>1 (0,6)</b>	<b>2 (1,2)</b>	<b>4 (2,4)</b>	<b>6 (3,6)</b>	<b>39 (23,2)</b>		<b>66</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>2 (3,0)</b>	<b>2 (3,0)</b>
<i>M-FISH</i>																
8		74	15 (20,3)	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (6,8)	21 (28,4)		44	4 (9,1)	2 (4,5)	4 (9,1)	8 (18,2)	1 (2,3)	15 (34,1)
13		126	35 (27,8)	6 (4,8)	3 (2,4)	6 (4,8)	3 (2,4)	50 (39,7)		103	6 (5,8)	0 (0,0)	2 (1,9)	4 (3,9)	11 (10,7)	21 (20,4)
16		117	30 (25,6)	1 (0,9)	1 (0,9)	2 (1,7)	4 (3,4)	37 (31,6)		101	7 (6,9)	0 (0,0)	11 (10,9)	22 (21,8)	3 (3,0)	32 (31,7)
<b>Total</b>		<b>317</b>	<b>80 (25,2)</b>	<b>8 (2,5)</b>	<b>4 (1,3)</b>	<b>8 (2,5)</b>	<b>12 (3,8)</b>	<b>108 (34,1)</b>		<b>248</b>	<b>17 (6,9)</b>	<b>2 (0,8)</b>	<b>17 (6,9)</b>	<b>34 (13,7)</b>	<b>15 (6,0)</b>	<b>68 (27,4)</b>
<i>M-FISH</i>																
Infèrtil	38	106	51 (48,1)	9 (8,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	10 (9,5)	70 (66,0)	53,7±1,8	87	1 (1,1)	7 (8,0)	6 (6,9)	12 (13,8)	4 (4,6)	24 (27,6)

<sup>a</sup>Els espermatòcits amb més d'una anomalia meiotica s'han llistat en cadascuna de les categories

<sup>b</sup>L'aneuploïdia conservativa s'ha estimat com 2xhiperploïdia



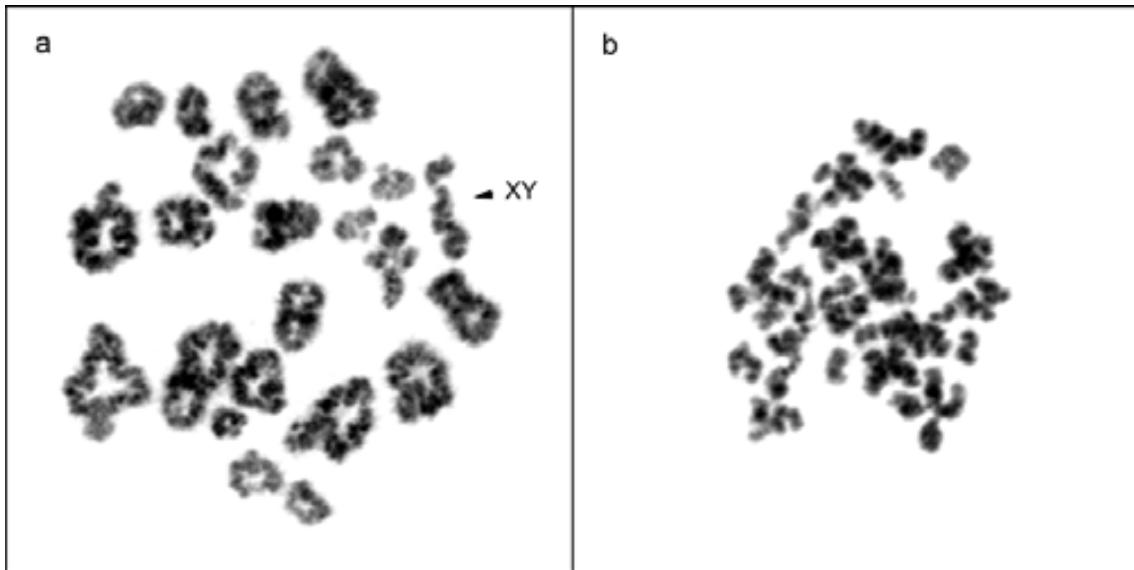
**Taula 4.** Cariotips amb anomalies meiòtiques detectats en 1407 espermatòcits I de 17 individus fèrtils amb tinció amb DAPI

	<b>Nº Anomalies (%)</b>
<b>Anomalies sinàptiques</b>	<b>328 (23,3)</b>
<i>Cromosomes sexuals</i> <sup>a</sup>	311 (22,1)
24,X,Y (297 cèl·lules)	
<i>Autosomes</i>	17 (1,2)
23,XY,II(B,B)(xma=1)	
23,XY,II(C,C)(xma=1) (7 cèl·lules)	
24,X,Y,II(C,C)(xma=1)	
25,X,Y,II(C,C)(xma=1),II(C,C)(xma=1),II(?15),+I(?15),+I(?15)	
23,XY,II(C,C)(xma=1),+ace <sup>b</sup>	
23,XY,-II(G),+I(G) (2 cèl·lules)	
24,XY,-II(G),+I(G),+I(G)	
24,XY,-II(22),+I(?22),+I(?22)	
<b>Anomalies numèriques</b>	<b>10 (0,7)</b>
<i>Diploïdia</i>	0 (0,0)
<i>Hiperploïdia</i>	5 (0,4)
25,X,Y,+I(C)	
25,X,Y,+II(E)	
24,XY,+I(?18) (2 cèl·lules)	
25,X,Y,+I(?21)	
<i>Aneuploïdia</i> <sup>c</sup>	10 (0,7)
<b>Anomalies estructurals</b>	<b>47 (3,3)</b>
23,XY,+ace (27 cèl·lules)	
24,X,Y,+ace (8 cèl·lules)	
23,XY,+2ace	
23,XY,II(C,C)(xma=1),+ace <sup>b</sup>	
23,XY,chtb(X),+ace	
23,XY,chrB(1)	
23,XY,2chrB(C)	
24,X,Y,del(C)(q?)	
22,XY,III(?14q21q)	
24,XY,+mar	
23,XY,pvz(E)	
<b>Total anomalies meiòtiques MI</b>	<b>385 (27,4)</b>

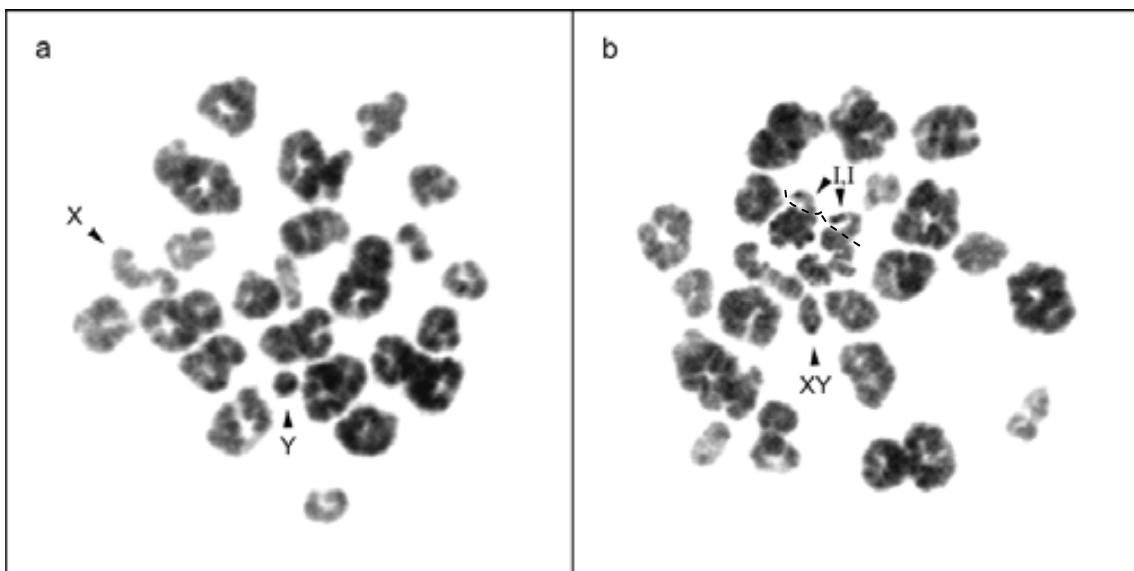
<sup>a</sup>Catorze espermatòcits amb més d'una anomalia meiòtica estan llistats en les altres categories

<sup>b</sup>Una cèl·lula presentava anomalies sinàptiques i estructurals

<sup>c</sup>Aneuploïdia conservativa estimada com 2xhiperploïdia

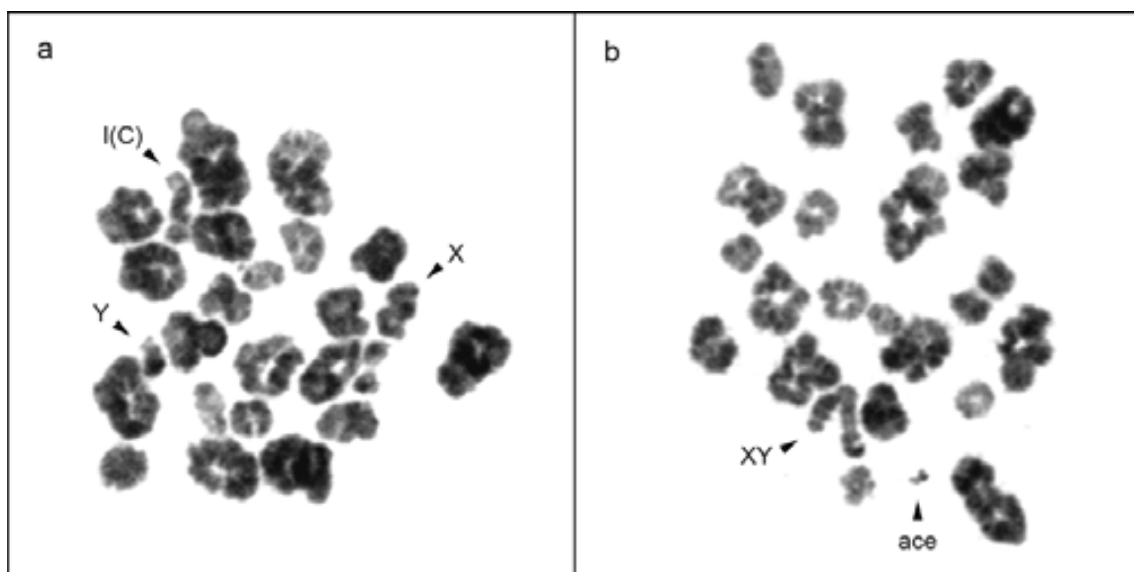


**Figura 11.** Espermatòcits normals tenyits amb DAPI. (a) Metafase I 23,XY (b) Metafase II 23,X o 23,Y. A la imatge es pot observar la dificultat d'anàlisi de les metafases II amb aquesta tècnica



**Figura 12.** Espermatòcits I amb anomalies sinàptiques tenyits amb DAPI. (a) Metafase I amb els cromosomes sexuals dissociats. (b) Metafase I mostrant dos univalents (I), probablement del grup G

La hiperploïdia (0,4%) (Figura 13a) mostrava una correlació positiva amb l'edat ( $r=0,652$ ;  $P=0,005$ ). Cap dels espermatòcits I analitzats era diploide. Les anomalies estructurals (3,3%) eren principalment fragments acèntrics (Figura 13b) i trencaments cromosòmics. Es van trobar variacions interindividuals per la freqüència total d'anomalies meiótiques ( $P<0,001$ ) i per cromosomes sexuals dissociats ( $P<0,001$ ). No hi havia diferències significatives entre els grups de fumadors i no fumadors.



**Figura 13.** Espermatòcits I amb anomalies estructurals tenyits amb DAPI. (a) Metafase I amb els cromosomes sexuals dissociats i un univalent extra del grup C (b) Metafase I amb un fragment acèntric

#### *Freqüència de quiasmes*

En cada donant fèrtil es va realitzar el recompte de quiasmes en 15 espermatòcits I ben extesos i amb cariotip normal (23,XY) (Taula 3). La mitjana de quiasmes per cèl·lula en els individus fèrtils era  $50,3 \pm 3,3$ . Es van trobar diferències interindividuals ( $P<0,001$ ) en la freqüència de quiasmes.

### Anomalies meiòtiques analitzades amb cenM-FISH

Es va posar a punt la tècnica de cenM-FISH en extensions d'espermatòcits de dos individus fèrtils prèviament estudiats amb DAPI (casos 1 i 2). Tot i que els centròmers dels cromosomes 13 i 21 presenten la mateixa combinació de colors, aquests dos cromosomes es van poder diferenciar per la seva grandària. Es van analitzar les anomalies meiòtiques en un total de 168 espermatòcits I i 66 espermatòcits II (veure Taula 3). Els cariotips dels espermatòcits amb anomalies es mostren a la Taula 5.

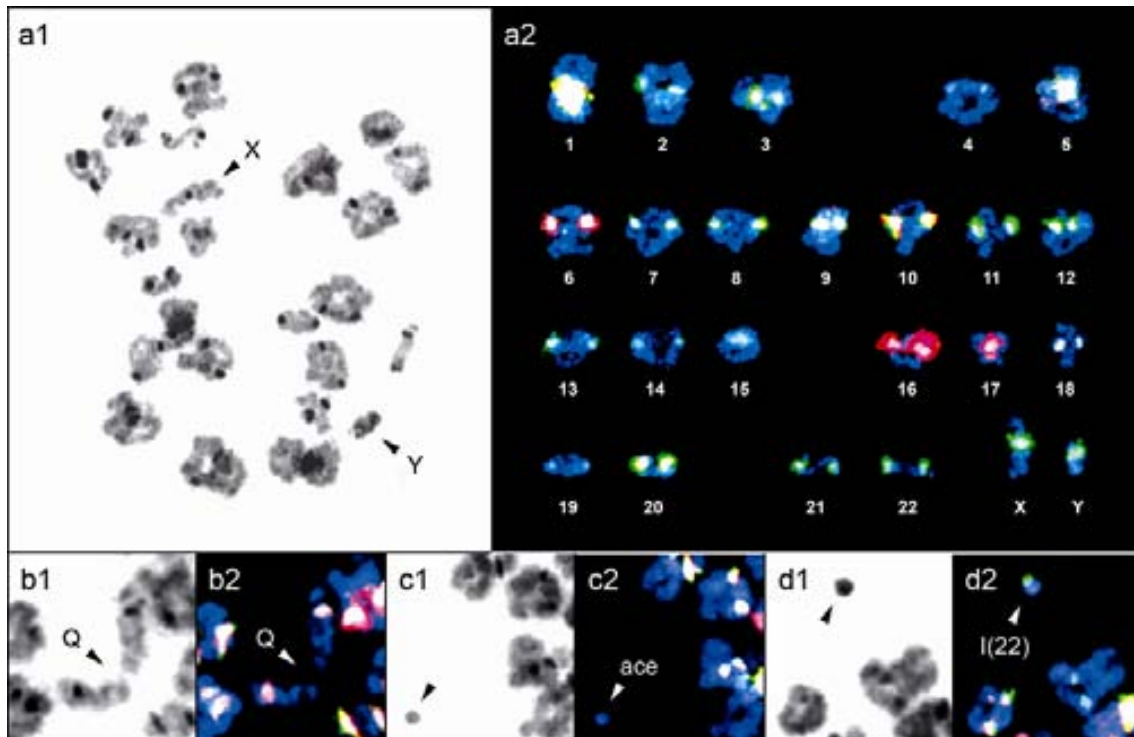
**Taula 5.** Cariotips amb anomalies meiòtiques detectats en 168 espermatòcits I i 66 espermatòcits II de dos individus fèrtils analitzats amb la tècnica de cenM-FISH

Metafase I		Metafase II	
	Nº Anom. (%)		Nº Anom. (%)
<b>Anomalies sinàptiques</b>	<b>29 (17,3)</b>	<b>Separació de cromàtides</b>	<b>0 (0,0)</b>
<i>Cromosomes sexuals</i>	28 (16,7)		
24,X,Y (28 cèl·lules)			
<i>Autosomes</i>	1 (0,6)		
20,XY,-II(3),-II(14),-II(22),II(9,9)(xma=1)(qter)			
<b>Anomalies numèriques</b>	<b>4 (2,4)</b>	<b>Anomalies numèriques</b>	<b>0 (0,0)</b>
<i>Diploïdia</i>	0 (0,0)	<i>Diploïdia</i>	0 (0,0)
<i>Hiperploïdia</i>	2 (1,2)	<i>Hiperploïdia</i>	0 (0,0)
24,XY,+I(22)		<i>Aneuploïdia<sup>a</sup></i>	0 (0,0)
24,XY,+I(Y)			
<i>Aneuploïdia<sup>a</sup></i>	4 (2,4)		
<b>Anomalies estructurals</b>	<b>6 (3,6)</b>	<b>Anomalies estructurals</b>	<b>2 (3,0)</b>
23,XY,+ace (5 cèl·lules)		23,Y,+ace	2 (3,0)
24,XY,+der(12)			
<b>Total anomalies MI</b>	<b>39 (23,2)</b>	<b>Total anomalies MII</b>	<b>2 (3,0)</b>

<sup>a</sup>Aneuploïdia conservativa estimada com 2xhiperploïdia

El percentatge total d'anomalies meiòtiques era de 23,2% i 3,0% a espermatòcits I i II, respectivament. Les anomalies meiòtiques més freqüents eren errors sinàptics (17,3%) (Figura 14a i 15b), sent majoritàriament cromosomes sexuals dissociats (16,7%). La

freqüència d'anomalies estructurals era 3,6% a MI i 3,0% a MII, principalment fragments acèntrics (Figura 14c). Només dos espermatòcits I (1,2%) presentaven hiperploïdia (Figura 14d) i cap dels espermatòcits era diploide.



**Figura 14.** Espermatòcits I mostrant anomalies cromosòmiques meiotiques amb la tècnica de cenM-FISH (a) Metafase I amb cromosomes sexuals dissociats i el seu cariotip. Metafases I parcials amb b) un bivalent 9 desinàptic, c) un fragment acèntric i d) un univalent 22 extra. 1) Contratació amb DAPI, 2) Imatge de cenM-FISH

### Anomalies meiotiques analitzades amb M-FISH

Es va aplicar la tècnica de M-FISH en les extensions, prèviament analitzades amb DAPI, de tres dels individus fèrtils (donants 8, 13 i 16), seleccionats en base al nombre i qualitat de les seves cèl·lules meiotiques. S'han analitzat un total de 565 espermatòcits: 317 a metafase I (Figura 15a) i 248 a metafase II (Figura 15b). La freqüència d'anomalies cromosòmiques meiotiques per cada individu es mostren a la Taula 3 i els cariotips dels espermatòcits amb anomalies meiotiques a la Taula 6.

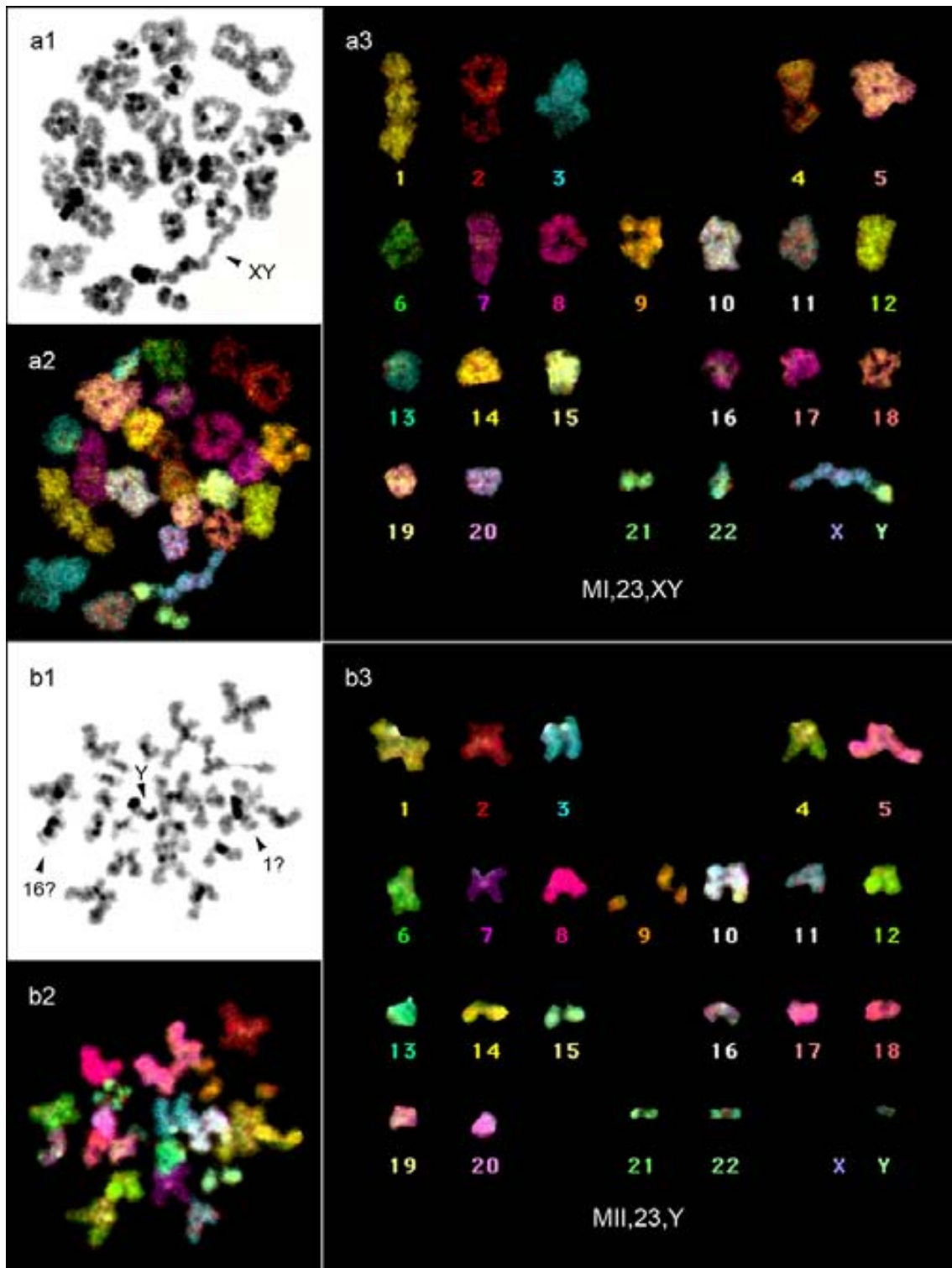
### 3. Resultats

**Taula 6.** Cariotips amb anomalies meiòtiques detectades en 317 espermatòcits I i 248 espermatòcits II de tres individus fèrtils amb la tècnica de M-FISH<sup>a</sup>

Metafase I		Metafase II	
	Nº Anom. (%)		Nº Anom. (%)
<b>Anomalies sinàptiques</b>	<b>88 (27,8)</b>	<b>Separació de cromàtides</b>	<b>17 (6,9)</b>
<i>Cromosomes sexuals</i>	80 (25,2)	22,-X,+Xcht	
24,X,Y (75 cèl·lules)		23,-X,+Xcht,+Xcht,+21	
24,X,Y,+ace(1)		21,+Xcht,-Y,+Ycht,+Ycht,-14,+14cht,+14cht	
24,X,Y,+ace(22)		22,X,-1,+1cht,+1cht	
25,X,Y,+der(7)		22,Y,-2,+2cht,+2cht	
23,X,Y,-II(6),+ace(10),-II(21),+I(21)		22,X,-3,+3cht,+3cht	
24,X,Y,-II(21),+I(21)		22,X,-3,+3cht	
<i>Autosomes</i>	8 (2,5)	22,X,-6,+6cht,+6cht	
23,XY,II(7,7)(xma=1)		20,X,-6,+6cht,+6cht,-7,+7cht,+7cht,-13,+13cht,+13cht	
23,XY,II(8,8)(xma=1)		22,Y,-7,+7cht,+7cht	
23,XY,-II(10),+I(10)		22,Y,chtb(7),-8,+8cht,+8cht,chtb(8)	
23,XY,chr(3),-II(13),+I(13),+I(13)		22,Y,-13,+13cht,+13cht	
23,XY,-II(21),+I(21)		22,Y,-22,+22cht	
23,X,Y,-II(6),+ace(10),-II(21),+I(21)		22,Y,+ace(7),-22,+22cht,+22cht	
24,X,Y,-II(21),+I(21)			
24,XY,-II(22),+I(22),+I(22)			
<b>Anomalies numèriques</b>	<b>8 (2,5)</b>	<b>Anomalies numèriques</b>	<b>36 (14,5)</b>
<i>Diploïdia</i>	0 (0,0)	<i>Diploïdia</i>	2 (0,8)
<i>Hiperploïdia</i>	4 (1,3)	46,XY (2 cèl·lules)	
24,X,II(Y)		<i>Hiperploïdia<sup>d</sup></i>	17 (6,9)
23,XY,-II(4),+?I(8)		24,XY (3 cèl·lules)	
24,XY,+?I(19)		24,XY,-6,+7,-11,+12	
24,XY,+I(22)		24,XY,chtb(X)(q?)	
<i>Aneuploïdia<sup>b</sup></i>	8 (2,5)	23,-X or -Y,+9	
		23,X,+Xcht	
		23,Y,+Xcht	
		21,+Xcht,-Y,+Ycht,+Ycht,-14,+14cht,+14cht	
		23,X,+4cht	
		23,Y,+15cht	
		23,X,+16cht	
		23,X,+21cht	
		23,Y,+21cht	
		23,-X,+Xcht,+Xcht,+21	
		<i>Aneuploïdia<sup>b</sup></i>	34 (13,7)
<b>Anomalies estructurals</b>	<b>12 (3,8)</b>	<b>Anomalies estructurals</b>	<b>15 (6,0)</b>
24,X,Y,+ace(1)		23,X,+ace(1)	
23,XY,+ace(4)		22,Y,-4,+ace(4)	
23,XY,+ace(6)		23,X,+ace(5)	
23,XY,+ace(10)		23,Y,+ace(6)	
22,XY,+ace(10),-II(14)		22,Y,+ace(7),-22,+22cht,+22cht	
23,X,Y,-II(6),+ace(10),-II(21),+I(21)		24,XY,chtb(X)(q?)	
23,XY,+ace(16)		23,X,chr(1)	
24,X,Y,+ace(22)		23,Y,2chr(1)	
23,XY,chr(3),-II(13),+I(13),+I(13)		22,Y,chtb(7),-8,+8cht,+8cht,chtb(8)	
23,XY,chr(7)		23,Y,chtb(11)	
25,X,Y,+der(7)		23,Y,chtb(13)(q?)	
24,XY,+mar		23,X,del(8)(q?)	
		24,Y,+der(?14)	
<b>Total anomalies MI</b>	<b>108 (34,1)</b>	<b>Total anomalies MII</b>	<b>68 (27,4)</b>

<sup>a</sup>Espermatòcits amb més d'una anomalia meiòtica estan llistats en cadascuna de les categories

<sup>b</sup>Aneuploïdia conservativa estimada com 2xhiperploïdia



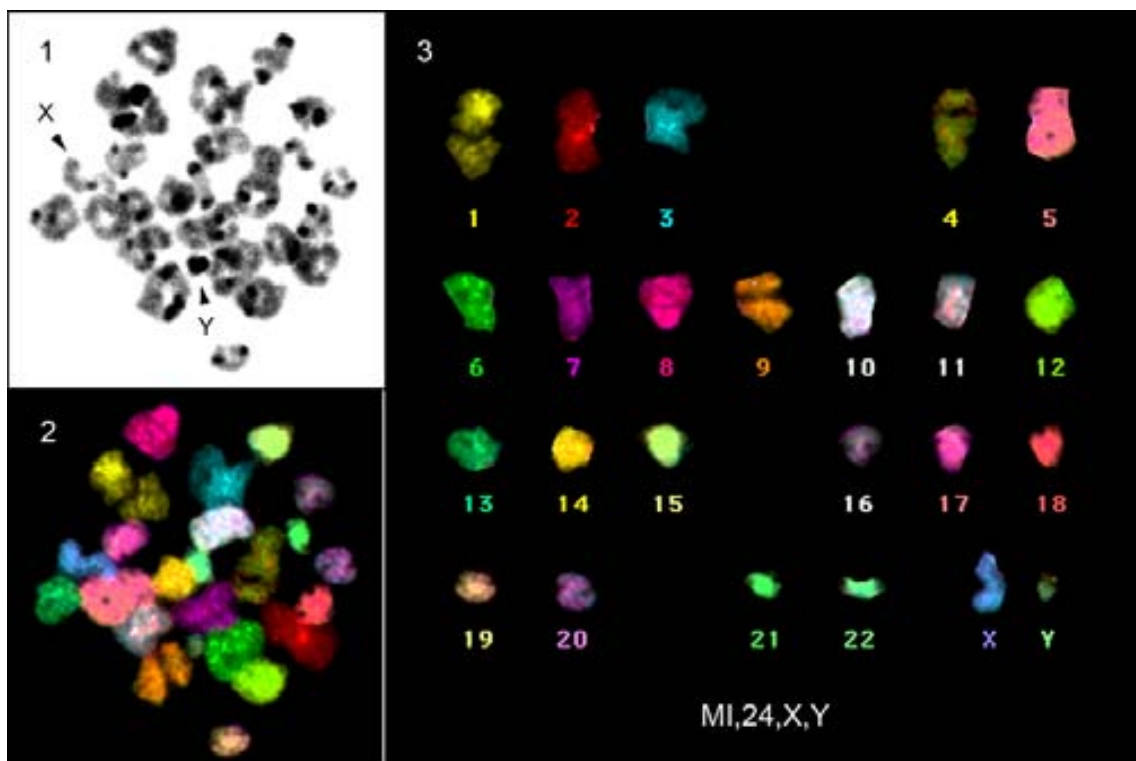
**Figura 15.** Espermatòcits normals analitzats amb la tècnica de M-FISH. (a) Metafase I 23,XY. (b) Metafase II 23,Y. Les fletxes assenyalen els cromosomes que poden identificar-se. 1) Metafase contratenyida amb DAPI, amb els centròmers marcats. 2) Metafase amb M-FISH. 3) Cariotip amb M-FISH

### 3. Resultats

La freqüència d'anomalies meiòtiques a MI detectades amb M-FISH era superior ( $P=0,010$ ) a la observada amb tinció amb DAPI. La freqüència d'hiperploïdia a metafase I era superior ( $P<0,001$ ) a la detectada a metafase II.

#### *Anomalies meiòtiques a metafase I*

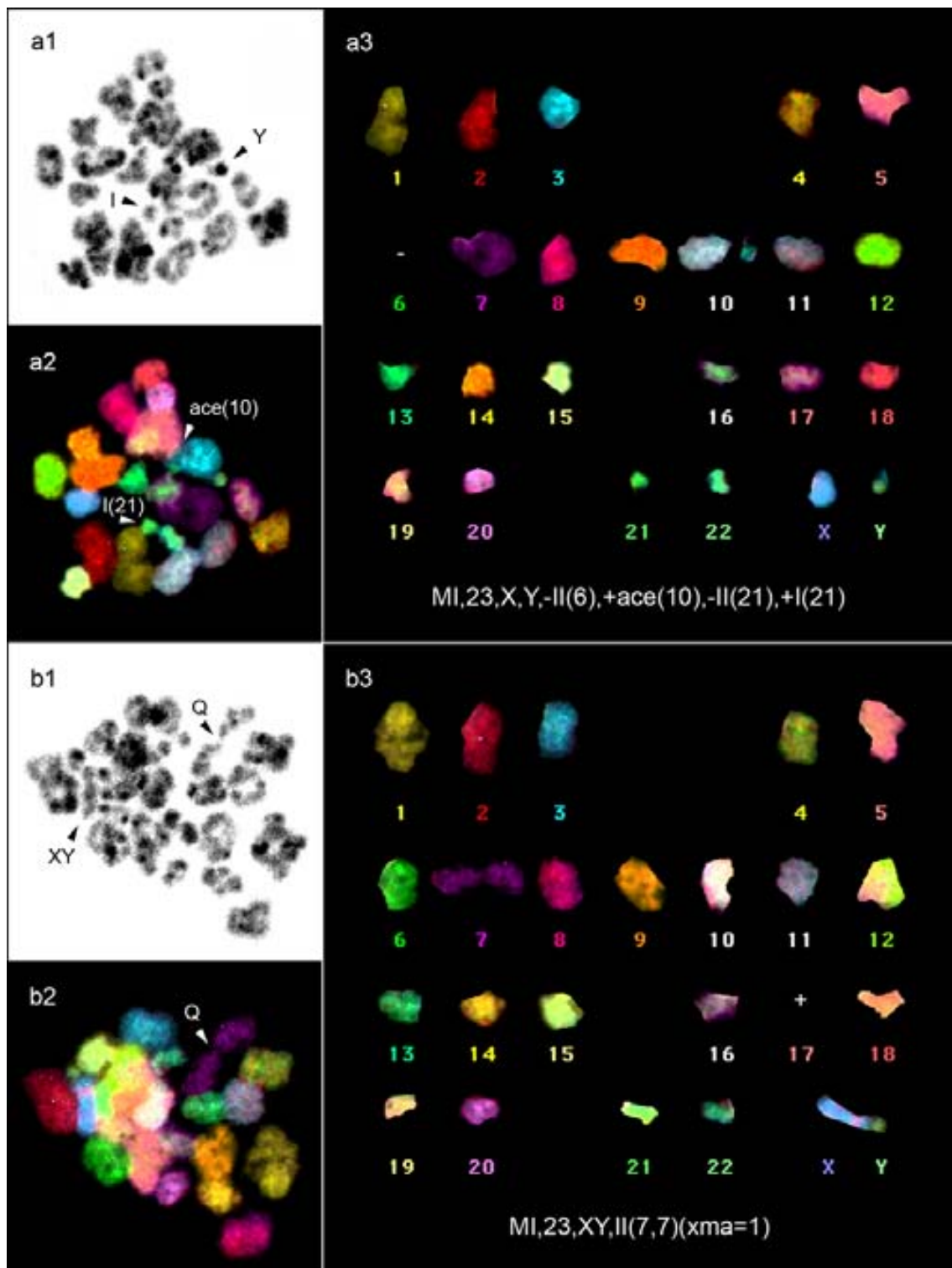
La freqüència total d'anomalies meiòtiques a metafase I era de 34,1%. Les anomalies sinàptiques observades eren cromosomes sexuals dissociats (25,2%) (Figura 16), univalents autosòmics (1,9%) (Figura 17a) i bivalents desinàptics (0,6%) (Figura 17b).



**Figura 16.** Espermatòcit a metafase I amb la tècnica de M-FISH, mostrant els cromosomes sexuals dissociats. 1) Metafase contratenyida amb DAPI. 2) Metafase amb M-FISH. 3) Cariotip amb M-FISH

Els quatre espermatòcits hiperploïdes (1,3%) presentaven un univalent 18, 19, 22 i Y extra. Cap de les metafases I era diploide. La freqüència d'anomalies estructurals era 3,8%, sent sobretot fragments acèntrics (veure Figura 17a).

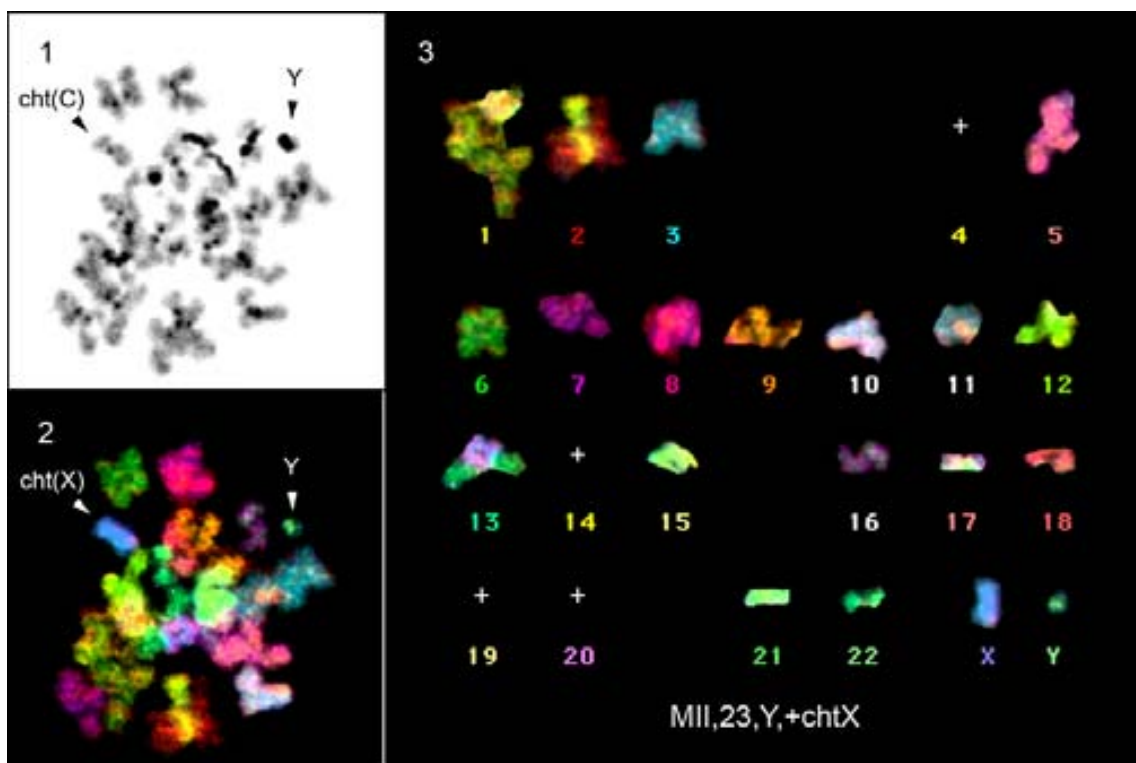




**Figura 17.** Espermatòcits I amb anomalies cromosòmiques meiotiques analitzats amb la tècnica de M-FISH. (a) Metafase I amb els cromosomes sexuals dissociats, un fragment acèntric del cromosoma 10 i un univalent 21. (b) Metafase I amb un bivalent 7 desinàptic. 1) Metafase contratenyida amb DAPI. 2) Metafase amb M-FISH. 3) Cariotip amb M-FISH

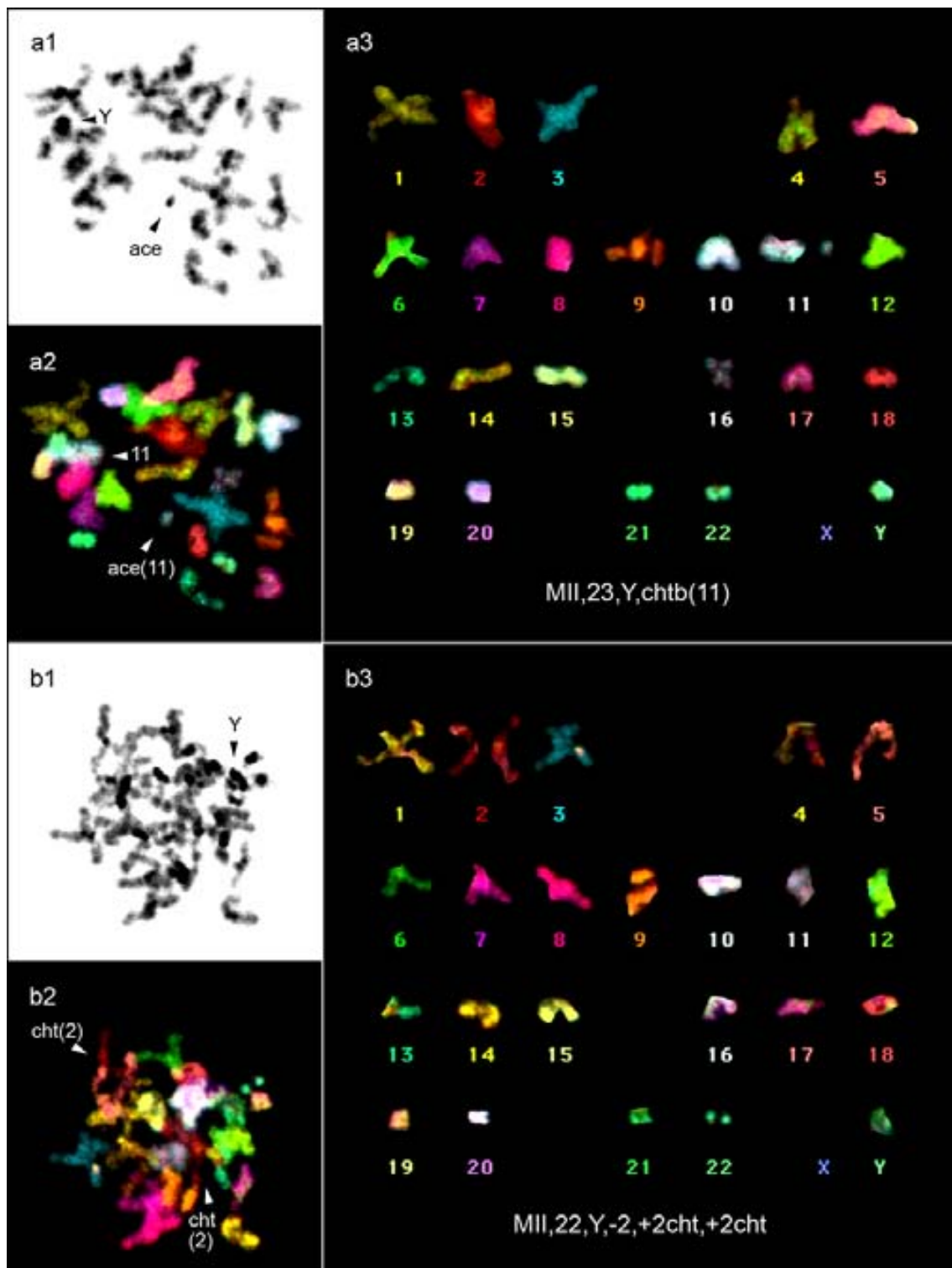
*Anomalies meiòtiques a metafase II*

La freqüència total d'anomalies meiòtiques a metafase II era de 27,4%. La relació entre espermatòcits II portadors del cromosoma X (49,6%) i portadors del cromosoma Y (50,4%) no era significativament diferent de la proporció esperada 1:1. La hiperploïdia (6,9%) consistia en un cromosoma (3,6%) o una cromàtide extra (3,2%) (Figura 18). El 0,8% dels espermatòcits II eren diploides.



**Figura 18.** Espermatòcit a metafase II analitzat amb la tècnica de M-FISH, presentant una cromàtide X extra. 1) Metafase contratenyida amb DAPI. 2) Metafase amb M-FISH. 3) Cariotip amb M-FISH

Les anomalies estructurals a metafase II (6,0%) eren majoritàriament trencaments cromosòmics (Figura 19a) i fragments acèntrics. La freqüència de separació precoç de cromàtides a metafase II era del 6,9% (Figura 19b). Tant la hiperploïdia com les anomalies estructurals presentaven diferències interindividuais ( $P=0,020$  i  $P=0,044$ , respectivament).



**Figura 19.** Espermatòcits II amb anomalies cromosòmiques meiotiques analitzats amb la tècnica de M-FISH. (a) Metafase II amb un trencament de cromàtide al cromosoma 11. (b) Metafase II amb un cromosoma 2 presentant les cromàtides separades. 1) Metafase contratenyida amb DAPI. 2) Metafase amb M-FISH. 3) Cariotip amb M-FISH

### 3.2. Estudi meiótic en un individu infèril

#### Anomalies meiótiques analitzades amb M-FISH

Es van estudiar un total de 262 espermatòcits amb la tècnica de M-FISH a tres estadis meiótics: 69 a paquitè, 106 a metafase I i 87 a metafase II. La Taula 3 mostra les freqüències d'anomalies meiótiques trobades a metafase, mentre que els cariotips dels espermatòcits I i II amb anomalies meiótiques estan llistats a la Taula 7.

##### *Espermatòcits a paquitè*

Els 69 espermatòcits analitzats a l'estadi de paquitè presentaven els cromosomes sexuals condensats i un aparellament aparentment normal, tot i que la tècnica utilitzada no permet determinar si hi havia hagut recombinació meiótica en el parell XY.

##### *Espermatòcits a metafase I*

La freqüència total d'anomalies meiótiques a espermatòcit I era de 66,0%. Les anomalies sinàptiques (56,6%) eren cromosomes sexuals dissociats (48,1%) (Figura 20a), autosomes del grup C desinàptics (7,5%), i univalents autosòmics (0,9%) (veure Taula 7). No es va observar cap metafase I amb anomalies numèriques. Les anomalies estructurals (7,5%) eren principalment trencaments cromosòmics, seguit de delecions i fragments acèntrics (Figura 20a). La freqüència total d'anomalies meiótiques era superior ( $P < 0,001$ ) a la descrita en individus fèrtils amb la tècnica de M-FISH degut a una major freqüència de cromosomes sexuals dissociats ( $P < 0,001$ ), anomalies sinàptiques en autosomes ( $P < 0,05$ ) i anomalies estructurals ( $P < 0,05$ ).

##### *Espermatòcits a metafase II*

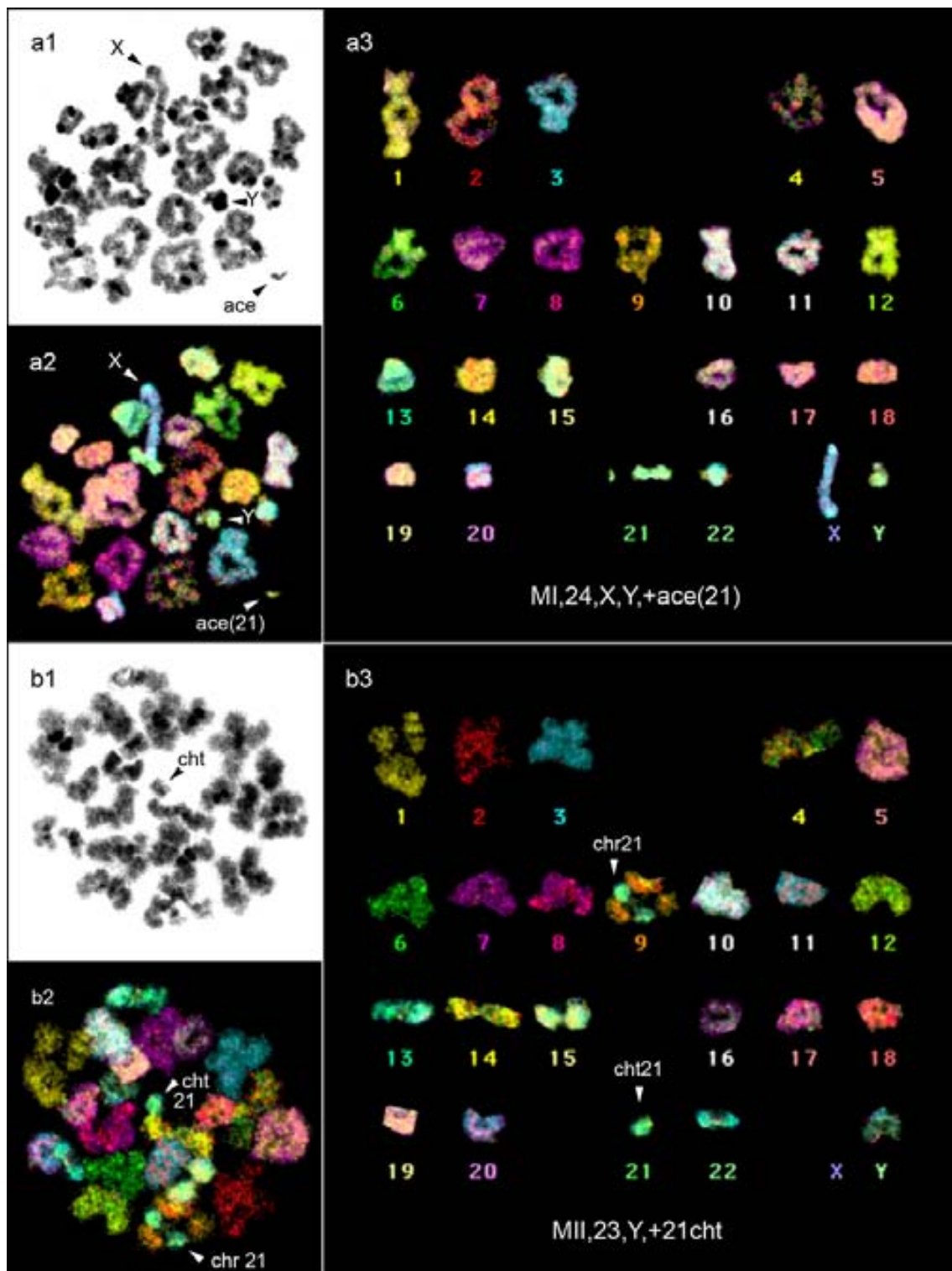
El percentatge total d'anomalies cromosòmiques a espermatòcit II era de 27,6%. La hiperploïdia afectava el cromosoma 21 i cromosomes sexuals, tant en forma de cromàtide extra (3,4%) (Figura 20b) o de cromosoma extra (3,4%). Un 8,0% de les metafases II eren diploides, amb una dotació cromosòmica 46,XY. Les anomalies estructurals observades (4,6%) eren fragments acèntrics, trencaments cromosòmics i delecions. Una metafase (1,1%) presentava cromàtides separades pel cromosoma 21. La freqüència de diploïdia a MII era significativament superior a la descrita en individus fèrtils amb la tècnica de M-FISH ( $P = 0,002$ ).

**Taula 7.** Anomalies meiòtiques detectades en 106 espermatòcits I i 87 espermatòcits II d'un individu infèrtil amb la tècnica de M-FISH<sup>a</sup>

<b>Metafase I</b>		<b>Metafase II</b>	
	<b>Nº anom. (%)</b>		<b>Nº anom. (%)</b>
<b>Anomalies sinàptiques</b>	<b>60 (56,6)</b>	<b>Separació de cromàtides</b>	<b>1 (1,1)</b>
<i>Cromosomes sexuals</i>	51 (48,1)	23,XY,-21,+21cht	
24,X,Y (44 cèl·lules)			
24,X,Y,+ace(21)			
24,X,Y,chr(10)(q12~21),-II(18),+I(18)			
24,X,Y,del(10)(q12~21), chr(20)			
24,X,Y,II(8,8)(xma=1)			
24,X,Y,II(10,10)(xma=1)			
24,X,Y,II(11,11)(xma=1)			
24,X,Y,II(12,12)(xma=1)			
<i>Autosomes</i>	9 (8,5)		
23,XY,II(6,6)(xma=1)			
23,XY,II(8,8)(xma=1)			
24,X,Y,II(8,8)(xma=1)			
23,XY,II(9,9)(xma=1)			
24,X,Y,II(10,10)(xma=1)			
23,XY,II(11,11)(xma=1)			
24,X,Y,II(11,11)(xma=1)			
24,X,Y,II(12,12)(xma=1)			
24,X,Y,chr(10)(q12~21),-II(18),+I(18)			
<b>Anomalies numèriques</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>Anomalies numèriques</b>	<b>19 (21,8)</b>
<i>Diploïdia</i>	0 (0,0)	<i>Diploïdia</i>	7 (8,0)
<i>Hiperploïdia</i>	0 (0,0)	46,XY (7 cèl·lules)	
<i>Aneuploïdia<sup>b</sup></i>	0 (0,0)	<i>Hiperploïdia</i>	6 (6,9)
		24,XY (2 cèl·lules)	
		23,XY,-21,+21cht	
		23,Y,+Xcht	
		23,X,+Ycht	
		23,Y,+21cht	
		<i>Aneuploïdia<sup>b</sup></i>	12 (13,8)
<b>Anomalies estructurals</b>	<b>10 (9,4)</b>	<b>Anomalies estructurals</b>	<b>4 (4,6)</b>
24,X,Y,+ace(21)		MII,23,Y,+ace(5)	
23,XY,chr(1)(q) (3 cèl·lules)		MII,23,Y,+ace(17)	
23,XY,chr(7)(p),+ace(14)		MII,23,X,cht(4)(q)	
24,X,Y,chr(10)(q12~21),-II(18),+I(18)		MII,22,Y,del(14)(q),-19	
23,XY,chr(15)(q11)			
24,X,Y,del(10)(q12~21), chr(20)			
<b>Total anomalies MI</b>	<b>70 (66,0)</b>	<b>Total anomalies MII</b>	<b>24 (27,6)</b>

<sup>a</sup>Espermatòcits amb més d'una anomalia meiòtica estan llistats en cadascuna de les categories

<sup>b</sup>Aneuploïdia conservativa estimada com 2xhiperploïdia



**Figura 20.** Espermatòcits I amb anomalies cromosòmiques meiotiques analitzats amb la tècnica de M-FISH. (a) Metafase I amb els cromosomes sexuals dissociats i un fragment acèntric del cromosoma 21. (b) Metafase I amb una cromàtide extra del cromosoma 21. 1) Metafase contratenyida amb DAPI. 2) Metafase amb M-FISH. 3) Cariotip amb M-FISH

### Freqüència de quiasmes per cromosoma

El recompte de quiasmes es va dur a terme en 30 espermatòcits I ben extesos: 15 d'ells amb un bivalent sexual normal (23,XY) i 15 amb els cromosomes sexuals dissociats (24,X,Y) (Taula 8). La mitjana de quiasmes per espermatòcit ( $51,3 \pm 3,5$ ) era significativament inferior en metafases I amb el parell XY dissociat ( $49,0 \pm 3,3$ ) que en metafases I normals ( $53,7 \pm 1,8$ ) ( $P < 0,0001$ ). Aquest descens del nombre de quiasmes era generalitzat en tots els cromosomes, sent estadísticament significatiu només pels cromosomes 4 ( $P=0,02$ ), 9 ( $P=0,03$ ), 10 ( $P=0,02$ ) i 12 ( $P=0,04$ ).

**Taula 8.** Mitjana de quiasmes en metafases I normals (23,XY) i amb el parell XY dissociat (24,X,Y)

Bivalents	Mitjana de quiasmes			Valor de $P^a$
	23,XY	24,X,Y	Total	
1	4,2	3,9	4,1	
2	3,7	3,7	3,7	
3	3,5	3,3	3,4	
4	3,1	2,7	2,9	0,02
5	2,9	2,7	2,8	
6	2,6	2,3	2,5	
7	2,7	2,5	2,6	
8	2,5	2,2	2,4	
9	2,4	2,1	2,2	0,03
10	2,9	2,4	2,6	0,02
11	2,5	2,3	2,4	
12	2,9	2,5	2,7	0,04
13	1,9	1,9	1,9	
14	1,7	1,6	1,6	
15	1,7	1,7	1,7	
16	1,9	1,8	1,9	
17	1,9	1,7	1,8	
18	1,9	1,8	1,9	
19	1,9	1,9	1,9	
20	1,8	1,8	1,8	
21	1,1	1,1	1,1	
22	1,0	1,1	1,0	
XY	1,1	0,0	0,5	<0,0001
<b>TOTAL</b>	<b>53,7</b>	<b>49,0</b>	<b>51,3</b>	<b>&lt;0,0001</b>

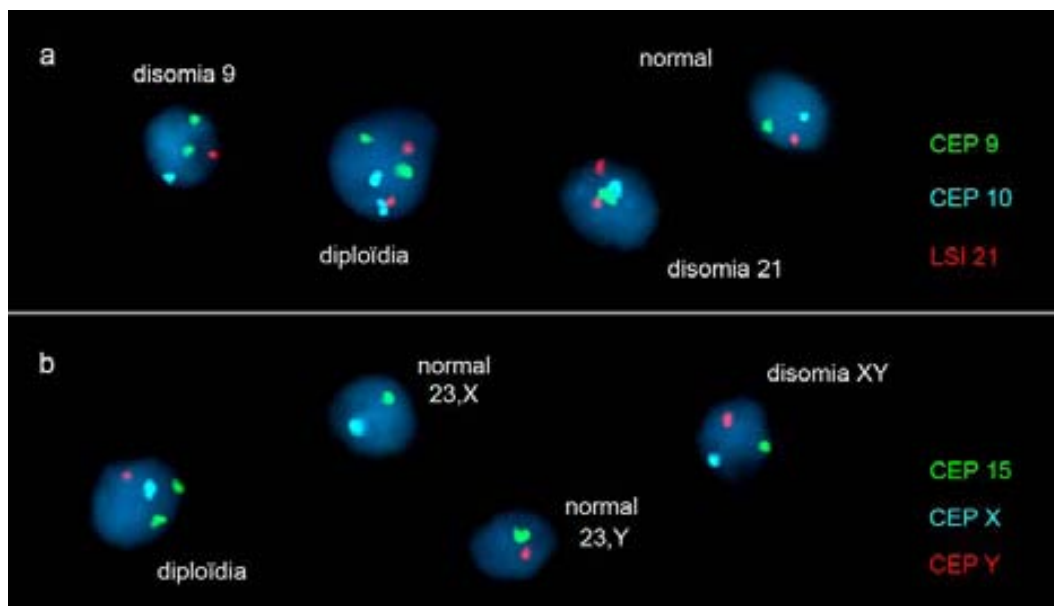
<sup>a</sup>Diferències significatives en la mitjana de quiasmes entre espermatòcits 23,XY i 24,X,Y

### Anomalies numèriques en caps d'espermatozoide

Es van analitzar les anomalies numèriques en 20.193 nuclis descondensats d'espermatozoide amb la tècnica de FISH amb sondes en dues hibridacions independents (cromosomes 9, 10 i 21, i cromosomes 15, X i Y) (Figura 21). Les freqüències de disomia XY i diploïdia a espermatozoide eren significativament inferiors ( $P < 0,0001$ ) a les obtingudes a metafase II (Taula 9).

**Taula 9.** Anomalies cromosòmiques numèriques detectades a espermatòcit II i a espermatozoide

	% Disomia						% Diploïdia		
	9	10	15	21	XY	XX	YY	46,XY	46,XX/YY
<b>Espermatòcit II</b>	0,0	0,0	0,0	1,1	5,7	-	-	8,0	-
<b>Espermatozoide</b>	0,05	0,02	0,15	0,56	0,86	0,07	0,07	0,76	0,02



**Figura 21.** Caps descondensats d'espermatozoides hibridats amb la tècnica de FISH amb sondes pels cromosomes 9, 10 i 21 (a) i 15, X i Y (b)



## ***4. Discussió***



En aquest treball s'ha determinat la freqüència basal d'anomalies meiòtiques en espermatòcits d'individus fèrtils i s'ha analitzat els mecanismes que les originen amb la tècnica de M-FISH en tres d'aquests individus. S'ha posat a punt la tècnica de cenM-FISH en metafases d'espermatòcit per l'estudi d'anomalies cromosòmiques meiòtiques. A més, l'anàlisi de la meiosi en un pacient amb infertilitat de possible origen meiòtic ha permès aprofundir en els mecanismes de no disjunció a la meiosi masculina. Pel nostre coneixement, aquest treball estableix per primera vegada les freqüències d'anomalies meiòtiques en espermatòcits en una sèrie d'individus fèrtils i descriu els mecanismes que les originen.

#### **4.1. Valoració de les tècniques d'anàlisi meiòtica**

La tinció amb DAPI no marca bandes en cromosomes meiòtics, a diferència dels cromosomes somàtics, i per tant dona una informació molt similar a l'obtinguda amb tinció uniforme en estudis citogenètics clàssics. L'avantatge principal d'aquesta tècnica és que possibilita la detecció d'anomalies meiòtiques i el recompte de quiasmes de manera senzilla, amb l'únic requeriment d'un microscopi d'epifluorescència per a l'observació. En contrast, la contratinció amb DAPI de metafases, prèviament hibridades, marca els centròmers i zones d'heterocromatina constitutiva més fosques, facilitant així la diferenciació dels braços p i q en la majoria de cromosomes.

Les tècniques d'hibridació *in situ* aplicades a espermatòcits en aquest treball, cenM-FISH i M-FISH, permeten la identificació simultània de tots els cromosomes i milloren la caracterització de les anomalies cromosòmiques. No obstant, aquestes tècniques de FISH són de cost elevat i molt laborioses, especialment degut a que la captura d'imatges s'ha de realitzar per separat per a cadascun dels 5 fluorocroms. A més, l'estudi de cada metafase requereix l'anàlisi al microscopi de la imatge de la contratinció amb DAPI per detectar les anomalies i, posteriorment, de la imatge de FISH per realitzar la identificació cromosòmica.

Amb la tècnica de cenM-FISH, la identificació de tots els cromosomes és possible gràcies a la hibridació dels centròmer amb una combinació de fluorocroms específica per a cada cromosoma. Els cromosomes 13 i 21, amb seqüències  $\alpha$ -satèl·lit gairebé idèntiques, no poden ser identificats amb aquesta tècnica (Nietzel i col, 2001), però són fàcilment diferenciables per la seva grandària. L'aplicació de la tècnica de cenM-

FISH a metafases d'espermatòcit s'ha descrit per primer cop a en el present treball, donat que solament havia estat aplicada a espermatòcits a paquitè (Oliver-Bonet i col, 2003) i a oòcits a metafase II (Gutiérrez-Mateo i col, 2005). Al marcar solament les zones centromèriques, aquesta tècnica és útil en la identificació dels cromosomes implicats en anomalies sinàptiques i numèriques, però no permet la detecció de reorganitzacions intracromosòmiques ni intercromosòmiques. La cenM-FISH és especialment valuosa per la diferenciació entre fragments acèntrics i centrals, ja que tot i que teòricament la contratació amb DAPI marca els centròmers dels cromosomes, a la pràctica és difícil assegurar si un fragment cromosòmic conté centròmer o no. El nostre objectiu per l'aplicació de la cenM-FISH a cromosomes meiótics era millorar la morfologia cromosòmica obtinguda amb la tècnica de M-FISH, amb la que els cromosomes s'inflen, dificultant la seva anàlisi (Márquez i col, 1998; Sandalinas i col, 2002). Tanmateix, les imatges de la contratació amb DAPI de les tècniques de cenM-FISH i M-FISH són similars, pel que vam decidir seguir l'estudi amb la tècnica de M-FISH.

La tècnica de M-FISH marca els 24 cromosomes del cariotip humà amb una combinació específica de 5 fluorocroms, utilitzant llibreries de DNA específiques per a cada cromosoma. Aquesta tècnica és molt eficient a l'hora d'augmentar el nombre d'espermatòcits analitzables, sobretot en metafases amb cromosomes superposats, i especialment a metafase II, on la individualització cromosòmica és difícil. L'estudi de metafases meiótiques amb M-FISH ha permès la caracterització d'anomalies cromosòmiques en espermatòcits II no descrites amb tinció uniforme, com són cromàtides extres i cromàtides separades (veure apartat 4.4). Aquestes anomalies meiótiques no s'han observat abans a l'espermatogènesi degut, probablement, al baix nombre d'espermatòcits II estudiats i a les dificultats de l'anàlisi amb tinció uniforme.

Les anomalies sinàptiques i numèriques són fàcilment identificables amb la tècnica de M-FISH. Encara que aquesta tècnica no detecta reorganitzacions intracromosòmiques (delecions, duplicacions, inversions, etc), facilita la caracterització de reorganitzacions intercromosòmiques (translocacions i insercions) i una millor diferenciació entre trencaments cromosòmics (delecions més fragments pel mateix cromosoma) i fragments extres. Donat que la majoria d'anomalies estructurals trobades en espermatòcits (present treball) i oòcits (Sandalinas i col, 2002) són trencaments cromosòmics i fragments acèntrics, la tècnica de M-FISH és una bona metodologia per

a la caracterització d'anomalies en cèl·lules germinals. Tot i que la M-FISH no és adequada pel diagnòstic meiòtic rutinari, pot ser una molt bona tècnica per la recerca bàsica i apta per a aquells casos clínics que requereixin una anàlisi meiòtica acurada.

## 4.2. Heterogeneïtat en individus fèrtils

Les diferències interindividuals trobades en individus fèrtils són degudes, principalment, a la gran variació en la freqüència de cromosomes sexuals dissociats (3,2% - 43,7%). Aquesta heterogeneïtat també l'hem observada per les freqüències d'hiperploïdia a MII (present treball) i ha estat reportada en espermatozoides d'individus fèrtils per la gran majoria d'autors (revisat per Templado i col, 2005; Tempest i col, 2009). La presència d'un donant (cas 12) amb una elevada freqüència d'anomalies meiòtiques respecte a la resta de casos, demostra l'existència d'individus fèrtils a la població amb una major predisposició a la producció d'espermatozoides disòmics.

El bloqueig meiòtic complet, present en un 18% dels pacients infèrtils i estèrils (revisat per Egozcue i col, 2000), no afecta cap dels individus fèrtils de la nostra sèrie, com era d'esperar. No obstant, tres donants (casos 3, 10 i 14) presenten un baix nombre de metafases I i, en general, poques cèl·lules meiòtiques. No es pot descartar que la hipoespermatogènesi, amb una prevalència alta en individus infèrtils (60% dels pacients, McLachlan i col, 2007), coexisteixi amb una producció espermàtica normal en homes fèrtils.

Els nostres resultats indiquen que els individus fèrtils són una població heterogènia en relació a les anomalies meiòtiques i que nivells elevats d'aquestes anomalies no descarten la possibilitat de que un individu sigui fèrtil, tot i que presentarà un risc augmentat de transmetre-les a la descendència. D'acord amb això, s'han descrit freqüències incrementades de disomia en espermatozoides d'individus fèrtils amb descendència aneuploide (Blanco i col, 1998; Martínez-Pasarell i col, 1999; Eskenazi i col, 2002; Soares 2001a, 2001b).

### 4.3. Freqüència basal d'anomalies meiòtiques en individus fèrtils

En individus fèrtils, la freqüència d'anomalies cromosòmiques meiòtiques a espermatòcit I és d'un 27%. Les anomalies meiòtiques més freqüents són les sinàptiques, tal i com s'ha descrit en sèries d'individus infèrtils i estèrils (Skakkebaek i col, 1973) (Taula 10).

**Taula 10.** Freqüències (%) d'anomalies cromosòmiques meiòtiques en espermatòcits I en individus fèrtils i infèrtils

	Individus fèrtils		Individus infèrtils i estèrils
	Present treball	Altres autors	
<b>Anomalies sinàptiques</b>			
X,Y	22,1*	15,0 <sup>a</sup>	16,5 <sup>b</sup>
Bivalents desinàptics	0,9	0,2 <sup>a</sup>	ND
Univalents autosòmics	0,4	0,6 <sup>a</sup>	0,4 <sup>a</sup>
<b>Hiperploïdia</b>	0,4	0,0 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>
<b>Anomalies estructurals</b>	3,3*	0,0 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>

ND= freqüència mitjana no descrita, entre 0% i 100% segons l'individu (Templado, 1980)

<sup>a</sup>Skakkebaek i col (1973)

<sup>b</sup>Luciani (1970), Skakkebaek i col (1973), Chandley i col (1976), Laurie i Hultén (1985b)

\*Diferències estadísticament significatives ( $P < 0,001$ ) respecte a altres sèries

En la nostra sèrie, el percentatge d'individus amb anomalies meiòtiques és molt superior (52,9%) a l'observat en pacients infèrtils i estèrils (4,3%) (Egozcue i col, 1983). Aquest increment podria ser degut a l'elevat nombre de metafases estudiades per individu en el present treball o a un increment d'anomalies en la població masculina actual (veure apartat 4.5). Malauradament, els nostres resultats no són comparables amb els de en les grans sèries d'individus infèrtils i estèrils (Kjessler, 1966; Hendry i col, 1975; Chandley i col, 1976; Koulischer i col, 1982; Egozcue i col, 1983), ja que la majoria no especifiquen la freqüència d'anomalies per individu.

## Anomalies sinàptiques

Les anomalies sinàptiques trobades en individus fèrtils són majoritàriament la presència d'univalents, tant autosòmics com sexuals, seguit de bivalents desinàptics. La desinapsi de bivalents individuals es va descriure en el nostre grup (Templado i col, 1981) en individus infèrtils amb tècniques de citogenètica clàssica. La presència de bivalents desinàptics en individus fèrtils suggereix que aquesta no és una anomalia específica d'individus infèrtils i estèrils, tot i que en aquests pacients poden arribar a trobar-se en un 100% de les metafases (Templado i col, 1981) (veure Taula 10). Els bivalents desinàptics observats en la nostra sèrie són del grup C, bivalents que freqüentment presenten 2 quiasmes (Laurie i Hultén, 1985a; Sun i col, 2004) i que solament requereixen una reducció generalitzada de quiasmes moderada per presentar un únic quiasma.

La presència dels cromosomes sexuals dissociats és l'anomalia sinàptica més freqüent. En determinats casos s'han descrit freqüències altes de dissociació del parell XY que poden arribar a provocar infertilitat (Chandley i col, 1976), com és el cas del nostre individu infèril (48,1%) o d'un dels individus de la sèrie de fèrtils (43,7%, cas 12). L'anàlisi del nombre de quiasmes en l'individu infèril mostra que els espermatòcits amb cromosomes sexuals dissociats presenten un descens en la mitjana de quiasmes respecte a espermatòcits normals. Aquesta reducció de quiasmes és significativa en quatre bivalents de mida mitjana (4, 9, 10 i 12), tres dels quals coincideixen amb els bivalents desinàptics observats directament a metafase I (bivalents 6, 8, 9, 10, 11 i 12). Els nostres resultats indiquen que, en individus amb infertilitat d'origen meiòtic, part dels espermatòcits I presenten una disminució generalitzada en la freqüència de quiasmes, traduint-se en la presència d'univalents i bivalents desinàptics de mida mitjana i, per tant, un increment en el risc de no disjunció. Aquesta hipòtesi es veu sostinguda per estudis en parets de descendència amb aneuploïdia d'origen patern que descriuen un increment d'espermatozoides disòmics tant pel cromosoma involucrat en l'aneuploïdia com per altres cromosomes (Soares i col, 2001a, 2001b). Alguns autors (Codina-Pascual i col, 2005) han suggerit que la recombinació en el parell XY podria ser un indicador del nivell de recombinació de l'espermatòcit. Recentment, Sarrate i col·laboradors (2009) han proposat que, en pacients infèrtils, l'estudi dels cromosomes 21, X i Y seria suficient per identificar els individus amb una elevada predisposició a aneuploïdies.

La presència d'univalents afectant majoritàriament els cromosomes sexuals i, en menor freqüència, el cromosoma 21, està d'acord amb un estudi meiòtic previ similar al nostre (Skakkebaek i col, 1973) i amb estudis d'espermatozoide que descriuen que aquests cromosomes són els que presenten les freqüències de disomia més altes (revisat per Templado i col, 2005). Precisament, aquests bivalents normalment presenten un únic quiasma (Laurie i Hultén, 1985a; Sun i col, 2004), ja que el cromosoma 21 és el més petit, i els cromosomes sexuals tenen l'aparellament cromosòmic restringit a la regió pseudoautosòmica i, en conseqüència, seran els primers a dissociar-se (Ferguson i col, 1996). Desafortunadament, la tècnica utilitzada per nosaltres no permet diferenciar entre absència de recombinació i la resolució prematura del quiasma, però estudis de recombinació a paquitè en individus amb espermatogènesi normal han demostrat que els bivalents del grup G i sexuals són més susceptibles que la resta d'autosomes a no presentar recombinació (Sun i col, 2006).

### **Anomalies numèriques**

Les anomalies numèriques detectades a MI, majoritàriament univalents extres, presenten freqüències baixes similars a les descrites en sèries d'individus infèrtils i estèrils (0,1%, Skakkebaek i col, 1973) (Taula 10). La freqüència d'anomalies numèriques a MII és 5 vegades superior a la de MI, el que significa que aquestes anomalies s'originen preferentment durant la primera divisió meiòtica, com a conseqüència d'una mala segregació de bivalents amb anomalies sinàptiques. De fet, els cromosomes més freqüentment trobats com a univalents a MI en aquest treball són també els més implicats en hiperploïdia a MII (21, X, Y). Recentment, s'ha demostrat que espermatozoides amb disomia pels cromosomes sexuals presenten també absència de recombinació en aquest parell cromosòmic (Shi i col, 2001).

La freqüència de disomia trobada en espermatoïts II és similar a la descrita en oòcits de dones joves (Sandalinas i col, 2002) i tres vegades superior a la present en espermatozoides d'individus control (revisat per Templado i col, 2005). Aquesta disminució de l'aneuploïdia podria significar l'existència d'un punt de control entre aquests dos estadis que bloquegi específicament les cèl·lules germinals amb anomalies numèriques. Aquest bloqueig podria tenir lloc a l'estadi d'espermàtide (Guichaoua i col, 2005) o a l'estadi d'espermatozoide (Rodrigo i col, 2004), i explicaria



les baixes freqüències de descendència aneuploide d'origen patern (Hassold i col, 2007).

L'individu infèril analitzat presenta un increment d'anomalies sinàptiques i de diploïdia a MII respecte als individus fèrtils del present treball, i també un augment de diploïdia a espermatzoide comparat amb la sèrie d'individus normals descrita pel nostre grup (Bosch i col, 2001). La relació entre errors sinàptics i diploïdia a espermatzoide ja havia estat descrita anteriorment en individus infèrtils (Aran i col, 1999). Egozcue i col·laboradors (2000) van suggerir que la presència de cromosomes erràtics activaria el *checkpoint* de metafase, bloquejant la segregació cromosòmica a anafase I i originant espermatòcits II diploides.

## Anomalies estructurals

El 89% de les anomalies estructurals observades en espermatòcits són trencaments sense reparació del DNA, sent majoritàriament trencaments cromosòmics i fragments acèntrics, com ja havia estat descrit en espermatozoides d'individus normals (Martin i col, 1987; Brandriff i col, 1988; Estop i col, 1995; revisat per Templado i col, 2005). Aquests tipus d'anomalies estructurals poden donar lloc a embrions amb anomalies estructurals o a embrions cromosòmicament normals, si les lesions són reparades en el zigot per la maquinària de reparació de l'oòcit fecundat (revisat per Marchetti i Wyrobek, 2005).

L'increment d'anomalies estructurals entre espermatòcit i espermatzoide d'individus control (6,6%, revisat per Templado i col, 2005) indica que gran part de les anomalies estructurals són causades durant l'espermioènesi, tal i com havien proposat estudis en cariotips d'espermatozoide (Brandriff i col, 1988; Estop i col, 1995), basant-se en que aquest és un estadi amb predisposició a lesions cromosòmiques i amb reparació del DNA deficient. D'altra banda, les anomalies estructurals trobades en espermatòcits s'originarien probablement durant les divisions d'espermatogònia, ja que l'elevat nombre de divisions mitòtiques fa que hi hagi més probabilitat d'ocurrència de DSB.

Tenint en compte que les freqüències d'anomalies estructurals entre oòcits II (Pellestor i col, 2005) i espermatòcits II (present treball) són similars, la producció d'anomalies estructurals durant l'espermioènesi explicaria l'origen predominantment patern de les anomalies estructurals *de novo* (Thomas i col, 2006).

## **Anomalies meiòtiques i edat paterna**

El present treball ha detectat una associació entre l'edat i la freqüència d'hiperploïdia en espermatòcits I d'individus fèrtils que podria indicar, tant una acumulació d'anomalies numèriques per l'augment en el nombre de divisions d'espermatogònies, com una disminució de l'eficiència del *checkpoint* de paquitè que s'activa en espermatòcits amb errors sinàptics (Roeder i Bailis, 2000; Hamer i col, 2008a). L'associació hiperploïdia i edat també s'ha descrit en espermatozoides pels cromosomes 1, 9 i 21 (Martin i col, 1995; Rousseaux i col, 1998; Bosch i col, 2003). Seran necessaris més estudis en sèries d'individus fèrtils, dissenyats específicament, per conèixer l'efecte de l'edat sobre les anomalies cromosòmiques meiòtiques.

### **4.4. Mecanismes de no disjunció meiòtica**

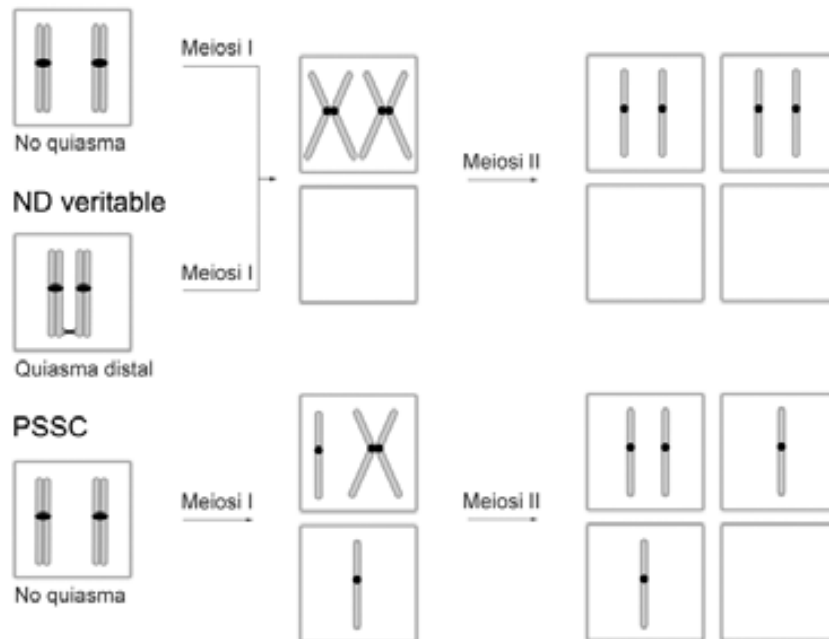
Fins al moment, l'aproximació més utilitzada als mecanismes de no disjunció en la meiosi masculina ha sigut l'estudi indirecte en avortaments o naixements trisòmics d'origen patern. L'anàlisi directe d'espermatòcits a MII amb M-FISH ens ha permès estudiar els mecanismes que originen aneuploïdies en la meiosi I masculina en individus fèrtils (Figura 22) i descriure, per primera vegada, la PSSC durant la meiosi I i la PSSC equilibrada (cromàtides separades a metafase II) a meiosi II, únicament detectades a meiosi femenina (Angell, 1991).

#### **No disjunció a meiosi I**

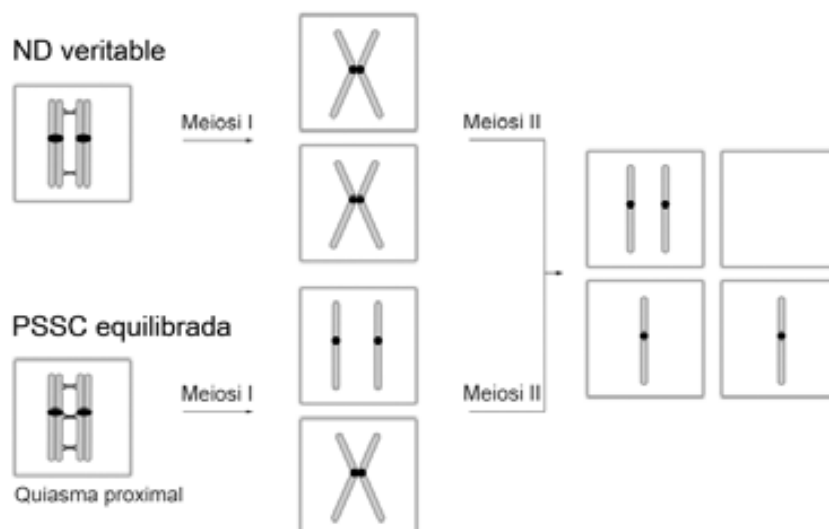
L'alta freqüència de cromosomes dissociats a metafase I fa pensar que el principal mecanisme de producció d'aneuploïdies durant la primera divisió meiòtica és la no disjunció aquiasmàtica. Aquest mecanisme de no disjunció és el responsable de la meitat de les disomies observades a MII, caracteritzades per la presència d'un cromosoma extra (l'altra meitat de disomies tenen una cromàtide extra). Precisament, els cromosomes sexuals són els més involucrats en anomalies sinàptiques i en disomies a MII, indicant que el parell XY és el més afectat per no disjunció aquiasmàtica. Els resultats obtinguts en l'individu infèril sostenen aquesta hipòtesi, ja que mostra un increment de dissociació del bivalent XY a metafase I i de disomia XY a espermatòcit II i a espermatozoide, comparat amb espermatozoides d'individus normals (Bosch i col, 2001).

## NO DISJUNCIÓ A MEIOSI I

## ND aquiasmàtica



## NO DISJUNCIÓ A MEIOSI II



**Figura 22.** Mecanismes de no disjunció (ND) a la meiosi masculina. La no disjunció aquiasmàtica s'origina per la segregació a l'atzar de dos univalents donant no disjunció en el 50% dels casos. La no disjunció veritable és causada probablement per la mala segregació d'un bivalent lineal amb un únic quiasma distal. La separació prematura de cromàtides germanes (PSSC) resulta de la segregació de les dues cromàtides germanes d'un univalent. La no disjunció veritable a meiosi II implica la segregació conjunta de dues cromàtides germanes pel manteniment de la cohesió. La PSSC equilibrada causa la segregació a l'atzar de dues cromàtides germanes que han perdut la cohesió, donant lloc a la seva no disjunció en la meitat dels casos.

D'altra banda, la PSSC durant la primera divisió meiòtica, descrita com oòcits II amb una cromàtide extra (Angell, 1991), és una de les principals causes d'aneuploïdia en oòcits humans (Pellestor i col, 2002; Pellestor i col, 2006). La PSSC en espermatoïcits s'ha descrit en l'individu infèril del present treball (veure article 3 a l'Annex). En individus fèrtils, no solament hem observat aquest mecanisme, sinó que ha resultat ser tan freqüent com la no disjunció aquiasmàtica (47% vs. 53% de les disomies). De fet, la freqüència de PSSC (6,5%) en oòcits no inseminats de dones joves amb la tècnica de cariotip espectral (SKY) (Sandalinas i col, 2002) és similar a la obtinguda en la nostra sèrie. La PSSC pot originar-se per cromosomes aquiasmàtics que es bi-orienten en el fus acromàtic com si es tractés d'una divisió mitòtica (Kouznetsova i col, 2007). Els nostres resultats en homes fèrtils sostenen aquesta hipòtesi, ja que els cromosomes més freqüentment afectats per aquest mecanisme de no disjunció (cromosomes 21 i sexuals) són també els més comunament trobats com a univalents separats a metafase I.

La presència de bivalents del grup C amb un quiasma terminal observada en aquest treball podria ser l'origen de la denominada no disjunció "veritable" proposada per Hassold i Hunt (2001). En aquest sentit, alguns autors han proposat que la presència d'un únic quiasma distal entre dos homòlegs pot predisposar-los a la mono-orientació en el fus acromàtic (Lamb i col, 2005; Lacefield i Murray, 2007). Tenint en compte que la presència de bivalents desinàptics, amb freqüències baixes en la nostra sèrie de fèrtils, és l'anomalia meiòtica més comú en individus infèrtils i estèrils (Templado i col, 1981; revisat per Egozcue i col, 2005), la no disjunció "veritable" podria ser el mecanisme més freqüent en individus infèrtils i estèrils.

### **No disjunció a meiosi II**

La presència de cromàtides separades observada a MII podria correspondre a un estadi inicial de l'anafase II o a una separació precoç. Aquesta segona opció estaria avalada per estudis que estableixen que les trisomies d'origen patern procedeixen, preferentment, de no disjuncions a la meiosi II (Hassold i col, 2007). La presència de cromàtides separades és una anomalia freqüent a la meiosi femenina, descrita per primera vegada per Angell (1991). La causa més probable d'aquesta anomalia és la

pèrdua precoç de la cohesió entre cromàtides germanes a la meiosi II per la presència d'un quiasma proximal (Rockmill i col, 2006)

#### **4.5. Estan incrementant les anomalies meiòtiques a la població masculina?**

Les anomalies cromosòmiques meiòtiques presents en la nostra sèrie de fèrtils mostren un increment generalitzat respecte a estudis previs en individus fèrtils i infèrtils, encara que només presenten diferències significatives les anomalies més freqüents, cromosomes sexuals dissociats i anomalies estructurals.

Tot i que el nombre de quiasmes en la nostra sèrie es troba dins del rang d'altres estudis meiòtics previs en individus fèrtils (48,5 i 51,2) (Lamont i col, 1981; Skakkebaek, 1973), la freqüència de cromosomes sexuals aquiasmàtics (22,1%) és superior a la descrita en estudis similars publicats als anys setanta (15%, Skakkebaek, 1973) i a principi dels vuitanta (11,2%, Lamont i col, 1981). Sorprenentment, el percentatge d'univalents sexuals és fins i tot superior als descrits en sèries d'individus infèrtils i estèrils (16,5%) (Luciani, 1970; Skakkebaek i col, 1973; Laurie i Hultén, 1985b) (Taula 10). Els estudis citogenètics clàssics consideraven que freqüències de cromosomes sexuals dissociats superiors al 30% era causa d'infertilitat (Luciani i Stahl, 1978). Malgrat tot, dos dels nostres donants (casos 3 i 12) presenten percentatges del 40% i 44%. Recentment, estudis de recombinació també han descrit freqüències altes de no recombinació en el parell XY en individus control, arribant al 44% (Codina-Pascual i col, 2005; Sun i col, 2006).

La separació prematura de cromosomes sexuals pot causar infertilitat per bloqueig meiòtic (Hale, 1994) o per la pèrdua de concepcions 47,XXY i, sobretot, 45,X que acaben en avortaments espontanis en un 97% dels casos (Jacobs i Hassold, 1995). D'acord amb els nostres resultats, Morris i col·laboradors (2008) han observat un increment de naixements XXY d'origen patern a la població respecte a estudis previs, proposant que podria ser degut a algun factor que interfereixi amb l'aparellament i/o la recombinació del parell XY.

La freqüència d'anomalies estructurals a la nostra sèrie (Taula 10) també es troba incrementada respecte a estudis previs (Skakkebaek i col, 1973), probablement a

causa d'un augment dels trencaments en el DNA, ja que la majoria d'anomalies estructurals són trencaments de DNA sense reparació.

L'increment d'anomalies meiòtiques en individus fèrtils amb el pas del temps indica l'existència de nous factors de risc per aquestes anomalies, tals com l'exposició laboral a substàncies tòxiques (pesticides) i els hàbits relacionats amb l'estil de vida (consum d'alcohol, cafeïna, tabac o drogues) (revisat per Pacchierotti i col, 2007; Tempest i col, 2009). En aquest sentit, recentment s'ha descrit un increment de les anomalies sinàptiques i de la freqüència de recombinació en oòcits de ratolí, causat per un component dels plàstics policarbonats utilitzats per a envasar aliments (Hunt, 2006). Futurs estudis amb altres metodologies poden establir quins són aquests nous factors de risc de l'espermatogènesi humana.

## ***5. Conclusions***





1. La tècnica de M-FISH és molt adequada en estudis meiòtics, ja que augmenta el nombre de metafases analitzables, sobretot de metafases II, i permet la caracterització de fragments i trencament cromosòmic, les anomalies estructurals més freqüents en cèl·lules germinals. Malgrat tot, la M-FISH és una tècnica laboriosa i de cost elevat, no indicada per l'anàlisi clínica rutinària
2. Els individus fèrtils presenten una freqüència d'anomalies meiòtiques de 27%, sent les anomalies meiòtiques més freqüents els errors sinàptics, seguit d'anomalies estructurals i numèriques. No obstant, els individus fèrtils conformen un grup heterogeni respecte a la freqüència d'anomalies meiòtiques, degut principalment a la variabilitat interindividual en la freqüència de cromosomes sexuals dissociats, que pot arribar fins al 44%
3. El percentatge d'anomalies cromosòmiques en espermatòcits II trobat en aquest treball és similars al descrit en oòcits II per altres autors. Per tant, les diferències en l'origen parental de les anomalies cromosòmiques tindrien lloc a estadis post-meioètics. A l'espermatozoide, la menor freqüència d'anomalies numèriques, respecte oòcits, seria deguda al bloqueig d'espermàtides o espermatozoides anormals, mentres que l'augment de les anomalies estructurals s'originaria per trencaments de DNA sense reparació a l'espermiogènesi
4. Els mecanismes que originen aneuploidies a meiosi I en individus fèrtils són majoritàriament la no disjunció aquiasmàtica i la separació prematura de cromàtides germanes. En el present treball, s'han descrit en l'espermatogènesi humana dos nous mecanismes de no disjunció, la PSSC a meiosi I i PSSC equilibrada a meiosi II, prèviament detectats en meiosi femenina
5. L'augment d'anomalies sinàptiques i estructurals en espermatòcits I d'individus fèrtils respecte a les descrites en estudis similars en dècades anteriors podria indicar un augment generalitzat de les anomalies cromosòmiques meiòtiques a la població masculina, possiblement per l'aparició de nous factors de risc de l'espermatogènesi, encara no coneguts



## **6. *Bibliografia***



**A**

- Acar H, Kilinc M, Cora T, Aktan M i Taskapu H (2000). Incidence of chromosome 8,10,X and Y aneuploidies in sperm nucleus of infertile men detected by FISH. *Urol Int* 64: 202-8
- Angell RR (1991). Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet* 86: 383-7
- Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, Egozcue J, i col (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

**B**

- Balhorn R (1982). A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 93: 298-305
- Barlow AL i Hulten MA (1996). Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human spermatocytes. *Chromosome Res* 4: 562-73
- Barlow AL i Hulten MA (1998). Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur J Hum Genet* 6: 350-8
- Baudat F i de Massy B (2007). Regulating double-stranded DNA break repair towards crossover or non-crossover during mammalian meiosis. *Chromosome Res* 15: 565-77
- Blanco J, Egozcue J i Vidal F (1996). Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 11: 722-6
- Blanco J, Gabau E, Gomez D, Baena N, Guitart M, Egozcue J i Vidal F (1998). 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: 1067-72
- Blaschke RJ i Rappold G (2006). The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Curr Opin Genet Dev* 16: 233-9

- Bosch M, Rajmil O, Martinez-Pasarell O, Egozcue J i Templado C (2001). Linear increase of diploidy in human sperm with age: a four-colour FISH study. *Eur J Hum Genet* 9: 533-8
- Bosch M, Rajmil O, Egozcue J i Templado C (2003). Linear increase of structural and numerical chromosome 9 abnormalities in human sperm regarding age. *Eur J Hum Genet* 11: 754-9
- Brandriff BF, Gordon LA, Moore D, 2nd i Carrano AV (1988). An analysis of structural aberrations in human sperm chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 47: 29-36
- Brar GA i Amon A (2008). Emerging roles for centromeres in meiosis I chromosome segregation. *Nat Rev Genet* 9: 899-910
- Brown PW, Judis L, Chan ER, Schwartz S, Seftel A, Thomas A i Hassold TJ (2005). Meiotic synapsis proceeds from a limited number of subtelomeric sites in the human male. *Am J Hum Genet* 77: 556-66
- Burke DJ (2000). Complexity in the spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* 10: 26-31
- Burrello N, Vicari E i Calogero AE (2005). Chromosome abnormalities in spermatozoa of patients with azoospermia and normal somatic karyotype. *Cytogenet Genome Res* 111: 363-5

**C**

- Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Campillo M, Garcia F, Egozcue S, Abad C, i col (2005). Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum Reprod* 20: 2133-9
- Cromie GA i Smith GR (2007). Branching out: meiotic recombination and its regulation. *Trends Cell Biol* 17: 448-55
- Chandley AC, Maclean N, Edmond P, Fletcher J i Watson GS (1976). Cytogenetics and infertility in man. II. Testicular histology and meiosis. *Ann Hum Genet* 40: 165-76

**E**

- Egozcue J, Templado C, Vidal F, Navarro J, Morer-Fargas F i Marina S (1983). Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum Genet* 65: 185-8

Egozcue J, Sarrate Z, Codina-Pascual M, Egozcue S, Oliver-Bonet M, Blanco J, Navarro J, i col (2005). Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet Genome Res* 111: 337-42

Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, i col (2000). Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 6: 93-105

Eijpe M, Heyting C, Gross B i Jessberger R (2000). Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J Cell Sci* 113 ( Pt 4): 673-82

Eskenazi B, Wyrobek AJ, Kidd SA, Lowe X, Moore D, 2nd, Weisiger K i Aylstock M (2002). Sperm aneuploidy in fathers of children with paternally and maternally inherited Klinefelter syndrome. *Hum Reprod* 17: 576-83

Estop AM, Marquez C, Munne S, Navarro J, Ciepły K, Van Kirk V, Martorell MR, i col (1995). An analysis of human sperm chromosome breakpoints. *Am J Hum Genet* 56: 452-60

Evans EP, Breckon G i Ford CE (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics* 15: 289-94

## F

Ferguson LR, Allen JW i Mason JM (1996). Meiotic recombination and germ cell aneuploidy. *Environ Mol Mutagen* 28: 192-210

## G

Gu W, Zhang F i Lupski JR (2008). Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics* 1: 4

Guichaoua M, Ayme S i Luciani JM (1986). Direct estimation of the non-disjunction rate at first meiotic division in the human male. Preliminary results. *Hum Genet* 72: 174-6

Guichaoua MR, Perrin J, Metzler-Guillemain C, Saias-Magnan J, Giorgi R i Grillo JM (2005). Meiotic anomalies in infertile men with severe spermatogenic defects. *Hum Reprod* 20: 1897-902

Gutierrez-Mateo C, Benet J, Starke H, Oliver-Bonet M, Munne S, Liehr T i Navarro J

(2005). Karyotyping of human oocytes by cenM-FISH, a new 24-colour centromere-specific technique. *Hum Reprod* 20: 3395-401

## H

Hale DW (1994). Is X-Y recombination necessary for spermatocyte survival during mammalian spermatogenesis? *Cytogenet Cell Genet* 65: 278-82

Hall H, Hunt P i Hassold T (2006). Meiosis and sex chromosome aneuploidy: how meiotic errors cause aneuploidy; how aneuploidy causes meiotic errors. *Curr Opin Genet Dev* 16: 323-9

Hall HE, Surti U, Hoffner L, Shirley S, Feingold E i Hassold T (2007). The origin of trisomy 22: evidence for acrocentric chromosome-specific patterns of nondisjunction. *Am J Med Genet A* 143A: 2249-55

Hamer G, Novak I, Kouznetsova A i Hoog C (2008a). Disruption of pairing and synapsis of chromosomes causes stage-specific apoptosis of male meiotic cells. *Theriogenology* 69: 333-9

Hamer G, Wang H, Bolcun-Filas E, Cooke HJ, Benavente R i Hoog C (2008b). Progression of meiotic recombination requires structural maturation of the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci* 121: 2445-51

Hassold T, Abruozzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, i col (1996). Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. *Environ Mol Mutagen* 28: 167-75

Hassold T i Hunt P (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2: 280-91

Hassold T, Hall H i Hunt P (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet* 16 Spec No 2: R203-8

Heller CH i Clermont Y (1964). Kinetics of the Germinal Epithelium in Man. *Recent Prog Horm Res* 20: 545-75

Henderson KA i Keeney S (2005). Synaptonemal complex formation: where does it start? *Bioessays* 27: 995-8

Hendry WF, Polani PE, Pugh RC, Sommerville IF i Wallace DM (1975). 200 infertile males: correlation of chromosome,

- histological, endocrine and clinical studies. *Br J Urol* 47: 899-908
- Heyting C (1996). Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 8: 389-96
- Hultén M, Eliasson R i Tillinger KG (1970). Low chiasma count and other meiotic irregularities in two infertile 46, XY men with spermatogenic arrest. *Hereditas* 65: 285-90
- Hultén M (1974). Chiasma distribution at diakinesis in the normal human male. *Hereditas* 76: 55-78
- Hunt PA i Hassold TJ (2002). Sex matters in meiosis. *Science* 296: 2181-3
- Hunt PA (2006). Meiosis in mammals: recombination, non-disjunction and the environment. *Biochem Soc Trans* 34: 574-7
- J**
- Jacobs P, Dalton P, James R, Mosse K, Power M, Robinson D i Skuse D (1997). Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. *Ann Hum Genet* 61: 471-83
- Jacobs PA i Hassold TJ (1995). The origin of numerical chromosome abnormalities. *Adv Genet* 33: 101-33
- K**
- Kang HJ i Rosenwaks Z (2008). Triploidy-- the breakdown of monogamy between sperm and egg. *Int J Dev Biol* 52: 449-54
- Kitajima TS, Kawashima SA i Watanabe Y (2004). The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* 427: 510-7
- Kjessler B (1966). Karyotype, meiosis and spermatogenesis in a sample of men attending an infertility clinic. *Monogr Hum Genet* 2: 1-93
- Koehler KE, Hawley RS, Sherman S i Hassold T (1996). Recombination and nondisjunction in humans and flies. *Hum Mol Genet* 5 Spec No: 1495-504
- Koulisher L, Schoysman R, Gillerot Y i Derby JM (1982). Meiotic chromosome studies in human male infertility. Genetic control of gamete production and function. Crosignani PG i Rubin BL. New York, USA, Academic Press: 239-60
- Kouznetsova A, Lister L, Nordenskjold M, Herbert M i Hoog C (2007). Bi-orientation of achiasmatic chromosomes in meiosis I oocytes contributes to aneuploidy in mice. *Nat Genet* 39: 966-8
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF i Oehninger S (1988). Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 49: 112-7
- Kurahashi H, Bolor H, Kato T, Kogo H, Tsutsumi M, Inagaki H i Ohye T (2009). Recent advance in our understanding of the molecular nature of chromosomal abnormalities. *J Hum Genet*
- L**
- Lacefield S i Murray AW (2007). The spindle checkpoint rescues the meiotic segregation of chromosomes whose crossovers are far from the centromere. *Nat Genet* 39: 1273-7
- Lahdetie J, Larsen SB i Harkonen K (1999). Analysis of chromosome aneuploidy in sperm by fluorescence in situ hybridization--a new approach to the study of male fertility in environmental exposures. *Asclepios. Scand J Work Environ Health* 25 Suppl 1: 26-7
- Lamb NE, Sherman SL i Hassold TJ (2005). Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. *Cytogenet Genome Res* 111: 250-5
- Lamont MA, Faed MJ i Baxby K (1981). Comparative studies of spermatogenesis in fertile and subfertile men. *J Clin Pathol* 34: 145-50
- Laurie DA, Firkett CL i Hultén MA (1985). A direct cytogenetic technique for assessing the rate of first meiotic non-disjunction in the human male by the analysis of cells at metaphase II. *Ann Hum Genet* 49: 23-9
- Laurie DA i Hultén MA (1985a). Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Ann Hum Genet* 49: 203-14
- Laurie DA i Hultén MA (1985b). Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann Hum Genet* 49: 189-201
- Li L i Hamer DH (1995). Recombination and allelic association in the Xq/Yq homology region. *Hum Mol Genet* 4: 2013-6
- Luciani JM (1970). Les chromosomes méiotiques de l'homme. II. Le nucléole, les chiasmata. III. La stérilité masculine. *Ann Genet* 13: 169-82

Luciani JM i Stahl A (1978). Meiotic disturbances related to human male sterility. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 18: 377-82

## M

Machev N, Gosset P i Viville S (2005). Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 111: 352-7

Malmanche N, Maia A i Sunkel CE (2006). The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett* 580: 2888-95

Marchetti F i Wyrobek AJ (2005). Mechanisms and consequences of paternally-transmitted chromosomal abnormalities. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75: 112-29

Márquez C, Cohen J i Munné S (1998). Chromosome identification in human oocytes and polar bodies by spectral karyotyping. *Cytogenet Cell Genet* 81: 254-8

Martin RH, Rademaker AW, Hildebrand K, Long-Simpson L, Peterson D i Yamamoto J (1987). Variation in the frequency and type of sperm chromosomal abnormalities among normal men. *Hum Genet* 77: 108-14

Martin RH, Ko E i Chan K (1993). Detection of aneuploidy in human interphase spermatozoa by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Cytogenet Cell Genet* 64: 23-6

Martin RH, Spriggs E, Ko E i 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: 1395-9

Martin RH (2008). Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update* 14: 379-90

Martinez-Pasarell O, Nogues C, Bosch M, Egozcue J i Templado C (1999). Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 104: 345-9

Martinez-Pasarell O, Templado C, Egozcue J, Vicens-Calvet E i Nogues C (1999). PCR protocol to detect parental origin and hidden mosaicism in Sex chromosome aneuploidies. *Horm Res* 51: 248-52

McDermott A (1973). The frequency and distribution of chiasmata in man. *Ann Hum Genet* 37: 13-20

McDougall A, Elliott DJ i Hunter N (2005). Pairing, connecting, exchanging, pausing and pulling chromosomes. *EMBO Rep* 6: 120-5

McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Hoei-Hansen CE, de Kretser DM i Skakkebaek NE (2007). Histological evaluation of the human testis--approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. *Hum Reprod* 22: 2-16

Miharu N (2005). Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 111: 347-51

Moosani N, Pattinson HA, Carter MD, Cox DM, Rademaker AW i Martin RH (1995). Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 64: 811-7

Morelli MA i Cohen PE (2005). Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 130: 761-81

Morris JK, Alberman E, Scott C i Jacobs P (2008). Is the prevalence of Klinefelter syndrome increasing? *Eur J Hum Genet* 16: 163-70

Moses MJ, Poorman PA, Roderick TH i Davisson MT (1982). Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. IV. Synapsis and synaptic adjustment in two paracentric inversions. *Chromosoma* 84: 457-74

## N

Nagvenkar P, Zaveri K i Hinduja I (2005). Comparison of the sperm aneuploidy rate in severe oligozoospermic and oligozoospermic men and its relation to intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 84: 925-31

Nietzel A, Rocchi M, Starke H, Heller A, Fiedler W, Wlodarska I, Loncarevic IF, i col (2001). A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet* 108: 199-204



## O

Oliver-Bonet M, Liehr T, Nietzel A, Heller A, Starke H, Claussen U, Codina-Pascual M, i col (2003). Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *Eur J Hum Genet* 11: 879-83

Olson S i Magenis R (1988). Preferential paternal origin of *de novo* structural chromosome rearrangements. The cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements. Daniel A. New York, Alan R. Liss, Inc: 583-599

OMS (1999). Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge, UK, Cambridge University Press.

## P

Pacchierotti F, Adler ID, Eichenlaub-Ritter U i Mailhes JB (2007). Gender effects on the incidence of aneuploidy in mammalian germ cells. *Environ Res* 104: 46-69

Page SL i Shaffer LG (1997). Nonhomologous Robertsonian translocations form predominantly during female meiosis. *Nat Genet* 15: 231-2

Page SL i Hawley RS (2003). Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301: 785-9

Pawlowski WP i Cande WZ (2005). Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends Cell Biol* 15: 674-81

Pearson PL, Ellis JD i Evans HJ (1970). A gross reduction in chiasma formation during meiotic prophase and a defective DNA repair mechanism associated with a case of human male infertility. *Cytogenetics* 9: 460-7

Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C i Demaille J (2002). Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Hum Reprod* 17: 2134-45

Pellestor F, Anahory T i Hamamah S (2005). The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. *Hum Reprod Update* 11: 15-32

Pellestor F, Andreo B, Anahory T i Hamamah S (2006). The occurrence of aneuploidy in human: lessons from the cytogenetic

studies of human oocytes. *Eur J Med Genet* 49: 103-16

Petronczki M, Siomos MF i Nasmyth K (2003). Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112: 423-40

## R

Rasmussen SW i Holm PB (1978). Human Meiosis II. Chromosome pairing and recombination nodules in human spermatocytes. *Carlsberg Res Comm* 43: 275-327

Revenkova E i Jessberger R (2005). Keeping sister chromatids together: cohesins in meiosis. *Reproduction* 130: 783-90

Revenkova E i Jessberger R (2006). Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins. *Chromosoma* 115: 235-40

Rives NM (2005). Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: asthenozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 111: 358-62

Rockmill B, Voelkel-Meiman K i Roeder GS (2006). Centromere-proximal crossovers are associated with precocious separation of sister chromatids during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 174: 1745-54

Rodrigo L, Rubio C, Mateu E, Simon C, Remohi J, Pellicer A i Gil-Salom M (2004). Analysis of chromosomal abnormalities in testicular and epididymal spermatozoa from azoospermic ICSI patients by fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 19: 118-23

Roeder GS i Bailis JM (2000). The pachytene checkpoint. *Trends Genet* 16: 395-403

Rousseaux S, Hazzouri M, Pelletier R, Monteil M, Usson Y i 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: 695-9

Rubio C, Simon C, Blanco J, Vidal F, Minguez Y, Egozcue J, Crespo J, i col (1999). Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet* 16: 253-8

Rudak E, Jacobs PA i Yanagimachi R (1978). Direct analysis of the chromosome

constitution of human spermatozoa. *Nature* 274: 911-3

## S

- Sandalinas M, Márquez C i Munné S (2002). Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Mol Hum Reprod* 8: 580-5
- Sarrate Z, Blanco J, Egozcue S, Vidal F i Egozcue J (2004). Identification of meiotic anomalies with multiplex fluorescence in situ hybridization: Preliminary results. *Fertil Steril* 82: 712-7
- Sarrate Z, Vidal F i Blanco J (2009). Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. *Fertil Steril*
- Sasaki M i Makino S (1965). The meiotic chromosomes of man. *Chromosoma* 16: 637-51
- Scherthan H (2001). A bouquet makes ends meet. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 621-7
- Sega GA (1979). Unscheduled DNA synthesis (DNA repair) in the germ cells of male mice--its role in the study of mammalian mutagenesis. *Genetics* 92: s49-58
- Shaffer LG i Lupski JR (2000). Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* 34: 297-329
- Shaffer LG i Tommerup N, Eds. (2005). *ISCN (2005): An international system for human cytogenetic nomenclature*. Basel, Switzerland, S Karger
- Shi Q, Spriggs E, Field LL, Ko E, Barclay L i Martin RH (2001). Single sperm typing demonstrates that reduced recombination is associated with the production of aneuploid 24,XY human sperm. *Am J Med Genet* 99: 34-8
- Skakkebaek NE, Bryant JI i Philip J (1973). Studies on meiotic chromosomes in infertile men and controls with normal karyotypes. *J Reprod Fertil* 35: 23-36
- Soares SR, Templado C, Blanco J, Egozcue J i Vidal F (2001a). 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: 134-9
- Soares SR, Vidal F, Bosch M, Martinez-Pasarell O, Nogues C, Egozcue J i Templado C (2001b). Acrocentric chromosome disomy is increased in spermatozoa from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 108: 499-503
- Speicher MR, Gwyn Ballard S i Ward DC (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12: 368-75
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker A, Navarro J, i col (2004). Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am J Hum Genet* 74: 521-31
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Trpkov K, Ko E, Rademaker A, i col (2005). Discontinuities and unsynapsed regions in meiotic chromosomes have a cis effect on meiotic recombination patterns in normal human males. *Hum Mol Genet* 14: 3013-8
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Turek P, Ko E, Rademaker A, i col (2006). Analysis of non-crossover bivalents in pachytene cells from 10 normal men. *Hum Reprod* 21: 2335-9
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker A i Martin RH (2007). Discontinuities and unsynapsed regions in meiotic chromosomes have a trans effect on meiotic recombination of some chromosomes in human males. *Cytogenet Genome Res* 119: 27-32

## T

- Tempest HG, Ko E, Rademaker A, Chan P, Robaire B i Martin RH (2009). Intra-individual and inter-individual variations in sperm aneuploidy frequencies in normal men. *Fertil Steril* 91: 185-92
- Templado C, Marina S i Egozcue J (1976). Three cases of low chiasma frequency associated with infertility in man. *Andrologia* 8: 285-9
- Templado C (1980). *Estudios meióticos en la infertilidad masculina*. Instituto de Biología Fundamental, Universidad Autónoma de Barcelona: 209
- Templado C, Vidal F, Marina S, Pomerol JM i Egozcue J (1981). A new meiotic mutation: desynapsis of individual bivalents. *Hum Genet* 59: 345-8

Templado C, Marquez C, Munne S, Colls P, Martorell MR, Cieply K, Benet J, i col (1996). An analysis of human sperm chromosome aneuploidy. *Cytogenet Cell Genet* 74: 194-200

Templado C, Hoang T, Greene C, Rademaker A, Chernos J i Martin R (2002). Aneuploid spermatozoa in infertile men: teratozoospermia. *Mol Reprod Dev* 61: 200-4

Templado C, Bosch M i Benet J (2005). Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 111: 199-205

Thomas NS, Durkie M, Van Zyl B, Sanford R, Potts G, Youings S, Dennis N, i col (2006). Parental and chromosomal origin of unbalanced de novo structural chromosome abnormalities in man. *Hum Genet* 119: 444-50

Toth A, Rabitsch KP, Galova M, Schleiffer A, Buonomo SB i Nasmyth K (2000). Functional genomics identifies monopolin: a kinetochore protein required for segregation of homologs during meiosis i. *Cell* 103: 1155-68

## V

Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Calderon G, Egozcue S, Egozcue J i Barri PN (1999). Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Hum Reprod* 14: 375-8

Vidal F, Templado C, Navarro J, Brusadin S, Marina S i Egozcue J (1982). Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males. *Hum Genet* 60: 301-4

Vidal F, Navarro J, Templado C i Egozcue J (1987). Synaptonemal complex studies in the male. *Hum Reprod* 2: 577-81

## W

Warren WD i Goringe KL (2006). A molecular model for sporadic human aneuploidy. *Trends Genet* 22: 218-24

Williams BJ, Ballenger CA, Malter HE, Bishop F, Tucker M, Zwingman TA i Hassold TJ (1993). Non-disjunction in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two and three probes. *Hum Mol Genet* 2: 1929-36

Woods LM, Hodges CA, Baart E, Baker SM, Liskay M i Hunt PA (1999). Chromosomal influence on meiotic spindle assembly: abnormal meiosis I in female *Mlh1* mutant mice. *J Cell Biol* 145: 1395-406

## Z

Zaragoza MV, Millie E, Redline RW i Hassold TJ (1998). Studies of non-disjunction in trisomies 2, 7, 15, and 22: does the parental origin of trisomy influence placental morphology? *J Med Genet* 35: 924-31

Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A i Hassold TJ (2000). Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. *Am J Hum Genet* 66: 1807-20



## ***ARTICLES***



# **Article 1**

Frequencies and origin of  
meiotic chromosome abnormalities in fertile men

(enviat)





# Frequency and origin of meiotic chromosome abnormalities in fertile men

**Running title:** meiotic abnormalities in fertile men

Laia Uroz<sup>1</sup>, Osvaldo Rajmil<sup>2</sup>, Cristina Templado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, 08193, Spain

<sup>2</sup>Servei d'Andrologia, Fundació Puigvert, Barcelona, 08020, Spain

Correspondence: Prof Dr C. Templado, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, 08193, Spain. Tel: +34 935811905; Fax: +34 935811025; E-mail: [cristina.templado@uab.es](mailto:cristina.templado@uab.es)

## **Abstract**

Meiotic studies in men with normal spermatogenesis are scarce, and most individuals analyzed are not of proven fertility. The aim of the present study is to determine the basal frequencies and the origin of meiotic chromosome abnormalities in fertile men. Meiotic analyses were carried out in 1407 metaphase I spermatocytes from 17 fertile donors using DAPI staining. In three of these donors, 565 spermatocytes in metaphase I and II stages were studied using the multiplex-FISH (M-FISH) technique. The main meiotic abnormality was synaptic errors (23.3%), followed by structural (3.3%) and numerical (0.7%) abnormalities. Statistically significant heterogeneity ( $P < 0.001$ ) was found for meiotic abnormalities among fertile men, caused by the variation in separated sex chromosomes. Chromosomes 21 and the sex chromosomes were the most commonly involved in both synaptical abnormalities at metaphase I and hyperploidy at metaphase II. Achiasmate nondisjunction and premature separation of sister chromatids (PSSC) are the two main nondisjunction mechanisms in meiosis I. Disomy frequency decreases from spermatocyte II to spermatozoa, suggesting a specific checkpoint in late spermatogenesis monitoring numerical abnormalities. Structural aberrations in spermatocytes, principally nonrejoined breaks, showed lower frequencies than that described in spermatozoa, corroborating that they mainly originate during spermiogenesis. Surprisingly, the frequencies of both dissociated sex chromosomes and structural abnormalities in our fertile series are higher than those described in the 1970s and early 1980s. The mean frequency of meiotic chromosome abnormalities (27%) could be used as baseline frequencies in further meiotic studies in patients consulting for infertility or sterility.

**Key words:** meiotic abnormalities, fertile men, spermatocytes, M-FISH, inter-individual variation, nondisjunction

## Introduction

Meiotic studies on human spermatocytes are essential to detect meiotic abnormalities responsible for male infertility and sterility and to determine their underlying mechanisms. Meiotic chromosome disorders lead to either meiotic arrest, resulting in oligozoospermia and azoospermia, or spermatozoa with chromosome abnormalities, causing pregnancy loss and affected offspring.

Most chromosome abnormalities (86% of cases)<sup>1</sup> originate during paternal or maternal meiosis. *De novo* structural rearrangements are predominantly paternal in origin, with frequencies of 70-80%,<sup>2,3</sup> except for Robertsonian translocations that mainly arise during oogenesis.<sup>4</sup> Recently, a preliminary study reported that 100% of *de novo* balanced t(11;22) are of paternal origin.<sup>5</sup> In contrast, autosomal trisomies are paternal in 0-30% of cases, depending on the chromosome affected.<sup>1</sup> The origin of sex chromosome trisomies is highly variable: only 10% of 47,XXX conditions but around 50% of 47,XXY and 100% of 47,XYY trisomies derive from paternal errors.<sup>6</sup> The origin of autosomal monosomies is unknown, since they are lost during early embryonic development, whereas 74-75% of 45,X cases are paternal in origin.<sup>7,8</sup>

Most meiotic studies have applied conventional cytogenetic techniques to metaphase I (MI) spermatocytes from infertile patients,<sup>9-13</sup> an etiologically heterogeneous group with a wide range of individuals presenting meiotic abnormalities (from 6%<sup>12</sup> to 17.5%<sup>14</sup>). The major chromosome disorder at this meiotic stage was synaptic abnormalities that may either result in abnormal spermatozoa or induce meiotic arrest. Synaptic disorders, only detectable during the first meiotic division, have also been studied by analyzing synaptonemal complexes on spermatocytes at the pachytene stage,<sup>15,16</sup> although their frequency could be underestimated because of the phenomenon of synaptic adjustment.<sup>17</sup>

Meiotic studies in fertile men are scarce, and little is known about their baseline chromosomal abnormalities at the different meiotic stages in these individuals.

Although several studies were carried out in males with “normal meiosis”,<sup>13,18,19</sup> most of them were patients attending for fertility problems. To our knowledge, the two classic cytogenetic studies investigating meiosis in series of fertile men only described synaptic abnormalities, corresponding to univalents for sex chromosomes<sup>10,20</sup> and for small autosomes.<sup>10</sup>

The multiplex-FISH (M-FISH) technique, first described in somatic cells,<sup>21</sup> permits the simultaneous identification of all human chromosomes with a specific combination of five fluorochromes. M-FISH was adapted to metaphase spermatocytes by Sarrate *et al*,<sup>22</sup> and was employed by us in one single study to characterize meiotic chromosome abnormalities in an infertile man.<sup>23</sup>

Here, we analyze meiotic chromosome abnormalities in spermatocytes I from 17 fertile men using DAPI staining. We describe the basal frequencies of meiotic abnormalities in fertile men. In addition, we applied the M-FISH technique to spermatocytes at MI and metaphase II from three of these donors to identify the chromosomes involved in meiotic abnormalities and to investigate the nondisjunction mechanisms causing these meiotic errors.

## **Material and methods**

### *Subjects*

Testicular samples were collected during a vasectomy procedure from 17 healthy fertile males which produced at least one offspring under natural conditions, aged from 28 to 47 years (mean 38.3). Among these 17 donors, seven were smokers (cases 1, 3, 4, 10, 14, 15, 16) and none of them had been exposed to known mutagens or radiation. The frequencies of meiotic chromosome abnormalities in spermatocytes I and II from cases 1 and 2 have been described elsewhere<sup>24</sup> using the cenM-FISH technique, and this data has not been included in this work. All donors signed an informed consent form prior to the surgery. The study was approved by our University's and Institutional Ethics Committees.

### *Germ cell spreading*

Testicular biopsy was obtained under local anesthesia and meiotic cells were fixed using the air-drying technique<sup>25</sup> with minor modifications.<sup>23</sup> Meiotic chromosome preparations were preserved at -20°C until DAPI staining and M-FISH hybridization.

### *DAPI staining*

Slides were washed in 1xPBS for 5 minutes, treated with 0.4xSSC/0.3% NP-40 for 2 minutes at 71°C and with 2xSSC/0.1% NP-40 for 5 minutes, and dehydrated in an ethanol series. Spermatogenic cells were stained with DAPI in antifade solution (DAPI II, Vysis Inc; Downers Grove, IL, USA).

### *M-FISH technique*

The M-FISH technique employs whole-chromosome probes labeled with different combinations of five fluorochromes for the simultaneous identification of the 24 human chromosomes.<sup>21</sup> Meiotic chromosome spreads stained and analyzed with DAPI were sequentially hybridized by the M-FISH technique following the manufacturer's

instructions (SpectraVysion Assay, Vysis Inc). Briefly, slides were washed in 2xSSC/0.1% NP-40 for 5 minutes, dehydrated in an ethanol series and air-dried. Meiotic preparations were pretreated with 0.005% pepsin for 5 minutes at 37°C, post-fixed in 1% formaldehyde for 10 minutes and denatured in 70% formamide for 1.5 minutes at 73°C. Spermatogenic cells were counterstained with DAPI in antifade solution (DAPI II, Vysis Inc).

#### *Data collection and analysis*

Spermatocyte images were captured under an epifluorescence microscope (Olympus Bx60, Hamburg, Germany) and using a Power Macintosh G3. DAPI-stained meiotic metaphases were analyzed using SmartCapture software (Digital Scientific, Cambridge, UK). Metaphases I and II hybridized with M-FISH were analyzed with SpectraVysion software (Digital Scientific). The M-FISH technique requires the capture of each fluorochrome in separate images and metaphase analysis is carried out in the merged image. MII spermatocytes were not analyzed with DAPI staining because they have a high number of overlapping chromosomes and characteristic spiralized figures. Metaphase analysis was performed by two different observers, and chromosome abnormalities were classified according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN).<sup>26</sup> To avoid technical artifacts, a conservative estimate of aneuploidy was calculated as twice the hyperploidy frequency. Hypoploid metaphases were not included in this study, except those showing other chromosome abnormalities. Chiasma frequency was counted in each individual in 15 well-spread spermatocytes I with a normal karyotype (23,XY). Only spermatocyte II metaphases with 46 chromosomes distributed randomly in a nucleated metaphase were considered diploid.

### *Statistical analyses*

To evaluate the inter-donor variation in the incidence of meiotic chromosome abnormalities and to determine whether there were significant differences both between MI and MII chromosome abnormalities and between X- and Y-bearing MII spermatocytes, the two-tailed Fisher's exact test was performed. To analyze correlation between age and abnormality frequencies in the 17 fertile donors, the Spearman's correlation test was applied. To investigate whether there were statistically significant differences among individuals in the chiasma frequencies, we used the Kruskal-Wallis nonparametric test.

## Results

Meiotic studies were carried out in spermatocyte metaphases I from 17 fertile men using DAPI staining to determine the basal frequencies of meiotic chromosome abnormalities at MI. Spermatocytes I and II from three of these donors, previously analyzed with DAPI staining, were karyotyped using the M-FISH technique to characterize and identify chromosomes involved in meiotic abnormalities and to determine the mechanisms leading to them.

### *Analysis of metaphase I spermatocytes by DAPI staining*

Four of the 17 individuals studied (23.5%) presented desynaptic bivalents, three men (17.6%) had autosomal univalents and in two of them (11.8%) both desynaptic bivalents and univalents were found. Structural and numerical abnormalities affected 82.4% and 23.5% of the fertile men, respectively. All donors had metaphases I with dissociated sex chromosomes, with frequencies ranging from 3.2% to 43.7%.

A total of 1407 DAPI-stained spermatocyte metaphases I were analyzed. Meiotic chromosome abnormalities in fertile men (27.4%) were principally synaptic disorders (85%), followed by structural (12%) and numerical (3%) abnormalities. Meiotic chromosome abnormality frequencies are shown in Table 1, and abnormal karyotypes are listed in Table 2. Among individuals, the percentage of meiotic chromosome abnormalities ranged from 8.1% to 46.5%, with a mean frequency ( $\pm$ SD) of 27.4% $\pm$ 1.0%. Synaptic abnormalities at metaphase I were achiasmate sex chromosomes (22.1%) or autosomes (0.4%) observed as two separated univalents, and medium-sized lineal bivalents with a single distal chiasma (desynaptic bivalents) (0.9%). Hyperploidy (0.4%), observed in most cases as an extra univalent, was significantly correlated with age ( $r=0.652$ ;  $P=0.005$ ). None of the metaphases I was diploid. Structural abnormalities (3.3%) were principally acentric fragments, followed by chromosome breaks (see Table 2). Significant inter-donor heterogeneity was observed



for meiotic chromosome abnormalities ( $P<0.001$ ) because of separated sex chromosomes variation ( $P<0.001$ ). One of the individuals (case 12) showed significantly higher frequencies ( $P<0.001$ ) of meiotic chromosome abnormalities compared with the other donors. Significant inter-individual variation in the chiasma frequencies was found ( $P<0.001$ ), with a total mean number of chiasmata per cell of  $50.3\pm 3.3$  (Table 1).

#### *Analysis of metaphase I and II spermatocytes by M-FISH*

M-FISH analysis was carried out in 317 MI and 248 metaphases II (MII) spermatocytes from three of the 17 males (Tables 1 and 3), previously selected on the basis of the number and quality of their meiotic cells (cases 8, 13 and 16). In each hybridized metaphase, chromosome identification was carried out using the M-FISH image and meiotic abnormalities were detected using DAPI counterstain, which also enabled differentiation between the p and q arm in most chromosome pairs by marking centromeres as darker spots. Frequencies of meiotic chromosome abnormalities in MI studied using the M-FISH technique were significantly higher than those found with DAPI staining ( $P=0.010$ ).

The mean frequency of meiotic chromosome abnormalities in MI in our fertile series was  $34.1\%\pm 4.6\%$ . Synaptic abnormalities consisted of achiasmate sex chromosomes (25.2%) or autosomes (1.9%) affecting chromosomes 10, 13, 21 and 22, and desynaptic bivalents for chromosome pairs 7 and 8 (0.6%) (Figures 1A and 1B). All hyperploid spermatocytes I (1.3%) contained an extra chromosome 18, 19, 22 or Y. None of the spermatocytes I was diploid. Structural abnormalities (3.8%) were acentric fragments (Figures 1C and 1D) followed by chromosome breaks (see Table 3).

The mean frequency of meiotic chromosome abnormalities in MII was  $27.4\%\pm 3.5\%$ . The frequencies of X-bearing (49.6%) and Y-bearing (50.4%) spermatocytes II were not significantly different from the expected 1:1 ratio. Hyperploidy at MII (6.9%)

consisted of either an extra chromosome (3.6%) or an extra chromatid (3.2%) (Figures 1E and 1F), basically affecting sex chromosomes and chromosome 21 (see Table 3). Diploidy was observed in 0.8% of the metaphases II. Structural abnormalities (6.0%) were mainly chromatid and chromosome breaks (Figures 1G and 1H), and acentric fragments. Separated chromatids were found in 6.9% of the MII, and the chromosomes involved were 1, 2, 3, 6, 7, 8, 13, 14, 22 and X. Significant inter-individual variation was found in spermatocytes II for both hyperploidy ( $P=0.020$ ) and structural abnormalities ( $P=0.044$ ). Hyperploid spermatocyte I frequency was significantly higher ( $P<0.001$ ) than that observed in spermatocytes II.

## Discussion

To our knowledge, this is the first study describing frequencies of meiotic chromosome abnormalities in spermatocytes from fertile males and their underlying mechanisms. Only two previous studies have been carried out in fertile males using conventional staining techniques, being focused on metaphase I analyses.<sup>10,20</sup>

The M-FISH technique improves the chromosome identification of synaptic, numerical and structural chromosome abnormalities compared to DAPI staining and increases the number of analyzable spermatocytes, especially at the MII stage. Moreover, M-FISH enables better characterization of structural abnormalities in spermatocytes, principally chromosome breaks and acentric fragments. Although M-FISH is too expensive and time consuming to be used in routine screening, it is a powerful technique to identify meiotic chromosome abnormalities, suitable for clinical cases requiring an accurate meiotic analysis.

### *Frequencies of meiotic chromosome abnormalities vary among fertile men*

The inter-donor variation for meiotic chromosome abnormalities found in our fertile male series is due to individual differences in the frequency of separated sex chromosomes, which was surprisingly variable among individuals (from 3.2% to 43.7%). Our data on heterogeneity for synaptic abnormalities at MI is in accordance with the inter-donor variation found in both hyperploidy at MII in this same series and disomy XY in studies of spermatozoa from fertile males.<sup>27</sup> This heterogeneity suggests that individuals with offspring can also have high frequencies of meiotic abnormalities, like our donor 12, and may be at risk of fathering aneuploid offspring. Indeed, some authors<sup>28-32</sup> have described how fathers of paternally derived aneuploid offspring show significant increases in sperm disomy.

Complete meiotic arrest, affecting 14.2% of infertile males,<sup>33</sup> was not found in our fertile series. However, three of the donors (cases 3, 10 and 14) exhibited a low number of

spermatocytes I and few meiotic cells, probably due to a partial germ cell arrest before entering meiosis. It is not possible to discard that hypospermatogenesis, with a high prevalence in infertile men (60%),<sup>33</sup> may coexist with normal sperm production in other tubules from the same testis in fertile males.

#### *Basal frequencies of meiotic chromosome abnormalities in fertile men*

The frequency of meiotic abnormalities in fertile men reaches 27%, and the most frequent abnormality is synaptic disorders, as previously described in infertile and sterile studies.<sup>12,34</sup> Our results are not comparable with those obtained in infertile and sterile series, since those studies were focused on assessing the meiotic causes of their reproductive failure, analyzing a low number of spermatocytes per patient, and did not describe abnormality frequencies.

Synaptic abnormalities, mainly achiasmate chromosomes, essentially affected sex chromosomes, followed by chromosome 21, in accordance with a similar classic study that reported univalents for sex chromosomes and small autosomes.<sup>10</sup> Bivalent 21 and XY usually have one single chiasma in meiosis I,<sup>13,35</sup> since chromosome 21 is the smallest in the karyotype and sex chromosomes pairing is limited to pseudoautosomal region. Thus, these chromosomes have a greater tendency to appear as univalents in spermatocytes with reduced chiasma frequency.<sup>36</sup> Chromosomes 21 and XY were also the most commonly involved in disomies in MII in this study and in spermatozoa from healthy men.<sup>37</sup> Unfortunately, the approach used is not adequate for elucidating whether the origin of univalents is either absence of recombination or premature chiasma terminalization. Recombination studies in pachytene spermatocytes in normal men found that G-group and sex chromosomes are the most susceptible to having no recombination foci.<sup>38</sup>

Unexpectedly, the frequency of numerical abnormalities at MII is very high, a 5-fold increase compared with MI, and similar to that described in oocytes II from young

women,<sup>39</sup> whereas it is three times higher than in spermatozoa from healthy donors.<sup>37</sup> This data could indicate the existence of a post-meiotic checkpoint at the spermatid stage<sup>40,41</sup> or in spermatozoa,<sup>42</sup> responsible for the low frequencies of autosomal trisomies of paternal origin.<sup>1</sup>

Structural abnormalities in spermatocytes I and II are principally non-rejoined breaks, as previously described in spermatozoa using the human-hamster technique.<sup>43,44</sup> The frequency of structural abnormalities in spermatocyte is lower than that described in spermatozoa from healthy males (6.6%),<sup>37</sup> supporting the hypothesis<sup>43,45</sup> that chromosome aberrations mainly arise during late spermatogenesis, a repair-deficient stage prone to DNA lesions.<sup>46,47</sup> Moreover, the similar frequency of structural abnormalities in spermatocytes II and oocytes II<sup>48</sup> are also in accordance with the further production of structural aberrations during spermiogenesis.

The association between the age and frequency of hyperploid spermatocytes I found in our study could be explained either by an increase in the number of spermatogonial divisions before entering meiosis or by a diminished efficiency of the pachytene checkpoint with age, which is usually activated in cells showing disruption of synapsis.<sup>49,50</sup> According to our finding, FISH studies in spermatozoa from the control males described increased frequencies of disomy for chromosomes 1, 9 and 21 with age.<sup>51-53</sup> Further study of MI spermatocytes specifically designed to analyze the effect of age could help reveal whether this correlation really exists.

#### *Meiotic nondisjunction mechanisms*

The karyotyping of MII spermatocytes by M-FISH allowed us to directly analyze the nondisjunction mechanisms during the first meiotic division. The three mechanisms leading to aneuploidy in meiosis I from fertile males are achiasmate nondisjunction, premature separation of sister chromatids (PSSC) and true nondisjunction (Figure 2).

The high incidence of univalents at MI indicates that the main mechanism causing aneuploidies during the first meiotic division is achiasmate nondisjunction. The 50% of MII disomies observed have an extra chromosome, probably caused by this nondisjunction mechanism, whereas the remaining 50% showed an extra chromatid. In fact, sex chromosomes are involved in the majority of univalents at MI and in most disomies at MII, indicating that XY pair is the main bivalent undergoing achiasmate nondisjunction.

The second nondisjunction mechanism is characterized by the presence of an extra chromatid, observed in approximately 50% of MII disomies. PSSC<sup>54</sup> is the leading cause of aneuploidy in human oocytes,<sup>55,56</sup> and has recently been described by our group in human male meiosis.<sup>23</sup> The chromosomes that are most commonly affected by PSSC (chromosome 21 and sex chromosomes) are also those frequently found as separated univalents at MI. Recently, it has been proposed that achiasmate chromosomes are bi-oriented in a mitotic manner, and result in aneuploid spermatocytes II.<sup>57</sup>

Some authors have proposed that bivalents with a single distal chiasma are prone to mono-orientation.<sup>58,59</sup> The medium-sized desynaptic bivalents observed in this study, previously described in infertile males,<sup>60</sup> could probably result in true nondisjunction, with both homologous chromosomes segregating to the same pole.

In this study, we have observed separated chromatids in MII spermatocytes from fertile males for the first time. Although some of these spermatocytes could correspond to early anaphase II, the presence of separated chromatids is common in female meiosis (balanced PSSC). The most probable explanation for this abnormality is the premature loss of cohesion between sister chromatids in meiosis II because of the presence of a chiasma near the centromere (Figure 2).<sup>61</sup>

*Are human meiotic abnormalities increasing in the male population?*

All individuals in our series had spermatocytes with dissociated sex chromosomes. Although classical studies considered that frequencies of separated sex chromosomes higher than 30% result in infertility,<sup>62</sup> two of our fertile donors (cases 3 and 12) had frequencies of 40% and 44%. Similarly, recent recombination studies in normal men also reported higher frequencies, up to 44%.<sup>38,63</sup> Although the mean chiasma frequency in this study is within the range described by conventional meiotic studies in fertile men (48.5 and 51.2),<sup>10,20</sup> the percentage of achiasmate sex chromosomes (22.1%) is higher than those described in studies published in the 1970s (15%)<sup>10</sup> and early 1980s (11.2%).<sup>20</sup> Surprisingly, frequencies for sex chromosome univalents are even higher than those described in series of infertile and sterile males (16.5%)<sup>10,11,13,18</sup> (Table 4). High frequencies of sex chromosome univalents may lead to infertility, either through meiotic arrest<sup>64</sup> or by the loss of 47,XXY and principally 45,X conceptuses. In agreement with our data, Morris et al.<sup>65</sup> described an increase in the XXY condition of paternal origin compared to previous studies, hypothesizing that some factor may be interfering with pairing and/or recombination of the XY pair. In fact, a recent direct meiotic study in mouse oocytes<sup>66</sup> observed that exposure to bisphenol A results in increased synaptic abnormalities and recombination levels. Moreover, the frequency of structural abnormalities found in our fertile series is also higher than that described in fertile and infertile males in the 1970's<sup>10</sup> (see Table 4). This data indicates the existence of new risk factors that increase the frequencies of both structural abnormalities and dissociated sex chromosomes, such as occupational exposure to toxics (pesticides), medical treatments (chemotherapy) and lifestyle habits (cigarette smoking, consumption of caffeine, alcohol, drugs).<sup>67</sup>

In conclusion, our present data suggests that fertile men are a heterogeneous group for synaptic errors, showing increasing frequencies of meiotic abnormalities in recent decades, probably due to exposure to new risk factors. Meiotic chromosomal

abnormalities (synaptic, numerical and structural) in fertile males can be used as baseline frequencies in further studies of males with idiopathic infertility in order to elucidate the causes of their infertility.



## **Acknowledgements**

The authors wish to thank Pedro Robles and Raquel Garcia-Cruz for technical assistance. This research was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (BFI2002-01193) and the Generalitat de Catalunya, Spain (2005SGR-00495, 2005FI00399).

## References

- 1 Hassold, T., Hall, H., and Hunt, P. (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2, R203-208.
- 2 Olson, S., and Magenis, R. (1988). Preferential paternal origin of *de novo* structural chromosome rearrangements. In: *The cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements*, Daniel A, ed (New York: Alan R. Liss, Inc), pp 583-599.
- 3 Thomas, N.S., Durkie, M., Van Zyl, B., Sanford, R., Potts, G., Youings, S., Dennis, N., and Jacobs, P. (2006). Parental and chromosomal origin of unbalanced *de novo* structural chromosome abnormalities in man. *Hum Genet* 119, 444-450.
- 4 Bandyopadhyay, R., Heller, A., Knox-DuBois, C., McCaskill, C., Berend, S.A., Page, S.L., and Shaffer, L.G. (2002). Parental origin and timing of *de novo* Robertsonian translocation formation. *Am J Hum Genet* 71, 1456-1462.
- 5 Kurahashi, H., Bolor, H., Kato, T., Kogo, H., Tsutsumi, M., Inagaki, H., and Ohye, T. (2009). Recent advance in our understanding of the molecular nature of chromosomal abnormalities. *J Hum Genet*.
- 6 Hall, H., Hunt, P., and Hassold, T. (2006). Meiosis and sex chromosome aneuploidy: how meiotic errors cause aneuploidy; how aneuploidy causes meiotic errors. *Curr Opin Genet Dev* 16, 323-329.
- 7 Jacobs, P., Dalton, P., James, R., Mosse, K., Power, M., Robinson, D., and Skuse, D. (1997). Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. *Ann Hum Genet* 61, 471-483.
- 8 Martinez-Pasarell, O., Templado, C., Egozcue, J., Vicens-Calvet, E., and Nogues, C. (1999). PCR protocol to detect parental origin and hidden mosaicism in Sex chromosome aneuploidies. *Horm Res* 51, 248-252.

- 9 Luciani, J.M. (1970). Les chromosomes méiotiques de l'homme. II. Le nucléole. Les chiasmas. 3. La stérilité masculine. *Ann Genet* 13, 169-182.
- 10 Skakkebaek, N.E., Bryant, J.I., and Philip, J. (1973). Studies on meiotic chromosomes in infertile men and controls with normal karyotypes. *J Reprod Fertil* 35, 23-36.
- 11 Chandley, A.C., Maclean, N., Edmond, P., Fletcher, J., and Watson, G.S. (1976). Cytogenetics and infertility in man. II. Testicular histology and meiosis. *Ann Hum Genet* 40, 165-176.
- 12 Egozcue, J., Templado, C., Vidal, F., Navarro, J., Morer-Fargas, F., and Marina, S. (1983). Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum Genet* 65, 185-188.
- 13 Laurie, D.A., and Hultén, M.A. (1985). Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann Hum Genet* 49, 189-201.
- 14 Vendrell, J.M., García, F., Veiga, A., Calderón, G., Egozcue, S., Egozcue, J., and Barri, P.N. (1999). Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Hum Reprod* 14, 375-378.
- 15 Solari, A.J. (1980). Synaptosomal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma* 81, 315-337.
- 16 Barlow, A.L., and Hultén, M.A. (1998). Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur J Hum Genet* 6, 350-358.
- 17 Egozcue, J., Sarrate, Z., Codina-Pascual, M., Egozcue, S., Oliver-Bonet, M., Blanco, J., Navarro, J., Benet, J., and Vidal, F. (2005). Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet Genome Res* 111, 337-342.
- 18 Luciani, J.M. (1970). Les chromosomes méiotiques de l'homme. I. La méiose normale. *Ann Genet* 13, 101-111.

- 19 McDermott, A. (1973). The frequency and distribution of chiasmata in man. *Ann Hum Genet* 37, 13-20.
- 20 Lamont, M.A., Faed, M.J., and Baxby, K. (1981). Comparative studies of spermatogenesis in fertile and subfertile men. *J Clin Pathol* 34, 145-150.
- 21 Speicher, M.R., Gwyn Ballard, S., and Ward, D.C. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12, 368-375.
- 22 Sarrate, Z., Blanco, J., Egozcue, S., Vidal, F., and Egozcue, J. (2004). Identification of meiotic anomalies with multiplex fluorescence in situ hybridization: Preliminary results. *Fertil Steril* 82, 712-717.
- 23 Uroz, L., Rajmil, O., and Templado, C. (2008). Premature separation of sister chromatids in human male meiosis. *Hum Reprod* 23, 982-987.
- 24 Uroz, L., Liehr, T., Mrasek, K., and Templado, C. (2009). CenM-FISH on human spermatocyte I and II metaphases. *Hum Reprod* (in press).
- 25 Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics* 15, 289-294.
- 26 Schaffer, L.G., and Tommerup, N. (2005). *ISCN (2005): An international system for human cytogenetic nomenclature* (Basel, Switzerland: S Karger).
- 27 Tempest, H.G., Ko, E., Rademaker, A., Chan, P., Robaire, B., and Martin, R.H. (2009). Intra-individual and inter-individual variations in sperm aneuploidy frequencies in normal men. *Fertil Steril* 91, 185-192.
- 28 Blanco, J., Gabau, E., Gómez, D., Baena, N., Guitart, M., Egozcue, J., and Vidal, F. (1998). 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.

- 29 Martínez-Pasarell, O., Nogués, C., Bosch, M., Egozcue, J., and Templado, C. (1999). Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 104, 345-349.
- 30 Eskenazi, B., Wyrobek, A.J., Kidd, S.A., Lowe, X., Moore, D., 2nd, Weisiger, K., and Aylstock, M. (2002). Sperm aneuploidy in fathers of children with paternally and maternally inherited Klinefelter syndrome. *Hum Reprod* 17, 576-583.
- 31 Soares, S.R., 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.
- 32 Soares, S.R., Vidal, F., Bosch, M., Martínez-Pasarell, O., Nogués, C., Egozcue, J., and Templado, C. (2001). Acrocentric chromosome disomy is increased in spermatozoa from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 108, 499-503.
- 33 McLachlan, R.I., Rajpert-De Meyts, E., Hoei-Hansen, C.E., de Kretser, D.M., and Skakkebaek, N.E. (2007). Histological evaluation of the human testis-- approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. *Hum Reprod* 22, 2-16.
- 34 Koulischer, L., Schoysman, R., Gillerot, Y., and Derby, J.M. (1982). Meiotic chromosome studies in human male infertility. In: *Genetic control of gamete production and function*, Crosignani PG, Rubin BL, eds. (New York, USA: Academic Press), pp 239-260.
- 35 Sun, F., Oliver-Bonet, M., Liehr, T., Starke, H., Ko, E., Rademaker, A., Navarro, J., Benet, J., and Martin, R.H. (2004). Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am J Hum Genet* 74, 521-531.
- 36 Ferguson, L.R., Allen, J.W., and Mason, J.M. (1996). Meiotic recombination and germ cell aneuploidy. *Environ Mol Mutagen* 28, 192-210.

- 37 Templado, C., Bosch, M., and Benet, J. (2005). Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 111, 199-205.
- 38 Sun, F., Oliver-Bonet, M., Liehr, T., Starke, H., Turek, P., Ko, E., Rademaker, A., and Martin, R.H. (2006). Analysis of non-crossover bivalents in pachytene cells from 10 normal men. *Hum Reprod* 21, 2335-2339.
- 39 Sandalinas, M., Márquez, C., and Munné, S. (2002). Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Mol Hum Reprod* 8, 580-585.
- 40 de Rooij, D.G., and de Boer, P. (2003). Specific arrests of spermatogenesis in genetically modified and mutant mice. *Cytogenet Genome Res* 103, 267-276.
- 41 Guichaoua, M.R., Perrin, J., Metzler-Guillemain, C., Saias-Magnan, J., Giorgi, R., and Grillo, J.M. (2005). Meiotic anomalies in infertile men with severe spermatogenic defects. *Hum Reprod* 20, 1897-1902.
- 42 Rodrigo, L., Rubio, C., Mateu, E., Simon, C., Remohi, J., Pellicer, A., and Gil-Salom, M. (2004). Analysis of chromosomal abnormalities in testicular and epididymal spermatozoa from azoospermic ICSI patients by fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 19, 118-123.
- 43 Brandriff, B.F., Gordon, L.A., Moore, D.n., and Carrano, A.V. (1988). An analysis of structural aberrations in human sperm chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 47, 29-36.
- 44 Estop, A.M., Márquez, C., Munné, S., Navarro, J., Cieply, K., Van Kirk, V., Martorell, M.R., Benet, J., and Templado, C. (1995). An analysis of human sperm chromosome breakpoints. *Am J Hum Genet* 56, 452-460.
- 45 Marchetti, F., and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and consequences of paternally-transmitted chromosomal abnormalities. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75, 112-129.

- 46 Segal, G.A. (1979). Unscheduled DNA synthesis (DNA repair) in the germ cells of male mice--its role in the study of mammalian mutagenesis. *Genetics* 92, s49-58.
- 47 Balhorn, R. (1982). A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 93, 298-305.
- 48 Pellestor, F., Anahory, T., and Hamamah, S. (2005). The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. *Hum Reprod Update* 11, 15-32.
- 49 Roeder, G.S., and Bailis, J.M. (2000). The pachytene checkpoint. *Trends Genet* 16, 395-403.
- 50 Hamer, G., Novak, I., Kouznetsova, A., and Hoog, C. (2008). Disruption of pairing and synapsis of chromosomes causes stage-specific apoptosis of male meiotic cells. *Theriogenology* 69, 333-339.
- 51 Martin, R.H., Spriggs, E., Ko, E., and Rademaker, A.W. (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.
- 52 Bosch, M., Rajmil, O., Egozcue, J., and Templado, C. (2003). Linear increase of structural and numerical chromosome 9 abnormalities in human sperm regarding age. *Eur J Hum Genet* 11, 754-759.
- 53 Rousseaux, S., Hazzouri, M., Pelletier, R., Monteil, M., Usson, Y., and 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.
- 54 Angell, R.R. (1991). Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet* 86, 383-387.
- 55 Pellestor, F., Andreo, B., Arnal, F., Humeau, C., and Demaille, J. (2002). Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of

- two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Hum Reprod* 17, 2134-2145.
- 56 Pellestor, F., Andreo, B., Anahory, T., and Hamamah, S. (2006). The occurrence of aneuploidy in human: lessons from the cytogenetic studies of human oocytes. *Eur J Med Genet* 49, 103-116.
- 57 Kouznetsova, A., Lister, L., Nordenskjold, M., Herbert, M., and Hoog, C. (2007). Bi-orientation of achiasmatic chromosomes in meiosis I oocytes contributes to aneuploidy in mice. *Nat Genet* 39, 966-968.
- 58 Lamb, N.E., Sherman, S.L., and Hassold, T.J. (2005). Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. *Cytogenet Genome Res* 111, 250-255.
- 59 Lacefield, S., and Murray, A.W. (2007). The spindle checkpoint rescues the meiotic segregation of chromosomes whose crossovers are far from the centromere. *Nat Genet* 39, 1273-1277.
- 60 Templado, C., Vidal, F., Marina, S., Pomerol, J.M., and Egozcue, J. (1981). A new meiotic mutation: desynapsis of individual bivalents. *Hum Genet* 59, 345-348.
- 61 Rockmill, B., Voelkel-Meiman, K., and Roeder, G.S. (2006). Centromere-proximal crossovers are associated with precocious separation of sister chromatids during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 174, 1745-1754.
- 62 Luciani, J.M., and Stahl, A. (1978). Meiotic disturbances related to human male sterility. *Ann Biol anim Bioch Biophys* 18, 377-382.
- 63 Codina-Pascual, M., Campillo, M., Kraus, J., Speicher, M.R., Egozcue, J., Navarro, J., and Benet, J. (2006). Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and effects on human male meiosis. *Mol Hum Reprod* 12, 123-133.



- 64 Hale, D.W. (1994). Is X-Y recombination necessary for spermatocyte survival during mammalian spermatogenesis? *Cytogenet Cell Genet* 65, 278-282.
- 65 Morris, J.K., Alberman, E., Scott, C., and Jacobs, P. (2008). Is the prevalence of Klinefelter syndrome increasing? *Eur J Hum Genet* 16, 163-170.
- 66 Hunt, P.A. (2006). Meiosis in mammals: recombination, non-disjunction and the environment. *Biochem Soc Trans* 34, 574-577.
- 67 Pacchierotti, F., Adler, I.D., Eichenlaub-Ritter, U., and Mailhes, J.B. (2007). Gender effects on the incidence of aneuploidy in mammalian germ cells. *Environ Res* 104, 46-69.

**Table 1.** Meiotic chromosome abnormalities and chiasma count in 17 fertile donors analyzed by DAPI staining and multiplex-FISH (M-FISH)<sup>a</sup>

Donor	Age	Metaphase I							Metaphase II <sup>b</sup>							
		MI analyzed	Synaptic Abnorm. (%)		Numerical Abnorm. (%)		Structural Abnorm. (%)	Total Meiotic Abnorm. (%)	Mean chiasma counts ±SD	MII analyzed	Chromatid Separation (%)	Numerical Abnorm. (%)			Structural Abnorm. (%)	Total Meiotic Abnorm. (%)
			Sex chr.	Autosomes	Hyperploidy	Aneuploidy <sup>c</sup>						Diploidy	Hyperploidy	Aneuploidy <sup>c</sup>		
DAPI staining																
1	45	125	23 (18.4)	2 (1.6)	1 (0.8)	2 (1.6)	5 (4.0)	32 (25.6)	52.2±3.9							
2	39	203	33 (16.3)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (3.9)	44 (21.7)	50.3±2.1							
3	39	30	12 (40.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (40.0)	47.9±3.6							
4	47	115	30 (26.1)	1 (0.9)	1 (0.9)	2 (1.7)	2 (1.7)	35 (30.4)	52.3±2.6							
5	38	161	43 (26.7)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (4.3)	51 (31.7)	48.7±3.3							
6	30	62	2 (3.2)	1 (1.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (3.2)	5 (8.1)	50.8±2.1							
7	35	92	24 (26.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.1)	25 (27.2)	53.4±2.8							
8	36	56	5 (8.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (3.6)	7 (12.5)	52.0±2.8							
9	33	53	13 (24.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (7.5)	17 (32.1)	48.8±2.9							
10	43	25	5 (20.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.0)	6 (24.0)	47.4±2.9							
11	36	67	17 (25.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.5)	18 (26.9)	52.3±2.3							
12	37	71	31 (43.7)	3 (4.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (7.0)	39 (54.9)	50.0±2.7							
13	41	95	25 (26.3)	3 (3.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	28 (29.5)	50.9±2.5							
14	40	17	2 (11.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (11.8)	51.0±2.5							
15	41	70	12 (17.1)	0 (0.0)	2 (2.9)	4 (5.7)	3 (4.3)	19 (27.1)	47.6±4.0							
16	28	97	25 (25.8)	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (3.1)	29 (29.9)	48.3±3.0							
17	43	68	9 (13.2)	2 (2.9)	1 (1.5)	2 (2.9)	3 (4.4)	16 (23.5)	51.1±2.4							
<b>Total</b>	<b>38.3</b>	<b>1407</b>	<b>311 (22.1)</b>	<b>17 (1.2)</b>	<b>5 (0.4)</b>	<b>10 (0.7)</b>	<b>47 (3.3)</b>	<b>385 (27.4)</b>	<b>50.3±3.3</b>							
M-FISH																
8		74	15 (20.3)	1 (1.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (6.8)	21 (28.4)		44	4 (9.1)	2 (4.5)	4 (9.1)	8 (18.2)	1 (2.3)	15 (34.1)
13		126	35 (27.8)	6 (4.8)	3 (2.4)	6 (4.8)	3 (2.4)	50 (39.7)		103	6 (5.8)	0 (0.0)	2 (1.9)	4 (3.9)	11 (10.7)	21 (20.4)
16		117	30 (25.6)	1 (0.9)	1 (0.9)	2 (1.7)	4 (3.4)	37 (31.6)		101	7 (6.9)	0 (0.0)	11 (10.9)	22 (21.8)	3 (3.0)	32 (31.7)
<b>Total</b>		<b>317</b>	<b>80 (25.2)</b>	<b>8 (2.5)</b>	<b>4 (1.3)</b>	<b>8 (2.5)</b>	<b>12 (3.8)</b>	<b>108 (34.1)</b>		<b>248</b>	<b>17 (6.9)</b>	<b>2 (0.8)</b>	<b>17 (6.9)</b>	<b>34 (13.7)</b>	<b>15 (6.0)</b>	<b>68 (27.4)</b>

<sup>a</sup>Spermatocytes presenting more than one meiotic chromosome abnormality were counted in each category

<sup>b</sup>Spermatocytes II were only analyzed using M-FISH technique

<sup>c</sup>Conservative aneuploidy (2xhyperploidy)

**Table 2.** Abnormal karyotypes detected in 1407 spermatocytes I from 17 fertile males by DAPI staining<sup>a</sup>

	<b>Meiotic Abnormalities (%)</b>
<b>Synaptic Abnormalities</b>	<b>328 (23.3)</b>
<b>Sex chromosomes<sup>b</sup></b>	<b>311 (22.1)</b>
24,X,Y (297 cells)	
<b>Autosomes</b>	<b>17 (1.2)</b>
23,XY,II(B,B)(xma=1)	
23,XY,II(C,C)(xma=1) (7 cells)	
24,X,Y,II(C,C)(xma=1)	
23,XY,II(C,C)(xma=1),+ace <sup>c</sup>	
25,X,Y,II(C,C)(xma=1),II(C,C)(xma=1),-II(?15),+I(?15),+I(?15)	
23,XY,-II(G),+I(G) (2 cells)	
24,XY,-II(G),+I(G),+I(G)	
24,XY,-II(22),+I(?22),+I(?22)	
<b>Numerical Abnormalities</b>	<b>10 (0.7)</b>
<b>Diploidy</b>	<b>0 (0.0)</b>
<b>Hyperploidy</b>	<b>5 (0.4)</b>
25,X,Y,+I(C)	
25,X,Y,+II(E)	
24,XY,+I(?18) (2 cells)	
25,X,Y,+I(?21)	
Conservative aneuploidy (2xhyperploidy)	10 (0.7)
<b>Structural Abnormalities</b>	<b>47 (3.3)</b>
23,XY,+ace (27 cells)	
24,X,Y,+ace (8 cells)	
23,XY,+2ace	
23,XY,II(C,C)(xma=1),+ace <sup>c</sup>	
23,XY,chtb(X),+ace	
23,XY,chrb(1)	
23,XY,2chrb(C)	
24,X,Y,del(C)(q?)	
24,XY,+mar	
22,XY,III(?14q21q)	
23,XY,pvz(E)	
<b>Total meiotic abnormalities MI</b>	<b>385 (27.4)</b>

<sup>a</sup>Hypoploid spermatocytes were not included

<sup>b</sup>Fourteen spermatocytes I with separated X,Y had also other chromosome abnormalities

<sup>c</sup>One cell had both synaptic and structural abnormalities

**Table 3.** Abnormal karyotypes detected in 317 spermatocytes I and 248 spermatocytes II from three fertile males by multiplex fluorescent in situ hybridization (M-FISH)<sup>a</sup>

Metaphase I		Metaphase II	
Karyotype	Meiotic Abnorm. (%)	Karyotype	Meiotic Abnorm. (%)
<b>SYNAPTIC ABNORMALITIES</b>	<b>88 (27.8)</b>	<b>CHROMATID SEPARATION<sup>b</sup></b>	<b>17 (6.9)</b>
<b>Sex chromosomes</b>	<b>80 (25.2)</b>	23,-X,+Xcht,+Xcht,+21	
24,X,Y (75 cells)		22,-X,+Xcht	
24,X,Y,+ace(1)		22,X,-1,+1cht,+1cht	
24,X,Y,-II(21),+I(21)		22,Y,-2,+2cht,+2cht	
24,X,Y,+ace(22)		22,X,-3,+3cht,+3cht	
23,X,Y,-II(6),+ace(10),-II(21),+I(21)		22,X,-3,+3cht	
25,X,Y,+der(7)		22,X,-6,+6cht,+6cht	
<b>Autosomes</b>	<b>8 (2.5)</b>	20,X,-6,+6cht,+6cht,-7,+7cht,+7cht,-13,+13cht,+13cht	
23,XY,II(7,7)(xma=1)		22,Y,-7,+7cht,+7cht	
23,XY,II(8,8)(xma=1)		22,Y,chtb(7),-8,+8cht,+8cht,chtb(8)	
23,XY,-II(10),+I(10)		22,Y,-13,+13cht,+13cht	
23,XY,chr(3),-II(13),+I(13),+I(13)		21,+Xcht,-Y,+Ycht,+Ycht,-14,+14cht,+14cht	
23,XY,-II(21),+I(21)		22,Y,-22,+22cht	
24,X,Y,-II(21),+I(21)		22,Y,+ace(7),-22,+22cht,+22cht	
23,X,Y,-II(6),+ace(10),-II(21),+I(21)			
24,XY,-II(22),+I(22),+I(22)			
<b>NUMERICAL ABNORMALITIES</b>	<b>8 (2.5)</b>	<b>NUMERICAL ABNORMALITIES</b>	<b>36 (14.5)</b>
<b>Diploidy</b>	<b>0 (0.0)</b>	<b>Diploidy</b>	<b>2 (0.8)</b>
<b>Hyperploidy</b>	<b>4 (1.3)</b>	46,XY (2 cells)	
24,X,II(Y)		<b>Hyperploidy</b>	<b>17 (6.9)</b>
23,XY,-II(4),+?I(8)		24,XY (3 cells)	
24,XY,+?I(19)		24,XY,-6,+7,-11,+12	
24,XY,+I(22)		24,XY,chtb(X)(q?)	
Conservative aneuploidy (2xhyperploidy)	8 (2.5)	23,-X or -Y,+9	
		23,-X,+Xcht,+Xcht,+21	
		23,Y,+Xcht	
		23,X,+Xcht	
		21,+Xcht,-Y,+Ycht,+Ycht,-14,+14cht,+14cht	
		23,X,+4cht	
		23,Y,+15cht	
		23,X,+16cht	
		23,X,+21cht	
		23,Y,+21cht	
		Conservative aneuploidy (2xhyperploidy)	34 (13.7)
<b>STRUCTURAL ABNORMALITIES</b>	<b>12 (3.8)</b>	<b>STRUCTURAL ABNORMALITIES</b>	<b>15 (6.0)</b>
24,X,Y,+ace(1)		23,X,+ace(1)	
23,XY,+ace(4)		22,Y,-4,+ace(4)	
23,XY,+ace(6)		23,X,+ace(5)	
23,XY,+ace(10)		23,Y,+ace(6)	
22,XY,+ace(10),-II(14)		22,Y,+ace(7),-22,+22cht,+22cht	
23,X,Y,-II(6),+ace(10),-II(21),+I(21)		24,XY,chtb(X)(q?)	
23,XY,+ace(16)		23,X,chr(1)	
24,X,Y,+ace(22)		23,Y,2chr(1)	
23,XY,chr(3),-II(13),+I(13),+I(13)		22,Y,chtb(7),-8,+8cht,+8cht,chtb(8)	
23,XY,chr(7)		23,Y,chtb(11)	
25,X,Y,+der(7)		23,Y,chtb(13)(q?)	
24,XY,+mar		23,X,del(8)(q?)	
		24,Y,+der(?14)	
<b>TOTAL MEIOTIC ABNORMALITIES MI</b>	<b>108 (34.1)</b>	<b>TOTAL MEIOTIC ABNORMALITIES MII</b>	<b>68 (27.4)</b>

<sup>a</sup>Spermatocytes presenting more than one meiotic chromosome abnormality were listed in each category. Hypoploid spermatocytes were not included.

**Table 4.** Frequencies (%) of meiotic chromosome abnormalities in spermatocytes I from fertile and infertile men series

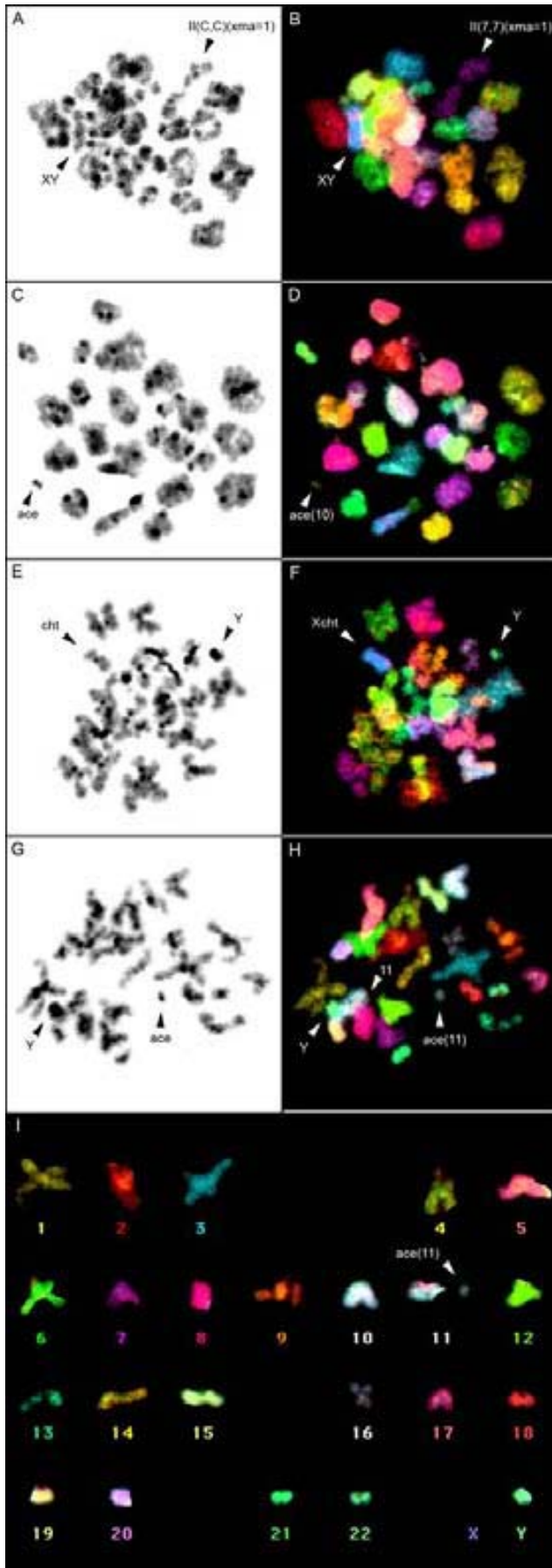
	Fertile men		Infertile and sterile men
	Present work	Other authors	
<b>Synaptic abnormalities</b>			
X,Y	22.1*	15.0 <sup>a</sup>	16.5 <sup>b</sup>
Desynaptic bivalents	0.9	0.2 <sup>a</sup>	ND
Autosomal univalents	0.4	0.6 <sup>a</sup>	0.4 <sup>a</sup>
<b>Hiperploidy</b>	0.4	0.0 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>
<b>Structural abnormalities</b>	3.3*	0.0 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>

ND= mean frequency not described, ranging from 0% to 100% depending on the patient

<sup>a</sup>Skakkebaek *et al* (1973)<sup>10</sup>

<sup>b</sup>Luciani (1970),<sup>18</sup> Skakkebaek *et al* (1973),<sup>10</sup> Chandley *et al* (1976),<sup>11</sup> Laurie and Hultén (1985)<sup>13</sup>

\*Statistically significant higher (P<0.001) compared with other series of both fertile and infertile men

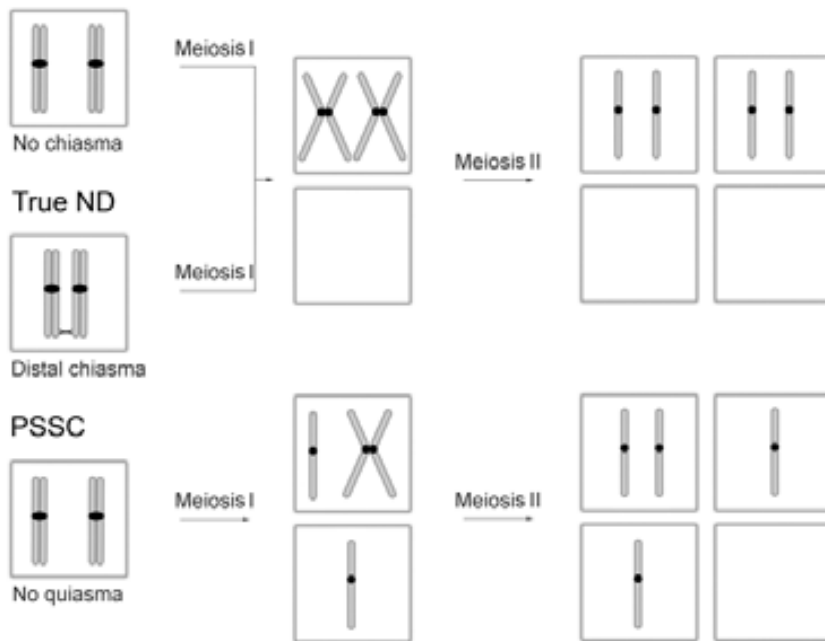


**Figure 1. Human spermatocytes with meiotic chromosome abnormalities.**

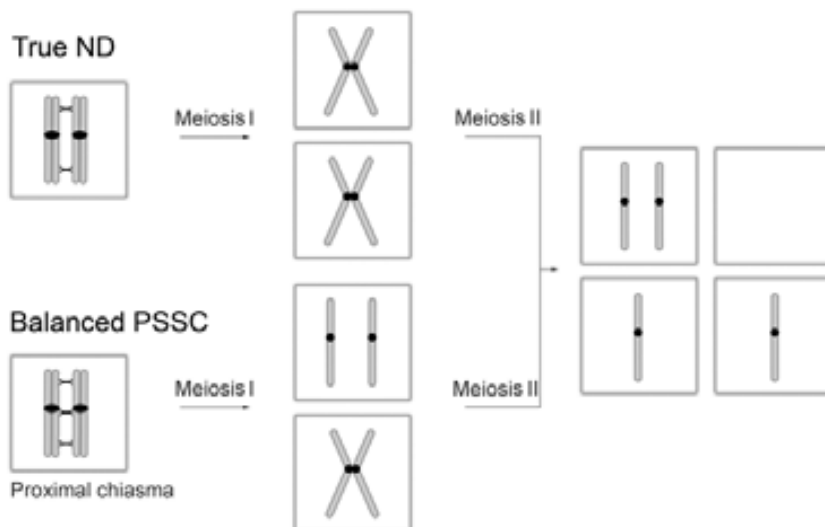
(A) Metaphase I spermatocyte containing a desynaptic medium-sized bivalent with one single chiasma, identified as bivalent 7 (B). (C) Metaphase I spermatocyte showing an acentric fragment, identified as chromosome 10 (D). (E) Metaphase II spermatocyte with an extra chromatid, classified as X chromatid (F). (G) Metaphase II spermatocyte showing a chromatid break affecting chromosome 11 (H,I). (A,C,E,G) DAPI counterstain. (B,D,F,H) M-FISH images. (I) M-FISH karyotype.

## MEIOSIS I NONDISJUNCTION

### Achiasmate ND



## MEIOSIS II NONDISJUNCTION



**Figure 2. Nondisjunction (ND) mechanisms in human male meiosis.**

During meiosis I, achiasmate ND originates by random segregation of two homologues due to the absence of chiasma, true ND is probably caused by abnormal segregation of lineal bivalents with a single distal chiasma and premature separation of sister chromatids (PSSC) arises by sister chromatid segregation in meiosis I from a univalent. In meiosis II, true ND originates by abnormal segregation of chromosomes that maintain their cohesion, and balanced PSSC causes the random segregation of sister chromatids due to absence of cohesion.





## **Article 2**

Centromere-specific multicolour fluorescence in situ hybridization  
on human spermatocyte I and II metaphases

Human Reproduction (2009): en premsa  
(doi: [10.1093/humrep/dep092](https://doi.org/10.1093/humrep/dep092))



# Centromere-specific multicolour fluorescence *in situ* hybridization on human spermatocyte I and II metaphases

L. Uroz<sup>1</sup>, T. Liehr<sup>2</sup>, K. Mrasek<sup>2</sup>, and C. Templado<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain <sup>2</sup>Jena University Hospital, Institute of Human Genetics and Anthropology, Kollegiengasse 10, 07743 Jena, Germany

<sup>3</sup>Correspondence address. Tel: +34-935811905; Fax: +34-935811025; E-mail: cristina.templado@uab.es

**BACKGROUND:** Most meiotic studies in metaphase spermatocytes have been carried out with classic cytogenetic techniques. The aim of this work was to adjust the centromere-specific multicolour fluorescence *in situ* hybridization (cenM-FISH) procedure to spermatocyte metaphases I and II in order to improve the identification of meiotic chromosome abnormalities.

**METHODS:** A total of 168 spermatocytes I and 66 spermatocytes II from two fertile males have been studied using cenM-FISH.

**RESULTS:** The mean frequency of meiotic abnormalities (synaptic, numerical and structural errors) found in metaphases I and II was 22.1 and 3.0%, respectively. The cenM-FISH technique has not only enabled the individual identification of chromosomes involved in meiotic disorders, but also increased the number of analysable cells, principally at metaphase II stage.

**CONCLUSIONS:** CenM-FISH is a useful tool to study the meiotic chromosomal disorders and mechanisms leading to chromosomally abnormal spermatozoa.

**Key words:** meiosis / centromere-specific multicolour fluorescence *in situ* hybridization / human spermatocytes / metaphase I / metaphase II

## Introduction

Meiotic abnormalities during gametogenesis may lead to infertility and affected offspring. As previously reported, around 70–80% of *de novo* structural abnormalities are paternal in origin (Olson and Magenis, 1988; Thomas *et al.*, 2006). Thus, cytogenetic analyses in spermatocytes at metaphase I (MI) and metaphase II (MII) are a useful tool for a better understanding of the meiotic mechanisms leading to abnormal spermatozoa.

Until now, classic cytogenetic techniques have been applied to meiotic preparations, especially in MI spermatocytes from infertile and sterile males (Skakkebaek *et al.*, 1973; Chandley *et al.*, 1976; Templado *et al.*, 1976, 1981; Egozcue *et al.*, 1983), in order to detect meiotic abnormalities that may result in male infertility or sterility. Only two studies have analysed structural and numerical abnormalities in spermatocytes II from infertile males using either orcein (Guichaoua *et al.*, 1986) or triple staining (Quinacrine mustard fluorescence, Orcein staining and C-banding) (Laurie *et al.*, 1985). Studies in spermatocytes II are rare, since MII figures are scarce and

usually difficult to interpret because of their high chromosome spiralization and overlapping. These classic cytogenetic studies classified MI and MII chromosomes into groups depending on their size, and only a few chromosomes could be identified using conventional staining techniques (Laurie and Hultén, 1985; Laurie *et al.*, 1985).

The centromere-specific multicolour fluorescence *in situ* hybridization (cenM-FISH) technique, initially developed to use in somatic cells (Nietzel *et al.*, 2001), has been carried out in pachytene spermatocytes to analyse meiotic recombination rates (Oliver-Bonet *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2006) and in MII oocytes (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2005). This technique allows the simultaneous identification of all human centromeres by their individual combination of centromeric satellite DNA probes labelled with five different fluorochromes.

Here, we have adjusted the cenM-FISH method to study human spermatocyte I and II metaphases from two fertile males. The main purpose of this work was to determine the limitations and advantages of the cenM-FISH technique in the individual identification of chromosomes involved in meiotic abnormalities detected in spermatocyte karyotypes.

## Materials and Methods

### Meiotic preparations

Testicular biopsy was obtained under local anaesthesia from two healthy fertile donors. The study was approved by our Institutional Ethics Committee, and both donors signed an informed consent form.

Spermatocytes were fixed using the air-drying technique (Evans et al., 1964) with some modifications as previously described by us (Uroz et al., 2008). Slides were preserved at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

### CenM-FISH technique

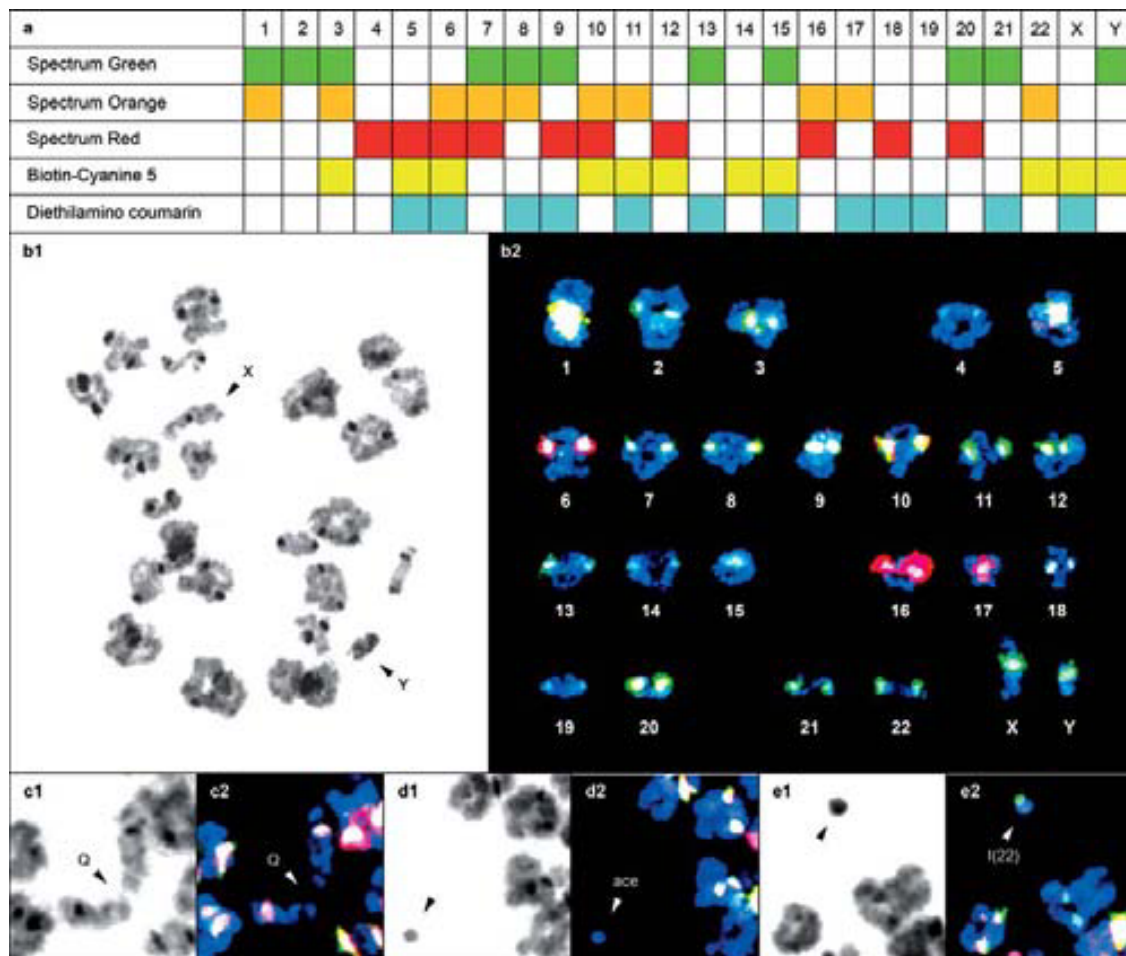
CenM-FISH was carried out with non-commercial centromere- or subcentromere-specific probes labelled using different combinations of five fluorochromes. All DNA probes are mixed and hybridized simultaneously, allowing identification of each chromosome in one single step. Probes were prepared using the procedure described elsewhere (Nietzel et al., 2001), with some modifications in the labelling scheme (Fig. 1a) (Oliver-Bonet et al., 2003).

Preparations were washed for 5 min in  $2\times$  standard saline citrate (SSC)/0.1% NP-40 and dehydrated in an ethanol series. Cytoplasm was removed using 0.005% pepsin in 0.01 N HCl at  $37^{\circ}\text{C}$  for 5 min. Slides were washed in  $1\times$  phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min, treated with 1% formaldehyde for 10 min (cell post-fixation), washed in  $1\times$  PBS and dehydrated in an ethanol series. Slides were denatured in 70% formamide/ $2\times$  SSC at  $73^{\circ}\text{C}$  for 1.5 min and dehydrated in an ethanol series. CenM-FISH probes were applied to each slide, and allowed to hybridize overnight at  $37^{\circ}\text{C}$  in a moist chamber.

After hybridization, the slides were washed in  $0.4\times$  SSC at  $64\text{--}65^{\circ}\text{C}$  for 5 min, followed by 5 min in  $4\times$  SSC/0.05% Tween 20 at room temperature. Biotin labelling detection was performed using a Cy5-avidin system. Finally, the slides were counterstained with antifade solution containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

### Data analysis

All spermatocytes at metaphase were captured and evaluated using a Zeiss Axioplan microscope (Zeiss, Jena, Germany) equipped with a charge-coupled device camera and an image analysis system



**Figure 1** (a) Labelling scheme of the centromeric probes used in this work, showing fluorochrome combination for each human chromosome centromere. (b–e) Spermatocytes I stained with DAPI (1) and hybridized using cenM-FISH (2). Metaphase I spermatocyte showing sex chromosomes as univalents (b1) and its karyotype (b2), and partial spermatocyte I metaphases with bivalent 9 with a single distal chiasma in the q-arm (c), acentric fragment of unknown origin (d) and extra univalent 22 (e).

(MetaSystems, Altlußheim, Germany). Metaphases with a high number of overlapping chromosomes were not included in this study. Chromosome morphology was analysed in every metaphase using DAPI counterstain, and each chromosome was identified using cenM-FISH. Chromosomes 13 and 21 had the same fluorochrome combination and they were differentiated by their size. Chromosomal abnormalities were karyotyped according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Schaffer and Tommerup, 2005). Since hypoploidy may be partly caused by technical artefacts, the frequency of conservative aneuploidy was estimated as twice that of hyperploidy (Márquez *et al.*, 1996).

Meiotic chromosome abnormalities detected in hypoploid cells were included in their corresponding abnormality category.

## Results

High hybridization efficiency and consistent signals were observed for all chromosome centromeres. Spermatocyte I metaphases showed one single signal in each homologous chromosome and spermatocyte II metaphases had one signal in each sister chromatid. A total of 234 spermatocytes I and II have been analysed using the cenM-FISH technique: 168 at MI and 66 at MII. The global results for the spermatocyte analysis are shown in Table I. Synaptic errors were detected for sex chromosomes as two separated univalents in 28 MI cells (16.7%) (Fig. 1b), and for autosomes as one bivalent with a single chiasma (0.6%) (Fig. 1c). The percentages of structural abnormalities in MI and MII were 3.6 and 3.0%, respectively. The two types of structural aberrations observed were acentric fragments (Fig. 1d) and supernumerary marker chromosomes; hyperploidy was observed in two spermatocytes I (1.2%) (Fig. 1e). Thus, conservative aneuploidy was 2.4% at MI and 0% at MII.

## Discussion

CenM-FISH technique has enabled individual chromosome identification by its own colour pattern in MI and MII spermatocytes and improved the characterization of synaptic, numerical and most structural abnormalities. Chromosomes 13 and 21 have high similarities in their  $\alpha$ -satellite sequences and present the same fluorochrome combination in cenM-FISH (Nietzel *et al.*, 2001), but they can be easily identified on the basis of their size.

The cenM-FISH technique on spermatocyte metaphases permitted an analysable MII/MI ratio (0.39) higher than that previously described in the only classic study reporting the number of both MI and MII (ratio 0.02) (Luciani, 1970). However, this difference could be due, in part, to the fact that the latter studies were carried out in infertile and sterile males.

CenM-FISH is a powerful method to detect both synaptic and numeric abnormalities and to identify the implicated chromosomes, since this technique is focused on centromeric regions and these disorders affect whole chromosomes and chromatids. The most common synaptic abnormality found in MI is the presence of separated sex chromosomes, showing similar frequencies to that found in previous meiotic studies using classic cytogenetic techniques (Skakkebaek *et al.*, 1973; Laurie and Hultén, 1985). Synaptic disorders, only analysable during meiosis, are common in certain infertile and sterile males (Templado *et al.*, 1976; Egozcue *et al.*, 2005).

**Table I** Synaptic, numerical and structural abnormalities in human spermatocyte metaphases I (MI) and II (MII) karyotyped by cenM-FISH in two fertile males

	Metaphase I				Metaphase II			
	Total MI analysed	Synaptic abnormalities (%)	Hyperploidy (%)	Structural abnormalities (%)	Total MII analysed	Hyperploidy (%)	Structural abnormalities (%)	Total MII analysed
Donor 1	99	16 (16.2) MI,24,X,Y (16 cells)	0 (0.0)	4 (4.0) MI,23,XY,+ace (3 cells) MI,24,XY,+der(12)	30	0 (0.0)	1 (3.3) MII,23,Y,+ace	30
Donor 2	69	12 (17.4) MI,24,X,Y (12 cells)	2 (2.9) MI,24,XY,+I(22) MI,24,XY,+I(Y)	2 (2.9) MI,23,XY,+ace (2 cells)	36	0 (0.0)	1 (2.8) MII,23,Y,+ace	36
Total	168	28 (16.7)	2 (1.2)	6 (3.6)	66	0 (0.0)	2 (3.0)	66

<sup>a</sup>Spermatocytes I with desynapsis and karyotype MI,20,XY,-II(3),-II(14),-II(22),II(9,9)(xma = 1)(qter).

Hence, the application of cenM-FISH in these cases will help interpret meiotic figures and determine affected chromosomes.

The low number of numerical abnormalities found in this work is in accordance with the low percentage of conservative aneuploidy described in spermatozoa from fertile males (1.8 and 4.5% in sperm karyotypes and FISH on spermatozoa, respectively) (reviewed by Templado et al., 2005). Interestingly, the existence of hyperploid spermatocyte I with an extra univalent indicates the occurrence of non-disjunction events during spermatogonial divisions.

The cenM-FISH technique has some limitations in the detection of structural chromosome rearrangements, since intrachromosomal and interchromosomal rearrangements cannot be detected and the origin of acentric fragments cannot be identified. Nevertheless, this technique is especially helpful in distinguishing between centric and acentric fragments (Fig. 1d and e).

The frequency of structural aberrations (3.6% at MI and 3.0% at MII) is similar to those reported in MII spermatocytes (5.5%) (Laurie et al., 1985) and in sperm karyotypes (mean 6.6%) (Martin et al., 1987; Brandriff et al., 1988; Estop et al., 1995; reviewed by Templado et al., 2005). About 88% of structural abnormalities observed in spermatocytes I and II were acentric fragments. Other studies have also described non-rejoined breaks as the main structural aberration both in spermatocytes II (acentric fragments) (Laurie et al., 1985) and in spermatozoa (chromosome breaks, followed by acentric fragments) (reviewed by Templado et al., 2005). Although some authors (Brandriff et al., 1988; Estop et al., 1995) hypothesized that non-rejoined aberrations originated mainly in spermiogenesis, the only spermatogenic stage lacking DNA repair, our results indicate that these abnormalities also occur in earlier spermatogenic stages, such as spermatogonia and spermatocytes. Further meiotic studies on spermatocytes are needed to clarify the origin of chromosome abnormalities in spermatozoa.

In conclusion, cenM-FISH on meiotic metaphases makes it possible to: (i) increase the number of analysable spermatocytes at MI and mainly at MII; (ii) characterize numerical and synaptic abnormalities in spermatocytes I and II and (iii) distinguish acentric fragments from supernumerary marker chromosomes, allowing chromosome identification of the latter. The application of cenM-FISH to spermatocyte metaphases is a suitable technique to characterize meiotic abnormalities and analyse both the origin of numerical and structural abnormalities and the meiotic non-disjunction mechanisms.

## Authors contribution

L.U., T.L. and K.M.: experiment performing, manuscript writing; C.T.: experiment design, manuscript writing.

## Acknowledgement

The authors wish to thank Monika Ziegler and Katharina Kreskowski for their collaboration in this work.

## Funding

This research was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (BF12002-01193) and the Generalitat de Catalunya, Spain (2005SGR-00495, 2005FI00399 and 2007BE-100087).

## References

- Brandriff BF, Gordon LA, Moore D II, Carrano AV. An analysis of structural aberrations in human sperm chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1988; **47**:29–36.
- Chandley AC, Maclean N, Edmond P, Fletcher J, Watson GS. Cyto genetics and infertility in man. II. Testicular histology and meiosis. *Ann Hum Genet* 1976; **40**:165–176.
- Egozcue J, Templado C, Vidal F, Navarro J, Morer-Fargas F, Marina S. Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum Genet* 1983; **65**:185–188.
- Egozcue J, Sarrate Z, Codina-Pascual M, Egozcue S, Oliver-Bonet M, Blanco J, Navarro J, Benet J, Vidal F. Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet Genome Res* 2005; **111**:337–342.
- Estop AM, Márquez C, Munné S, Navarro J, Cieply K, Van Kirk V, Martorell MR, Benet J, Templado C. An analysis of human sperm chromosome breakpoints. *Am J Hum Genet* 1995; **56**:452–460.
- Evans EP, Breckon G, Ford CE. An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* 1964; **15**:289–294.
- Guichaoua M, Ayme S, Luciani JM. Direct estimation of the non-disjunction rate at first meiotic division in the human male. Preliminary results. *Hum Genet* 1986; **72**:174–176.
- Gutiérrez-Mateo C, Benet J, Starke H, Oliver-Bonet M, Munné S, Liehr T, Navarro J. Karyotyping of human oocytes by cenM-FISH, a new 24-colour centromere-specific technique. *Hum Reprod* 2005; **20**:3395–3401.
- Laurie DA, Hultén MA. Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann Hum Genet* 1985; **49**:189–201.
- Laurie DA, Firkett CL, Hultén MA. A direct cytogenetic technique for assessing the rate of first meiotic non-disjunction in the human male by the analysis of cells at metaphase II. *Ann Hum Genet* 1985; **49**:23–29.
- Luciani JM. Meiotic chromosomes of humans. II. The nucleolus. The chiasmata. 3. Male sterility. *Ann Genet* 1970; **13**:169–182.
- Márquez C, Egozcue J, Martorell MR, Moreno V, Templado C. Colcemid increases the frequency of chromosome abnormalities in human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 1996; **72**:164–170.
- Martin RH, Rademaker AWW, Hildebrand K, Long-Simpson L, Peterson D, Yamamoto J. Variation in the frequency and type of sperm chromosomal abnormalities among normal men. *Hum Genet* 1987; **77**:108–114.
- Nietzel A, Rocchi M, Starke H, Heller A, Fiedler W, Wlodarska I, Loncarevic IF, Beensen V, Claussen U, Liehr T. A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet* 2001; **108**:199–204.
- Oliver-Bonet M, Liehr T, Nietzel A, Heller A, Starke H, Claussen U, Codina-Pascual M, Pujol A, Abad C, Egozcue J et al. Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *Eur J Hum Genet* 2003; **11**:879–883.
- Olson S, Magenis R. Preferential paternal origin of *de novo* structural chromosome rearrangements. In: Daniel A (ed). *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. New York: Alan R. Liss, Inc., 1988, 583–599.
- Schaffer LG, Tommerup N. *ISCN (2005): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel, Switzerland: S. Karger, 2005.
- Skakkebaek NE, Bryant JI, Philip J. Studies on meiotic chromosomes in infertile men and controls with normal karyotypes. *J Reprod Fertil* 1973; **35**:23–36.
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Turek P, Ko E, Rademaker A, Martin RH. Variation in MLH1 distribution in recombination maps for individual chromosomes from human males. *Hum Mol Genet* 2006; **15**:2376–2391.
- Templado C, Marina S, Egozcue J. Three cases of low chiasma frequency associated with infertility in man. *Andrologia* 1976; **8**:285–289.

- Templado C, Vidal F, Marina S, Pomerol JM, Egozcue J. A new meiotic mutation: desynapsis of individual bivalents. *Hum Genet* 1981;**59**:345–348.
- Templado C, Bosch M, Benet J. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 2005;**111**:199–205.
- Thomas NS, Durkie M, Van Zyl B, Sanford R, Potts G, Youings S, Dennis N, Jacobs P. Parental and chromosomal origin of unbalanced *de novo* structural chromosome abnormalities in man. *Hum Genet* 2006;**119**:444–450.
- Uroz L, Rajmil O, Templado C. Premature separation of sister chromatids in human male meiosis. *Hum Reprod* 2008;**23**:982–987.
- Submitted on February 2, 2009; resubmitted on March 20, 2009; accepted on March 24, 2009





## **Article 3**

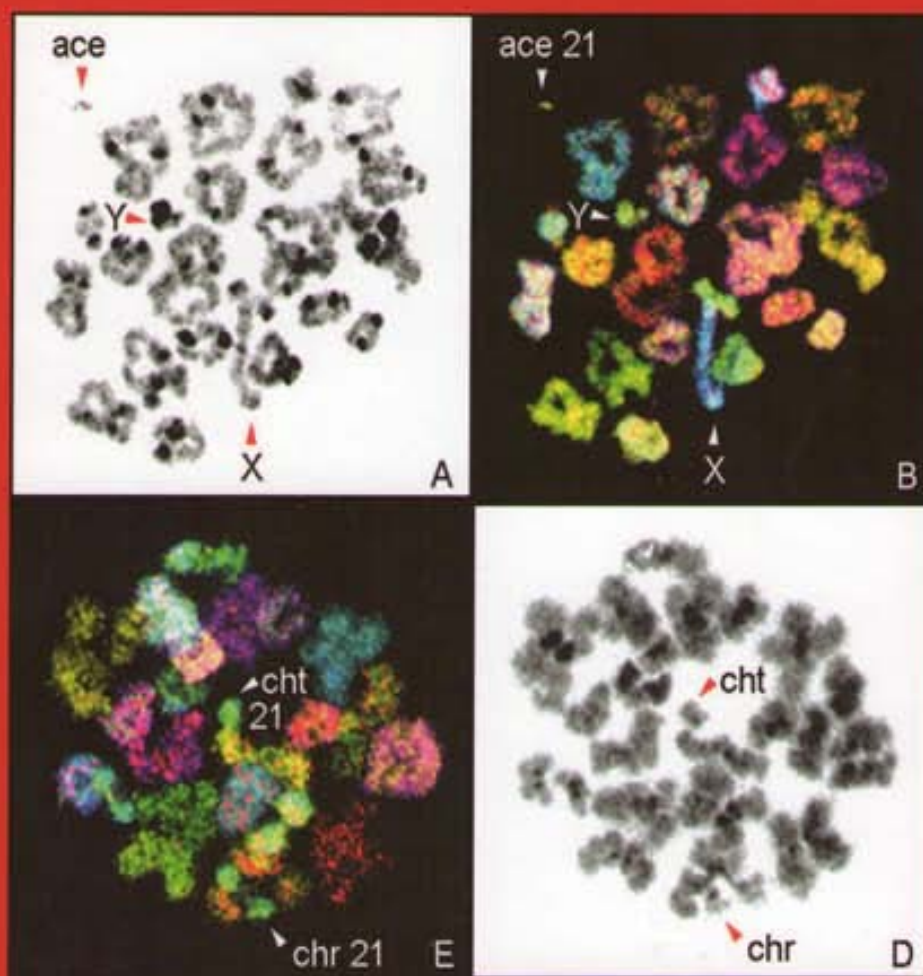
Premature separation of sister chromatids  
in human male meiosis

Human Reproduction (2008) 23: 982-987



# Human Reproduction

Volume 23, Number 4 April 2008

[www.humrep.oxfordjournals.org](http://www.humrep.oxfordjournals.org)OXFORD  OPEN

**About the cover**

The front cover shows meiotic chromosomal abnormalities in human spermatocytes at metaphase I (top row) and metaphase II (bottom) analysed using multiplex-FISH, counterstained with DAPI-III. For further details see Uroz *et al.*, pp. 982-987

# Premature separation of sister chromatids in human male meiosis

Laia Uroz<sup>1</sup>, Osvaldo Rajmil<sup>2</sup> and Cristina Templado<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Servei d'Andrologia, Fundació Puigvert, 08025 Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Correspondence address. E-mail: cristina.templado@uab.es

**BACKGROUND:** Meiotic disorders result in meiotic arrest and aneuploid spermatozoa, leading to male infertility, spontaneous abortions or affected offspring. We carried out meiotic studies in an infertile male to detect meiotic non-disjunction mechanisms leading to aneuploidy in spermatogenesis. **METHODS AND RESULTS:** Meiotic studies were performed in testicular and semen samples from a 38-year-old teratozoospermic male with normal somatic karyotype and a history of spontaneous abortions. We analysed 262 spermatocytes (69 pachytene cells, 106 metaphases I (MI), 87 metaphases II (MII)) by multiplex-fluorescence *in situ* hybridization and 20 193 spermatozoa by multicolour-FISH with probes for chromosomes 9, 10, 15, 21, X and Y. The results indicate high increase of 21 and XY disomies, as well as diploidy in both spermatocytes at MII and spermatozoa ( $P < 0.0001$ ). Achiasmate segregation of sex chromosomes was found in 3.4% of spermatocytes II, preceded by early-dissociated XY bivalent at MI (41.5% of cells). We also detected premature separation of sister chromatids (PSSC) in 4.6% of MII. **CONCLUSION:** This individual presents high levels of numerical abnormalities in germ cells, caused by two different nondisjunction mechanisms during meiosis I. To our knowledge, this work represents the first time that PSSC has been demonstrated in human male germ cells.

**Keywords:** aneuploidy; male infertility; meiosis; nondisjunction; premature separation of sister chromatids

## Introduction

Meiotic chromosome disorders causing human male infertility and sterility are abnormalities present only in germ cells and not detectable in somatic karyotype. Meiotic chromosome disorders lead to meiotic arrest, resulting in oligozoospermia and azoospermia and spermatozoa with numerical chromosomal abnormalities, resulting in spontaneous abortions or affected offspring.

The most common chromosome abnormalities in spontaneous abortions are sex-chromosome monosomy (45,X) and trisomies 16, 21 and 22; whereas among newborns, trisomy 21 and sex-chromosome trisomies account for the great majority of additional chromosomes (Hassold and Hunt, 2001). Although autosomal aneuploidies are preferentially of maternal origin, paternal errors account for nearly 50% of 47,XXYs (Arnedo *et al.*, 2006), 75–80% of 45,Xs (Hassold *et al.*, 1992; Martínez-Pasarell *et al.*, 1999) and 100% of 47,XYYs. Most of the aneuploidies in humans originate at meiosis and the main mechanism leading to aneuploidy in spermatozoa is considered nondisjunction (Márquez *et al.*, 1996). Several possible patterns of abnormal segregation have been described in meiosis (Hassold and Hunt, 2001), including 'true' nondisjunction, achiasmate nondisjunction

and premature separation of sister chromatids (PSSC) (Angell, 1991). The relevance of each nondisjunctional mechanism varies depending on the affected chromosomes (Hassold *et al.*, 2007).

Most meiotic studies in humans have been carried out on metaphase I (MI) spermatocytes to elucidate the etiology of male infertility (Skakkebaek *et al.*, 1973; Chandley *et al.*, 1976; Templado *et al.*, 1976; Egozcue *et al.*, 1983, 2000). These classical cytogenetic studies indicated that 18.5% of infertile patients have meiotic arrest (Egozcue *et al.*, 1983) and 6–8% show meiotic abnormalities in spermatocytes I (Egozcue *et al.*, 2000), which can represent up to 17.5% in oligoasthenozoospermic males (Vendrell *et al.*, 1999). In accordance with these results, fluorescent *in situ* hybridization (FISH) studies in decondensed sperm nuclei have shown increased levels of aneuploidy in infertile patients with abnormal sperm parameters (Egozcue *et al.*, 2000) and meiotic abnormalities in spermatocyte I (Aran *et al.*, 1999), and in couples with recurrent abortions (Rubio *et al.*, 1999).

Cytogenetic studies in MI and MII spermatocytes provide a useful tool for detecting meiotic chromosome abnormalities (numerical and structural) and synaptic errors, as well as meiotic chromosome missegregation. This approach

additionally facilitates analysis of recombination levels by counting chiasmata at MI. Recently, the application of multiplex-FISH (M-FISH) (Speicher *et al.*, 1996) to meiotic chromosomes (Sarrate *et al.*, 2004) has allowed the identification of individual chromosomes, characterization of structural chromosome abnormalities and analysis of chiasmata pattern for individual bivalents. Moreover, this technique increases the number of analysable spermatogenic cells, particularly those at MII stage.

Here, we report on meiotic abnormalities analysed using M-FISH in spermatocytes I and spermatocytes II and multicolour FISH in spermatozoa from an infertile male with normal somatic karyotype and a history of spontaneous abortions, with special emphasis on the detection of meiotic nondisjunction mechanisms leading to aneuploidy.

## Material and Methods

### Case report

Testicular tissue and a sperm sample were obtained from a 38-year-old infertile male with normal somatic karyotype and normal FSH profile. The patient was referred to our laboratory as his wife had had two spontaneous abortions that had not been karyotyped. His semen analysis showed teratozoospermia (1% of morphologically normal forms, according to the strict criteria) (Kruger *et al.*, 1988). Sperm count ( $28 \times 10^6$  spermatozoa/ml) and progressive motility ( $15.4 \times 10^6$  spermatozoa/ml of forward motility) were within the normal parameters (WHO, 1999).

The donor had no history of exposure to any known mutagens, clastogens, radiation or drugs. The current study was approved by our university's Ethics Committee, and informed consent was obtained from the patient before undergoing this study.

### Control donors

FISH analysis of sperm aneuploidies for chromosomes 6, 21, X and Y in 18 healthy donors aged 24–74 years (control group) has already been reported by our group (Bosch *et al.*, 2001).

### Meiotic preparations

Testicular biopsy was obtained under local anesthesia and processed using a modification of the technique described by Evans *et al.* (1964). Briefly, testicular tissue was treated with hypotonic solution (1% sodium citrate) for 30 min and minced carefully for 15 min. After sedimentation of the seminiferous tubules, the cells were fixed three times in methanol:glacial acetic acid (3:1) and smeared onto clean slides.

### M-FISH in spermatocytes

Slides were treated with 0.005% pepsin for 2 min and subjected to M-FISH protocol in accordance with manufacturer's instructions (SpectraVysion Assay, Vysis Inc; Downers Grove, IL, USA). Spermatogenic cells were counterstained with 4,6-diamino-2-phenylindole in antifade solution (DAPI III, Vysis Inc; Downers Grove, IL, USA). An epifluorescence microscope (Olympus Bx60, Hamburg, Germany) and a Power Macintosh G3 with SpectraVysion software (Digital Scientific, Cambridge, UK) were used for cell evaluation and image capturing. Each spermatocyte was previously analysed using DAPI counterstain to count chiasmata and to detect most of the meiotic abnormalities, given the good preservation of chromatin. M-FISH analysis of the same cells allowed chromosome identification. Chromosomal abnormalities were karyotyped as described by the

International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) (Schaffer LG, 2005).

### Sperm preparations

The semen sample was washed three times in hypotonic solution (0.075 M KCl), fixed three times with methanol:glacial acetic acid (3:1), smeared onto clean slides and preserved at  $-20^\circ\text{C}$  until *in situ* hybridization.

### Probes

FISH analysis was performed using centromeric probes for chromosomes 9 (CEP9, Spectrum Green), 10 (CEP10, Spectrum Aqua), 15 (CEP15, Spectrum Green), X (CEPX, Spectrum Aqua) and Y (CEPY SatIII, Spectrum Orange), and a locus-specific probe for chromosome 21 (LSI21, Spectrum Orange) (Vysis Inc; Downers Grove, IL, USA).

### FISH in spermatozoa

Slides were treated with 0.005% pepsin for 5 min, washed twice with sodium standard citrate (SSC), and post-fixed with 1% formaldehyde for 2 min, washed twice in phosphate-buffered saline and dehydrated in an ethanol series. Sperm nuclei were decondensed in a solution of 5 mM dithiothreitol, 0.1 M Tris (pH 7.4) and 1% Triton X-100 at  $37^\circ\text{C}$  for 15–16 min, washed with  $2 \times \text{SSC}$  and dehydrated in an ethanol series. Sperm DNA was denatured with 70% formamide at  $74^\circ\text{C}$  for 5 min and hybridized in a moist chamber at  $37^\circ\text{C}$  for 72 h, with probes for chromosomes 15, X and Y on one slide, and probes for chromosomes 9, 10 and 21 on another. Post-hybridization washes followed manufacturer's instructions. Sperm nuclei were counterstained with DAPI in antifade solution (DAPI II, Vysis Inc; Downers Grove, IL, USA). An epifluorescence microscope (Olympus Bx60, Hamburg, Germany) was used for signal counting and a Power Macintosh G3 with Smartcapture software (Digital Scientific, Cambridge, UK) was used for image capturing. A minimum of 10 000 spermatozoa was scored per assay, using strict criteria that we have previously described (Bosch *et al.*, 2001). All ambiguous signals were examined by a second observer.

### Statistical analysis

To determine whether there were significant differences in the mean number of chiasmata between normal spermatocytes and those with dissociated sex chromosomes, a Student's *t*-test was applied.

To compare disomy and diploidy frequencies in spermatozoa found in our patient with those obtained in the control group, we used the Chi-square test with Yates correction.

To investigate whether there were significant differences in the frequencies of numerical abnormalities between MII spermatocytes and spermatozoa, we used the Chi-square test with Bonferroni correction.

A value of  $P < 0.05$  was considered significant.

## Results

A total of 262 spermatocytes were analysed by M-FISH at different meiotic stages: 69 at pachytene, 106 at MI and 87 at MII. FISH analysis using probes for chromosomes 9, 10, 15, 21, X and Y was carried out in 20 193 decondensed sperm nuclei.

### Chromosome abnormalities in MI, MII and spermatozoa

Table I summarizes the numerical and structural chromosome abnormalities observed in spermatocytes I and II at metaphase. The frequency of structural abnormalities was 7.5% at MI and

**Table I.** Meiotic abnormalities detected in spermatocytes I and II by multiplex fluorescent *in situ* hybridization in an infertile male.

	Metaphase I	Metaphase II
<b>Normal</b>	<b>85 (80.2%)</b>	<b>66 (75.9%)</b>
<b>Structural abnormalities</b>	<b>8 (7.5%)</b> MI,23,XY,chr(1)(q) (3 cells) MI,23,XY,chr(7)(p),+ace(14) MI,23,XY,chr(15)(q11) MI,24,X,Y,+ace(21) MI,24,X,Y,chr(10)(q12~21),-II(18),+I(18) MI,24,X,Y,del(10)(q12~21),chr(20)	<b>4 (4.6%)</b> MII,23,Y,+ace(5) MII,23,Y,+ace(17) MII,23,X,chtb(4)(q) MII,22,Y,del(14)(q),-19
<b>Numerical abnormalities</b>	<b>14 (13.2%)</b>	<b>18 (20.7%)</b>
<b>Diploidy</b>	<b>0 (0.0%)</b>	<b>7 (8.0%)</b>
<b>Hyperploidy</b>	<b>0 (0.0%)</b>	<b>6 (6.9%)</b> MII,24,XY (2 cells) MII,23,X,+Ycht MII,23,Y,+Xcht MII,23,Y,+21cht MII,23,XY,-21,+21cht
<b>Hypoploidy</b>	<b>14 (13.2%)<sup>a</sup></b> MI,21,XY,-II(4),-II(22) MI,21,XY,-II(11),-II(16) MI,22,XY,-II(2) MI,22,XY,-II(6) MI,22,XY,-II(8) MI,22,XY,-II(12) MI,22,XY,-II(16) (2 cells) MI,22,XY,-II(19) MI,22,XY,-II(22) MI,23,X,Y,-II(13) MI,23,X,Y,-II(22) MI,24,X,Y,-II(1),+I(1)	<b>6 (6.9%)<sup>a, b</sup></b> MII,22,Y,-8 MII,22,X,-13 MII,22,Y,-18 (2 cells)
<b>Total</b>	<b>106 (100%)</b>	<b>87 (100%)</b>

<sup>a</sup>One of them had also a structural abnormality.<sup>b</sup>One of them had also an hyperploidy.

4.6% at MII. The most common type of structural aberration observed was chromosome breaks, followed by deletions and acentric fragments (Fig. 1A–C).

Since hypoploidy may be due to technical artefacts, incidence of aneuploidy was considered as twice that of hyperploidy (Márquez *et al.*, 1996). The percentage of hyperploidy was 0% at MI and 6.9% at MII, with a frequency of conservative aneuploidy of 0% and 13.8% at MI and MII, respectively. Nondisjunction during the first meiotic division was detected for chromosome 21 and sex chromosomes as single extra or missing chromatid in 4.6% of MII cells (Fig. 1D–F), or as one whole extra chromosome in 3.4% of MII cells. The percentage of diploidy was 0% and 8% in spermatocyte I and II, respectively. All diploid spermatocytes II were 46,XY.

FISH analysis in spermatozoa (Table II) showed significantly higher levels ( $P < 0.0001$ ) of disomy 21, disomy XY and diploidy compared with our control group (Bosch *et al.*, 2001). There was a significant decrease ( $P < 0.0001$ ) in the frequencies of disomy XY and diploidy in spermatozoa compared to those found in MII spermatocytes.

### Synaptic errors observed in MI

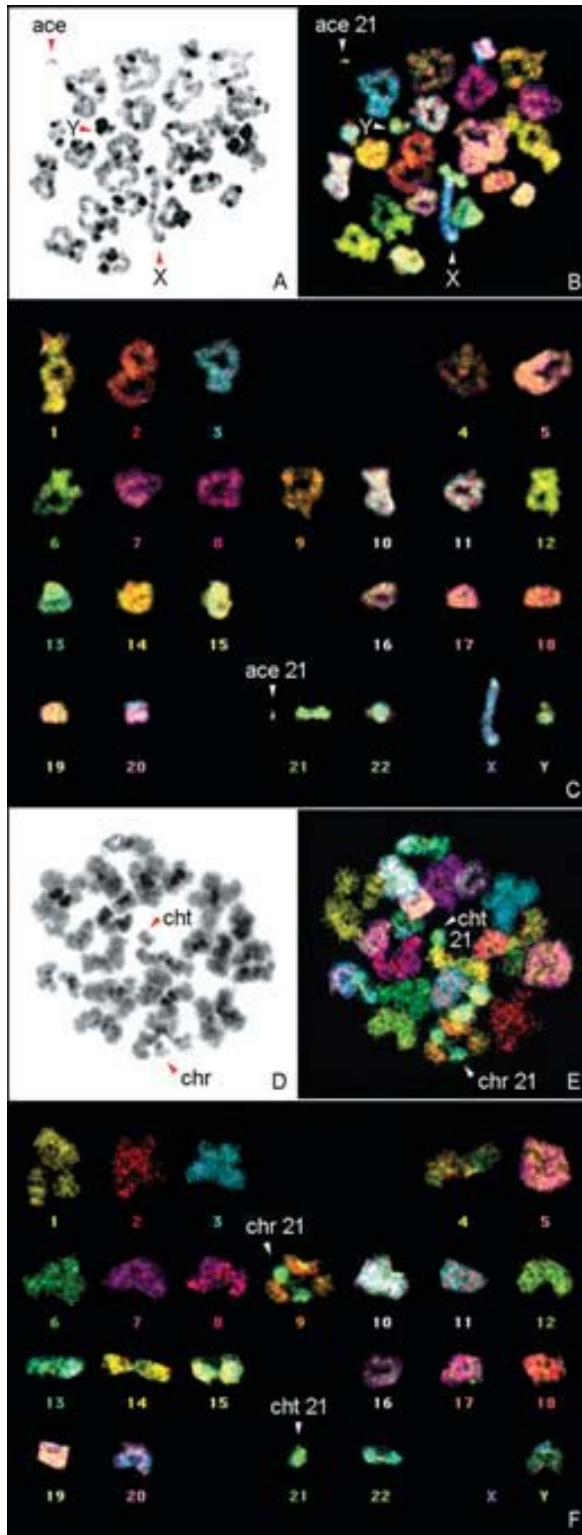
All pachytene spermatocytes analysed had condensed sex chromosomes with apparently normal pairing, but the presence of crossing-over between them could not be determined in this meiotic stage using this approach. Achiasmata sex

chromosomes were detected in 41.5% of spermatocytes at MI (Fig. 1A–C), and autosomal desynapsis was found in 7.5% of cells, in all cases affecting one autosomal bivalent of C group (bivalents 6, 8, 8, 9, 10, 11, 11 and 12) showing one single chiasma. Circular sex chromosomes with two crossovers were observed in two spermatocytes I (1.9%).

The chiasmata counts were carried out in 30 well-spread spermatocytes I: 15 of these with a normal XY bivalent and the remaining 15 with dissociated sex chromosomes (Table III). The mean number of chiasmata per spermatocyte was 51.3, this being significantly lower in MI with dissociated XY pair (mean count/cell 49.0; range 44–55) than in normal MI (mean count/cell 53.7; range 51–58) ( $P < 0.0001$ ). This decrease in the number of chiasmata was generalized for all chromosomes, but was statistically significant only for chromosome 4 ( $P = 0.02$ ), chromosome 9 ( $P = 0.03$ ), chromosome 10 ( $P = 0.02$ ) and chromosome 12 ( $P = 0.04$ ).

### Discussion

In this study, we carried out meiotic analysis in spermatocytes I, spermatocytes II and spermatozoa on an infertile patient with severe teratozoospermia (1% of normal forms) and a history of recurrent abortions, in order to detect meiotic errors. The use of M-FISH technique allowed us to identify each chromosome and to increase the number of analysable spermatocyte metaphases.



**Figure 1:** Human spermatocytes with meiotic chromosome abnormalities

(A) Metaphase I spermatocyte with dissociated sex chromosomes and an acentric fragment, identified as a chromosome 21 fragment (B and C). (D) Metaphase II spermatocyte is shown with 23 normal chromosomes and an extra chromatid identified as chromatid 21 (E and F). Arrows indicate the normal copy of chromosome 21 and the single chromatid of the same chromosome resulting from premature separation of sister chromatids during the first meiotic division. (A–D) 4,6-diamino-2-phenylindole counterstaining. (B–E) M-FISH images. (C–F) M-FISH karyotypes. Chr, chromosome; Cht, chromatid

### Structural and numerical chromosomal abnormalities

The most common types of structural abnormalities in both MI and MII (chromosome breaks, deletions and acrocentric fragments) were also the most frequent types found in sperm karyotypes (Estop *et al.*, 1995). The frequency of structural chromosomal aberrations found here at MII was similar to that described both for infertile males at the same meiotic stage (5.5%) (Laurie *et al.*, 1985), and for control donors analysed in sperm complements (6.6%) (Templado *et al.*, 2005). None of the MI spermatocytes was hyperloid or diploid in this patient, indicating that numerical chromosome abnormalities in later meiotic stages must have originated after spermatogonial divisions.

The only chromosomes involved in disomies at MII were 21 and sex chromosomes, which usually only present a single chiasma in meiosis I (Laurie and Hultén, 1985; Sun *et al.*, 2004). FISH analysis of these chromosomes in spermatozoa showed significantly increased levels of disomy 21 and disomy XY (a frequency six times higher than XX and YY disomies). This increase of disomy has been described in other FISH studies carried out in spermatozoa from infertile patients with teratozoospermia (Templado *et al.*, 2002) and in couples with repetitive abortions (Rubio *et al.*, 1999).

The frequencies of disomy XY and diploidy in spermatozoa was lower than that observed at MII, probably due to: 1) a light spermatogenic arrest between spermatocyte II and spermatozoa, or 2) hybridization failures in FISH on spermatozoa. In our case, the low sperm count ( $28 \times 10^6$  spermatozoa/ml), slightly higher than that established as normal ( $\geq 20 \times 10^6$  spermatozoa/ml) (WHO, 1999), would support the first hypothesis.

Only one similar study (Ma *et al.*, 2006) has been carried out on an infertile male with severe oligoasthenoteratozoospermia and an abortus 45,X of paternal origin, using both immunofluorescent studies of synaptonemal complexes and FISH in spermatozoa. The meiotic results obtained from this individual are similar to those that we have observed: an apparently normal sex body with no XY recombination and high levels for 21 and XY disomies and diploidy in spermatozoa. Unfortunately, no available data on nondisjunctional mechanisms can be obtained with the approaches used by Ma *et al.* (2006).

### Early dissociation of the XY pair and chiasmata counts

In our patient, frequency of early dissociated sex chromosomes (41.5%) is higher than that found in other infertile males analysed by classical meiotic studies (range 6.7–28%) (Hultén *et al.*, 1966; Chandley *et al.*, 1976; Laurie and Hultén, 1985). Despite this high frequency of unpaired XY bivalent at MI, all spermatocytes at pachytene stage had an apparently normal sex body. These data seem to reflect that early XY dissociation occurs after their pairing (desynapsis) by the lack of chiasmata between the two homologous chromosomes.

The mean number of chiasmata per cell in our subject is similar to that previously described in infertile (51.3) (Laurie and Hultén, 1985) and control males (51.2) (Skakkebaek *et al.*, 1973) in MI spermatocytes. However, spermatocytes I with dissociated sex chromosomes showed a significant decrease in the total number of chiasmata, this even being



**Table II.** Numerical chromosome abnormalities observed in spermatocytes II and spermatozoa.

	% disomy							% diploidy	
	9	10	15	21	XY	XX	YY	46,XY	46,XX/YY
<b>Infertile male</b>									
Spermatocyte metaphase II	0.0	0.0	0.0	1.1	5.7	–	–	8.0	–
Spermatozoa	0.05	0.02	0.15	0.56 <sup>a</sup>	0.86 <sup>a,b</sup>	0.07	0.07	0.76 <sup>a,b</sup>	0.02
<b>Control donors</b>									
Spermatozoa				0.07	0.10			0.29	

<sup>a</sup> $P < 0.0001$  compared with control donors.

<sup>b</sup> $P < 0.0001$  compared with spermatocytes at metaphase II.

significant for some medium-sized autosomal bivalents (pairs 4, 9, 10 and 12). Desynapsis of individual bivalents was described previously by our group in infertile males (Templado *et al.*, 1981). Desynaptic bivalents could migrate to the same pole because of mono-orientation in the metaphase plate ('true' nondisjunction), leading to disomic and nullisomic gametes. In fact, a recent study in yeast has demonstrated that chromosomes lacking crossovers near the centromere are more prone to mono-orient (Lacefield and Murray, 2007). Existence of specific chromosomes that are more sensitive to meiotic nondisjunction was described by FISH studies in spermatozoa from fathers of aneuploid children of paternal origin (Soares *et al.*, 2001a,b).

### Nondisjunctional mechanisms in human male meiosis

The analysis of numerical chromosome abnormalities in MII spermatocytes and spermatozoa allowed us to study chromosome missegregation in the first and second meiotic division, respectively. We observed two of the three types of

nondisjunction proposed by Hassold and Hunt (2001), since 'true' nondisjunction was not detected in this study. Both nondisjunctional mechanisms found in this individual (achiasmatic nondisjunction and PSSC) originated during the first meiotic division.

Achiasmatic nondisjunction was observed as increased levels for both dissociated sex chromosomes at MI and for disomy XY in MII and spermatozoa. The relationship between disomic XY spermatozoa and the absence of recombination has been demonstrated by DNA polymorphism studies in paternally derived 47,XXY individuals and their fathers (Hassold *et al.*, 1991), and by recombination studies carried out in 24,XY spermatozoa (Shi *et al.*, 2001).

Early XY dissociation could also explain the high levels of diploidy present in spermatocyte II and spermatozoa. In fact, infertile males with meiotic abnormalities such as the individual studied in our case, also present an increased frequency of diploid spermatozoa (Aran *et al.*, 1999). In agreement with this, Egozcue *et al.* (2000) have suggested that erratic chromosomes may be unable to migrate to the poles at anaphase and thus a single, diploid spermatocyte II is produced, giving rise to diploid spermatozoa.

Surprisingly, the most common type of nondisjunction observed was PSSC, detected in MII as one extra or missing chromatid affecting chromosomes 21, X and Y. These observations were corroborated by increased levels of disomy 21 and disomy XY in spermatozoa. The presence of achiasmatic sex chromosomes and the PSSC for these chromosomes described in this work have been reported in a recent study on mouse oocytes (Kouznetsova *et al.*, 2007). The authors proposed that achiasmatic chromosomes (univalents) are bi-oriented in a mitotic manner in MI and evade the spindle assembly checkpoint, contributing to aneuploidy in oocytes.

Chromatid predivision was first described by Angell (1991) at female meiosis II, and is considered to be as important as whole chromosome nondisjunction in the genesis of aneuploidies in human oocytes (Pellestor *et al.*, 2006). The only reference to premature separation of chromatids in male meiosis was described at pachytene stage in 11% of spermatocytes in an infertile male with a high incidence of desynapsis (86%) and absence of sex body (87%) (Guichaoua *et al.*, 2005); however, no evidence that this abnormality results in nondisjunction can be demonstrated by studies at early prophase I. To our knowledge, the present study provides the first evidence that PSSC occurs in human male meiosis. This segregation error has probably not previously been detected in

**Table III.** Mean number of chiasmata for individual chromosomes in normal and dissociated XY metaphase I spermatocytes.

Bivalents	Mean number of chiasmata			P-value <sup>a</sup>
	23,XY	24,X,Y	Total	
1	4.2	3.9	4.1	
2	3.7	3.7	3.7	
3	3.5	3.3	3.4	
4	3.1	2.7	2.9	0.02
5	2.9	2.7	2.8	
6	2.6	2.3	2.5	
7	2.7	2.5	2.6	
8	2.5	2.2	2.4	
9	2.4	2.1	2.2	0.03
10	2.9	2.4	2.6	0.02
11	2.5	2.3	2.4	
12	2.9	2.5	2.7	0.04
13	1.9	1.9	1.9	
14	1.7	1.6	1.6	
15	1.7	1.7	1.7	
16	1.9	1.8	1.9	
17	1.9	1.7	1.8	
18	1.9	1.8	1.9	
19	1.9	1.9	1.9	
20	1.8	1.8	1.8	
21	1.1	1.1	1.1	
22	1.0	1.1	1.0	
XY	1.1	0.0	0.5	<0.0001
Total	53.7	49.0	51.3	<0.0001

<sup>a</sup>Significant differences in the mean number of chiasmata between spermatocytes 23,XY and 24,X,Y.

spermatogenesis because of the low number of analysable MII in classical meiotic preparations. The use of M-FISH increases the number of analysable MII, even if these are not well-spread, and allows chromosome identification.

In conclusion, our subject has an increased risk of recurrent spontaneous abortion and affected offspring due to the presence of high levels of diploidy and aneuploidy observed in his germ cells. The presence of univalents in meiosis I could result in both aneuploid spermatozoa through PSSC or achiasmate nondisjunction, and diploid spermatozoa. In our study, PSSC was observed directly for first time in human spermatozoa at MII, using M-FISH technique. Future meiotic studies on nondisjunctional mechanisms will clarify whether PSSC in human male meiosis is as common as in female germ cells.

## Funding

Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFI2002-01193); Generalitat de Catalunya (2005SGR-00495, 2005FI00399 to L.U.).

### Authors Roles

L.U., experiment performing, analysis of data, manuscript writing; O.R., samples collection, analysis of data, manuscript writing; C.T., experiment design, analysis of data, manuscript writing.

## References

- Angell RR. Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet* 1991;**86**:383–387.
- Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, Egozcue J, Veiga A. 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* 1999;**72**:696–701.
- Arnedo N, Templado C, Sánchez-Blanque Y, Rajmil O, Nogués C. Sperm aneuploidy in fathers of Klinefelter's syndrome offspring assessed by multicolour fluorescent in situ hybridization using probes for chromosomes 6, 13, 18, 21, 22, X and Y. *Hum Reprod* 2006;**21**:524–528.
- Bosch M, Rajmil O, Martínez-Pasarell O, Egozcue J, Templado C. Linear increase of diploidy in human sperm with age: a four-colour FISH study. *Eur J Hum Genet* 2001;**9**:533–538.
- Chandley AC, Maclean N, Edmond P, Fletcher J, Watson GS. Cytogenetics and infertility in man. II. Testicular histology and meiosis. *Ann Hum Genet* 1976;**40**:165–176.
- Egozcue J, Templado C, Vidal F, Navarro J, Morer-Fargas F, Marina S. Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum Genet* 1983;**65**:185–188.
- 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.
- Estop AM, Márquez C, Munné S, Navarro J, Ciepły K, Van Kirk V, Martorell MR, Benet J, Templado C. An analysis of human sperm chromosome breakpoints. *Am J Hum Genet* 1995;**56**:452–460.
- Evans EP, Breckon G, Ford CE. An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* 1964;**15**:289–294.
- Guichaoua MR, Perrin J, Metzler-Guillemain C, Saias-Magnan J, Giorgi R, Grillo JM. Meiotic anomalies in infertile men with severe spermatogenic defects. *Hum Reprod* 2005;**20**:1897–1902.
- Hassold TJ, Sherman SL, Pettay D, Page DC, Jacobs PA. XY chromosome nondisjunction in man is associated with diminished recombination in the pseudoautosomal region. *Am J Hum Genet* 1991;**49**:253–260.
- Hassold T, Pettay D, Robinson A, Uchida I. Molecular studies of parental origin and mosaicism in 45,X conceptuses. *Hum Genet* 1992;**89**:647–652.
- Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001;**2**:280–291.
- Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet* 2007;**16**:R203–R208.
- Hultén M, Lindsten J, Ming PM, Fraccaro M. The XY bivalent in human male meiosis. *Ann Hum Genet* 1966;**30**:119–123.
- Kouznetsova A, Lister L, Nordenskjöld M, Herbert M, Hoog C. Bi-orientation of achiasmatic chromosomes in meiosis I oocytes contributes to aneuploidy in mice. *Nat Genet* 2007;**39**:966–968.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988;**49**:112–117.
- Lacefield S, Murray AW. The spindle checkpoint rescues the meiotic segregation of chromosomes whose crossovers are far from the centromere. *Nat Genet* 2007;**39**:1273–1277.
- Laurie DA, Hultén MA. Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann Hum Genet* 1985;**49**:189–201.
- Laurie DA, Firkett CL, Hultén MA. A direct cytogenetic technique for assessing the rate of first meiotic non-disjunction in the human male by the analysis of cells at metaphase II. *Ann Hum Genet* 1985;**49**:23–29.
- Ma S, Ferguson KA, Arsovska S, Moens P, Chow V. Reduced recombination associated with the production of aneuploid sperm in an infertile man: a case report. *Hum Reprod* 2006;**21**:980–985.
- Márquez C, Egozcue J, Martorell MR, Moreno V, Templado C. Colcemid increases the frequency of chromosome abnormalities in human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 1996;**72**:164–170.
- Martínez-Pasarell O, Templado C, Egozcue J, Vicens-Calvet E, Nogués C. PCR protocol to detect parental origin and hidden mosaicism in Sex chromosome aneuploidies. *Horm Res* 1999;**51**:248–252.
- Pellestor F, Andreo B, Anahory T, Hamamah S. The occurrence of aneuploidy in human: lessons from the cytogenetic studies of human oocytes. *Eur J Med Genet* 2006;**49**:103–116.
- Rubio C, Simon C, Blanco J, Vidal F, Minguez Y, Egozcue J, Crespo J, Remohi J, Pellicer A. Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet* 1999;**16**:253–258.
- Sarrate Z, Blanco J, Egozcue S, Vidal F, Egozcue J. Identification of meiotic anomalies with multiplex fluorescence in situ hybridization: preliminary results. *Fertil Steril* 2004;**82**:712–717.
- Schaffer LGTN. *ISCN (2005): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel, Switzerland: S Karger, 2005.
- Shi Q, Spriggs E, Field LL, Ko E, Barclay L, Martin RH. Single sperm typing demonstrates that reduced recombination is associated with the production of aneuploid 24,XY human sperm. *Am J Med Genet* 2001;**99**:34–38.
- Skakkebaek NE, Bryant JI, Philip J. Studies on meiotic chromosomes in infertile men and controls with normal karyotypes. *J Reprod Fertil* 1973;**35**:23–36.
- 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* 2001a;**108**:134–139.
- Soares SR, Vidal F, Bosch M, Martínez-Pasarell O, Nogués C, Egozcue J, Templado C. Acrocentric chromosome disomy is increased in spermatozoa from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 2001b;**108**:499–503.
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996;**12**:368–375.
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker A, Navarro J, Benet J, Martin RH. Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am J Hum Genet* 2004;**74**:521–531.
- Templado C, Marina S, Egozcue J. Three cases of low chiasma frequency associated with infertility in man. *Andrologia* 1976;**8**:285–289.
- Templado C, Vidal F, Marina S, Pomerol JM, Egozcue J. A new meiotic mutation: desynapsis of individual bivalents. *Hum Genet* 1981;**59**:345–348.
- Templado C, Hoang T, Greene C, Rademaker A, Chernos J, Martin RH. Aneuploid spermatozoa in infertile men: teratozoospermia. *Mol Reprod Dev* 2002;**61**:200–204.
- Templado C, Bosch M, Benet J. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 2005;**111**:199–205.
- Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Calderon G, Egozcue S, Egozcue J, Barri PN. Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Hum Reprod* 1999;**14**:375–378.
- WHO. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction*, 4th edn. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1999.

Submitted on October 18, 2007; resubmitted on November 20, 2007; accepted on December 17, 2007

# AGRAÏMENTS

Primer de tot vull agrair a la Cristina, a part d'haver-me dirigit aquesta tesi, tot el que he après d'ella al llarg d'aquesta odissea de quatre anys, tant a nivell científic com personal. També a l'Osvald, sempre disposat a ajudar en tot allò que calgui. Al Thomas Liehr i la gent del seu laboratori, per acollir-me i fer-me sentir una més. I, com no, la meva més sincera gratitud al "Vysis", l'ordinador que per sort i fortuna no m'ha deixat a la cuneta d'aquest projecte.

També mereixen estar en aquest espai de gratitud la Raquel i la Gemma per tots els kebabs i piscines i el Javi, amb qui obrir un garden seria tota una aventura. Gràcies també a l'Albert, ànima bessona zodiacal i laboral, a l'Anna D i la Yolanda, que tot i coincidir poc amb elles les he recordat en molts moments. Gràcies, Mònica i Ari, per fer de mi una fan incondicional de l'M-FISH. Gràcies a la Mariona, per ella ara conec més Badalona, i a l'Agustín, model a seguir amb les magdalenes furtives. Al Miguel, per les converses al sol, i als "Yes, you can" de la Gemma Daina.

Gràcies a l'Imma, l'Esther, el Pere, la Maria, l'Ignasi, la Montse C., la Núria C per tot el que he après d'ells. A l'Ana i l'Àngels, per ser una cara amiga. Gràcies a la Montse, la Rosa, la Carme, el Jordi i la Quima. I, en general, a tota la gent amb qui he compartit bons moments al laboratori: la Núria P, l'Aida, l'Eric, la Nora, la Laia, la Glòria, la Sandra, la Fernanda, la Kristin, la Ghizlane, el Jorge, ... espero no deixar-me a ningú!

Gràcies a la família, illa de pau i tranquil·litat quan més falta fa. Als meus pares i al Joan, pel seu suport i la seva paciència. A la Kira i la Lola, animals eternament enemistats que m'han ensenyat a veure la vida amb la simplicitat que es mereix.

Per últim, vull donar gràcies especialment als amics de Castellar: la Laia, la Sara, el Juanxin, la Gemma, el Ferran, el Troya, el Txiky, el David, el *Guitar Hero* Xavi i a la màfia Vall, per fer que sembli un accident.

