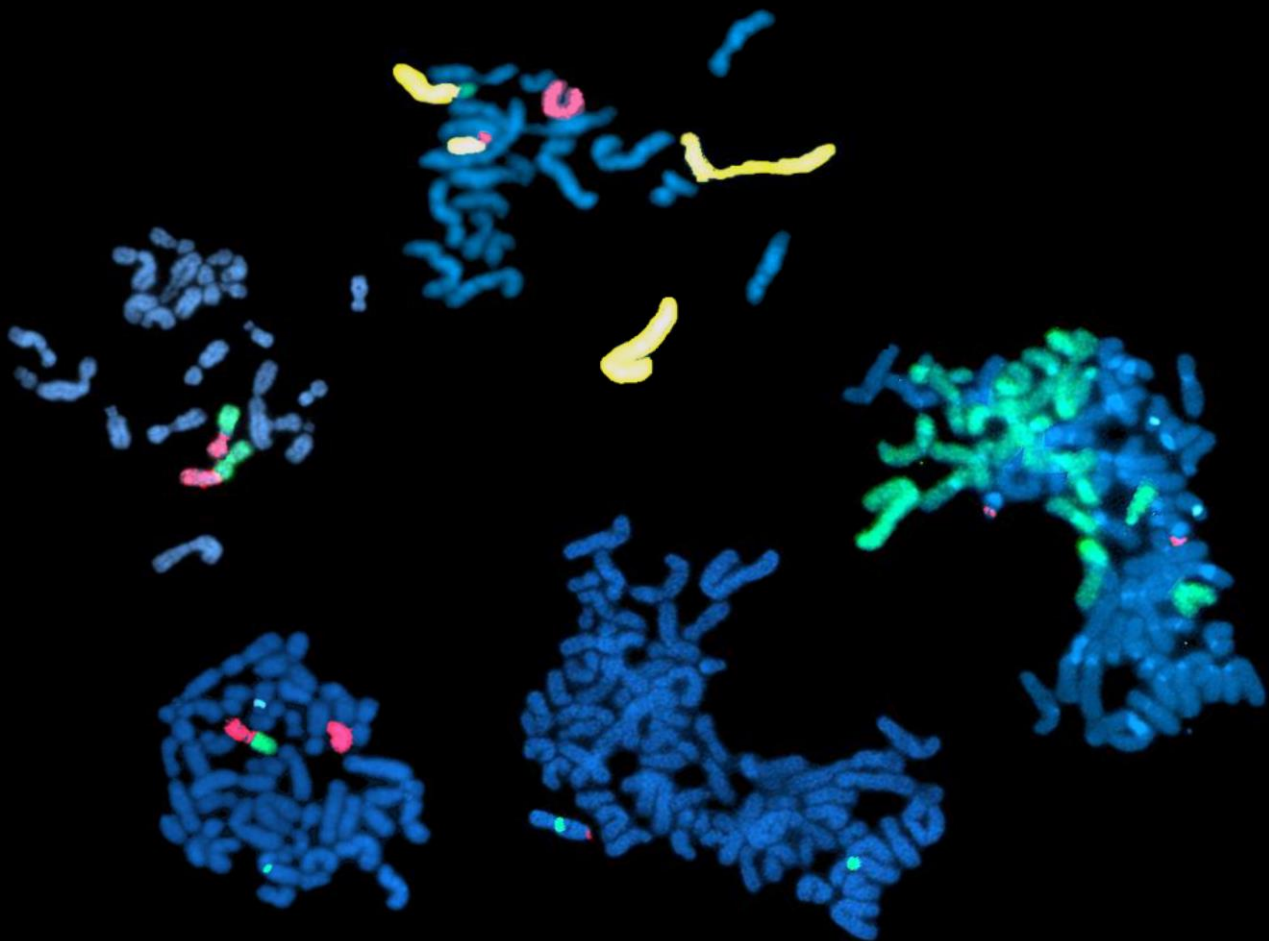


PORTADORES DE REORGANIZACIONES CROMOSÓMICAS: SEGREGACIÓN MEIÓTICA EN ESPERMATOGÉNESIS Y CONSECUENCIAS

Piedad Cifuentes Moraleda



Tesis Doctoral
Universitat Autònoma de Barcelona
Diciembre 2015

Universitat Autònoma de Barcelona



Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia

Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica (Facultat de Medicina)

Portadores de reorganizaciones cromosómicas: segregación meiótica en espermatogénesis y consecuencias

Piedad Cifuentes Moraleda

Memoria presentada por **Piedad Cifuentes Moraleda** para aspirar al grado de Doctor por la
Universitat Autònoma de Barcelona en el programa de Doctorado en Biología Celular.

Bellaterra, Diciembre 2015

El **Dr. Jordi Benet Català**, Profesor Catedrático de la UAB i la **Dra. Joaquina Navarro Ferreté**, Profesora Catedrática de la UAB, del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICAN

Que **Piedad Cifuentes Moraleda** ha realizado, bajo su dirección, en la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica de la Facultat de Medicina de la UAB, el trabajo para optar al título de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona en el programa de Doctorado en Biología Celular, con título:

**Portadores de reorganizaciones cromosómicas:
segregación meiótica en espermatogénesis y consecuencias**

Para que así conste, se firma el presente documento.

Piedad Cifuentes Moraleda

Jordi Benet Català

Joaquina Navarro Ferreté

Bellaterra, Diciembre 2015

Este trabajo se ha realizado con el soporte económico de los proyectos:

- Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad
Proyecto FIS 95/1741
Proyecto FIS 98/0031-01
- Generalitat de Catalunya, AGAUR
Proyecto 1997-SGR-00030
Proyecto 1999-SGR- 00104

Piedad Cifuentes Moraleda ha sido beneficiaria de un contrato predoctoral asociado al proyecto FIS 95/1741 del Instituto de Salud Carlos III



“.....como no estas experimentado en las cosas del mundo, todas las cosas que tienen algo de dificultad te parecen imposibles.....se dará tiempo al tiempo, que suele dar dulce salida a muchas amargas dificultades.....”

*Miguel de Cervantes
(Fragmentos del Quijote y la Gitanilla)*

*A Rafael, Claudia y Diego
motor e inspiración de mi vida,
amor incondicional.*

*A mis padres, por acompañar
mi camino creyendo en mí y queriéndome siempre.*

ABREVIATURAS

MI: primera división meiótica
MII: segunda división meiótica
CS: complejo sinaptonémico
SYCP: Synaptonemal Complex Protein
MLH1: MutL homolog
SAC: Spindle Assembly Checkpoint
SGO: Shugoshina
AZF: Factor de azoospermia
CFTR: Regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística
AR: Receptores de androgenos
INSL3: Insulin-like 3
LGR8: Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 8
del: delección
dup: duplicación
CCR: complex chromosome reorganization
der: derivativo
rob: translocación Robertsoniana
rcp: translocaciones recíprocas
A: adenina
T: timina
FISH: fluorescent in situ hybridization
WCP: whole chromosome painting
PRINS: marcaje in situ mediante primers
BWW: medio Biggers-Whitten-Whittingham
HSA: albúmina sérica humana
PMSG: pregnant mare's serum gonadotropin
HCG: gonadotropina corionica humana
FCS: fetal cow serum
DTT: ditionitrito
ATCC: American Type Culture Collection
pfu: unidad formadora de placa
PEG: polietilenglicol

BSA: Albúmina Sérica Bovina

rce: recombinante

ha-hu: hámster-humano

LSI: litio

CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio

EDTA: acido etilendiaminotriacetato

Mpb: mega pares de bases

pb: pares de bases

EIC: efecto intercromosómico

PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDO

1.- INTRODUCCIÓN	25
1.1.- Espermatogenesis	27
1.1.1.- Etapa proliferativa	29
1.1.2.- Etapa reduccional o Meiosis	30
1.1.3.- Espermiogénesis	33
1.2.- Incidencia De Anomalías Cromosómicas En La Población	34
1.3.- Reorganizaciones Estructurales	38
1.3.1.- Inversiones	38
1.3.1.1.- Comportamiento meiótico de las inversiones	39
1.3.2.- Translocaciones cromosómicas	42
1.3.2.1.- Translocaciones Robertsonianas	42
1.3.2.2.- Translocaciones Recíprocas	45
1.3.2.3.- Translocaciones Complejas (CCR)	51
1.4.- Riesgo Genético De Las Reorganizaciones	55
1.5.- Aproximaciones Metodológicas Para El Estudio De La Segregación Cromosómica Y El Efecto Intercromosómico.	57
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	61
2.1.- Hipótesis	63
2.2.- Objetivos	63
3.- MATERIAL Y MÉTODO	67
3. 1.- Material Biológico	69
3. 2.- Obtención Y Criopreservación De Las Muestras De Semen	70
3. 3.- Obtención De Cromosomas De Espermatozoide Humanos: Fecundación Heteróloga Hámster-Humano.	70
3.3.1.- Procesado y capacitación de muestras de semen	70
3.3.2.- Obtención de ovocitos de hámster e inseminación interespecífica	71
3.3.3.- Control de penetración o hámster test	72
3.3.5.- Obtención de los complementos cromosómicos de pronúcleo masculino	74
3. 4.- Obtención De Preparaciones De Núcleos Descondensados De Espermatozoides	77
3.4.1.- Fijación de las muestras de semen	77
3.4.2.- Descondensación de núcleos de espermatozoides	77
3. 5.- Análisis De Los Complementos De Pronúcleo Masculino Y De Núcleos Descondensados De Espermatozoide Mediante Hibridación In Situ	78
3.5.1.- Obtención, marcaje y preparación de las sondas de ADN	79
3.5.1.1.- Extracción de ADN genómico de Hámster	79
3.5.1.2.- Amplificación de la sonda recibida de ATCC	80
3.5.1.3.- Marcaje y preparación del ADN sonda	85

3.5.2.- Hibridación in situ con sondas de ADN marcadas: técnica de pintado cromosómico (painting) para complementos cromosómicos de pronúcleo masculino y para cabezas hinchadas, núcleos, de espermatozoides.	90
3.5.2.1.- Hibridación in situ con sondas marcadas con moléculas no fluorescentes (Biotina /Digoxigenina) y detección indirecta	90
3.5.2.2.- Hibridación in situ fluorescente con sondas marcadas directamente con fluorocromo: técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) (sondas comerciales VYSIS)	93
3.5.3.- Criterios de recuento para el análisis mediante FISH de cabezas hinchadas, núcleos, de espermatozoides	95
3.6.- ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS	95
3.7.- SOLUCIONES Y MEDIOS	96
4.- RESULTADOS	111
4.1.- SUJETO 1, individuo portador equilibrado de la inversión pericentrica inv(7)(p13;q36)	113
4.1.1.- Estudio de la segregación meiótica	113
4.2.- SUJETO 2, individuo portador equilibrado de la reorganización cromosómica compleja (CCR) t(2;11;22)(q13;q23;q11.2)	118
4.2.1.- Estudio de la segregación meiótica	118
4.3.- SUJETO 3, individuo portador equilibrado de la translocación recíproca t(5;7)(q21;q31)	122
4.3.1.- Estudio de la segregación meiótica	122
4.3.2.- Estudio de la aneuploidía	123
4.4.- SUJETO 4, individuo portador equilibrado de la translocación recíproca t(9;17)(q12;p12)	125
4.4.1.- Estudio de la segregación meiótica	125
4.4.2.- Estudio de la aneuploidía	126
4.5.- SUJETO 5, individuo portador equilibrado de la translocación recíproca t(9;17)(p13;q21,3)	128
4.5.1.- Estudio de la segregación meiótica	128
4.5.2.- Estudio de la aneuploidía	130
5.- DISCUSIÓN	133
5. 1.- Aportaciones Metodologicas	135
5. 2.- Segregación	140
5.2.1- Inversiones	140
5.2.2- Reorganizaciones cromosómicas complejas	147
5.2.3- Translocaciones Recíprocas	151
5. 3.- Efecto Intercromosomico	170
6.- CONCLUSIONES	175
7.- BIBLIOGRAFIA	181

ANEXO

201

Sperm segregation analysis of a complex chromosome rearrangement, 2;22;11, by whole chromosome painting

Cytogenetics and Cell Genetics Vol 82 (3-4): 204-209 (1998)

Cifuentes P, Navarro J, Míguez L, Egozcue J, Benet J

Cytogenetic analysis of sperm chromosomes and sperm nuclei in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) by in situ hybridisation

European Journal of Human Genetics 7: 231-238 (1999)

Cifuentes P, Navarro J, Blanco J, Vidal F, Míguez L, Egozcue J, Benet J

Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review

Cytogenetic and Genome Research 111(3-4): 281-290 (2005)

Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J,

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- ESPERMATOGENESIS

La espermatogénesis es el mecanismo biológico por el cual las células germinales masculinas diploides, tras un proceso secuencial, culminan en células diferenciadas haploides. Este proceso secuencial tiene lugar en tres etapas, una primera etapa proliferativa, en la que las espermatogonias o células germinales primarias se dividen por mitosis aumentando en número y manteniendo así una reserva de células madre germinales. La segunda etapa que conlleva un carácter reduccional consiste en el proceso de la meiosis, en la que no solo se reduce el contenido nuclear de diploide a haploide, sino que también tiene lugar el proceso fundamental de la recombinación entre cromosomas homólogos. La tercera etapa, de diferenciación, que recibe también el nombre de espermiogénesis, consiste en una serie de cambios morfológicos por los que el espermatocito secundario se diferenciara hasta espermatozoide (Figura 1.1).

La espermatogénesis tiene lugar en los tubos seminíferos que conforman el interior de los testículos. La disposición de los diferentes tipos celulares en su interior no es al azar, sino que deriva de un proceso que se inicia a intervalos regulares por lo que los distintos tipos celulares quedan ordenados en varias capas. En cada capa celular se encuentran células en la misma etapa del proceso. Mientras las espermatogonias se disponen contactando con la membrana basal, el resto se dispone en capas más internas, de forma progresiva hasta alcanzar el lumen del túbulo (Alberts et al. 2008) (Fig. 1.2)

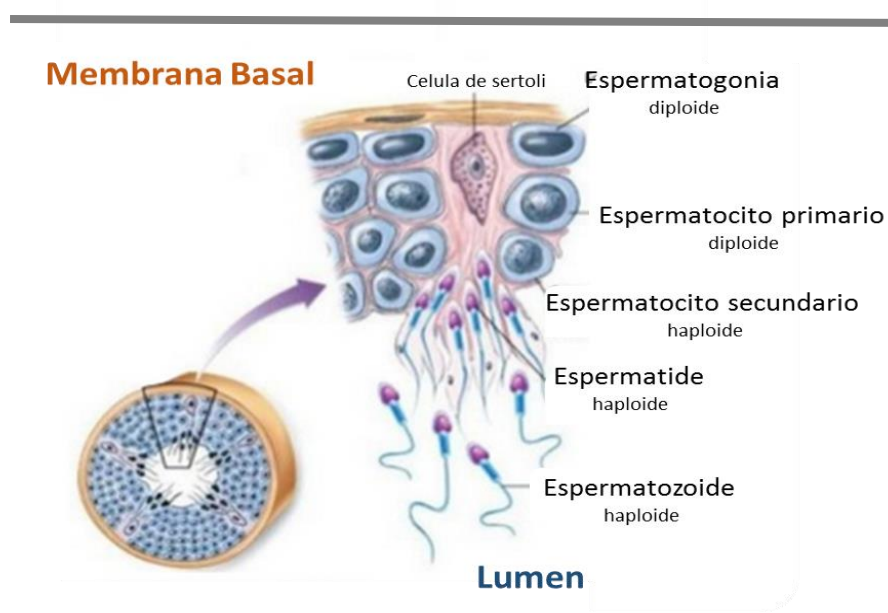


Figura 1.2 Esquema de la sección transversal de un túbulo seminífero

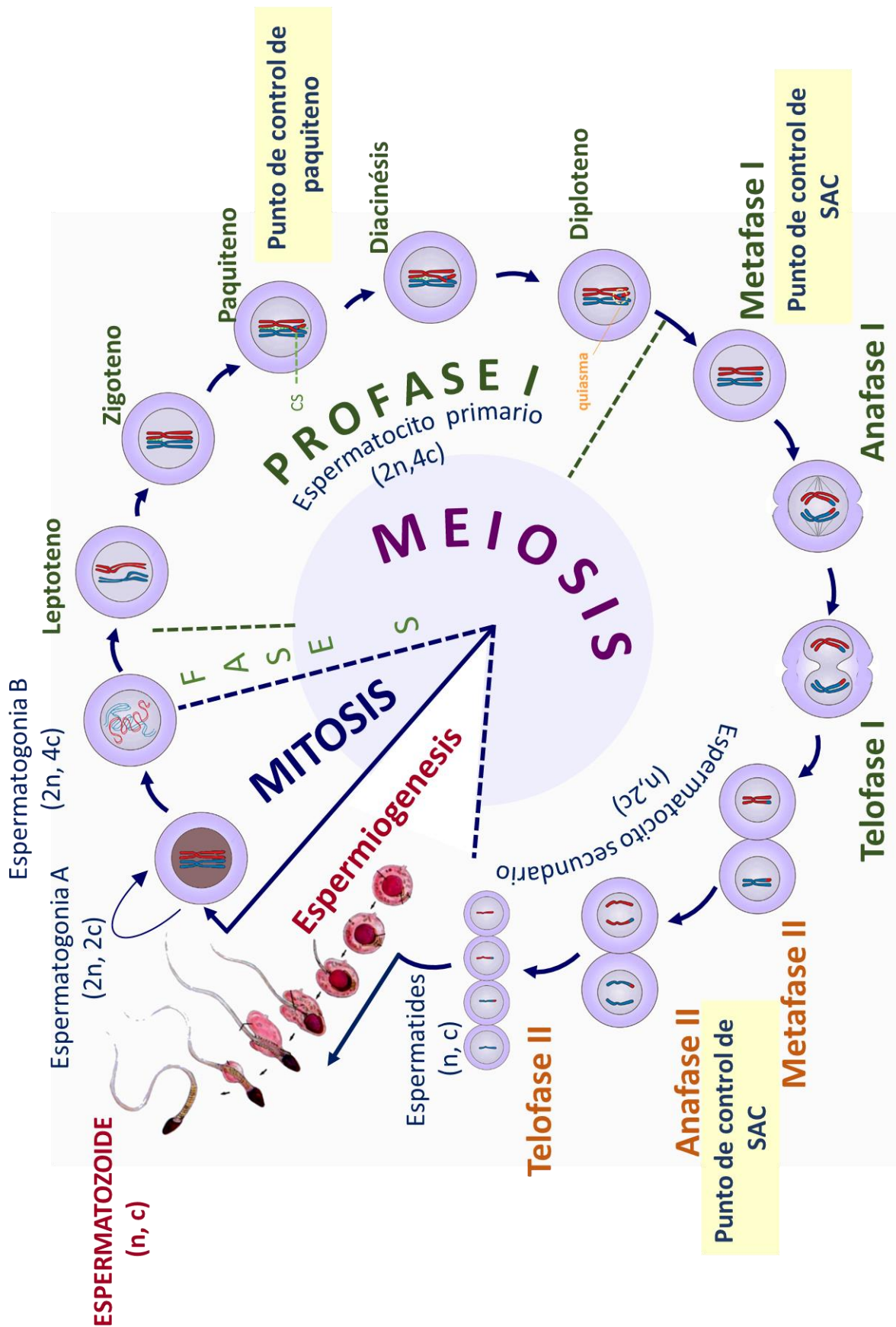


Figura 1.1 Esquema de la espermatogénesis en humano

La duración del proceso de espermatogénesis en general y de cada etapa en particular, es específica para cada especie, para el hombre, se ha considerado una duración de 64-65 días (Adler, 1996). La duración de un ciclo de espermatogénesis es el tiempo transcurrido entre procesos de espermiación consecutivos, siendo en la especie humana de 16 días, y está determinado por la frecuencia en que nuevas espermatogonias entren en el proceso de gametogénesis (Fig. 1.3). Recientemente, teniendo en cuenta la dificultad para evaluar exactamente en qué momento una espermatogonia A_{oscura} entra en el proceso, se ha propuesto una duración de unos 74 días que corresponde al producto de la duración del ciclo de espermatogénesis humana, 16 días, por 4,5, que es el promedio de células germinativas presentes en un mismo estadio de espermatogénesis (Amann, 2008; Divya et al. 2014).

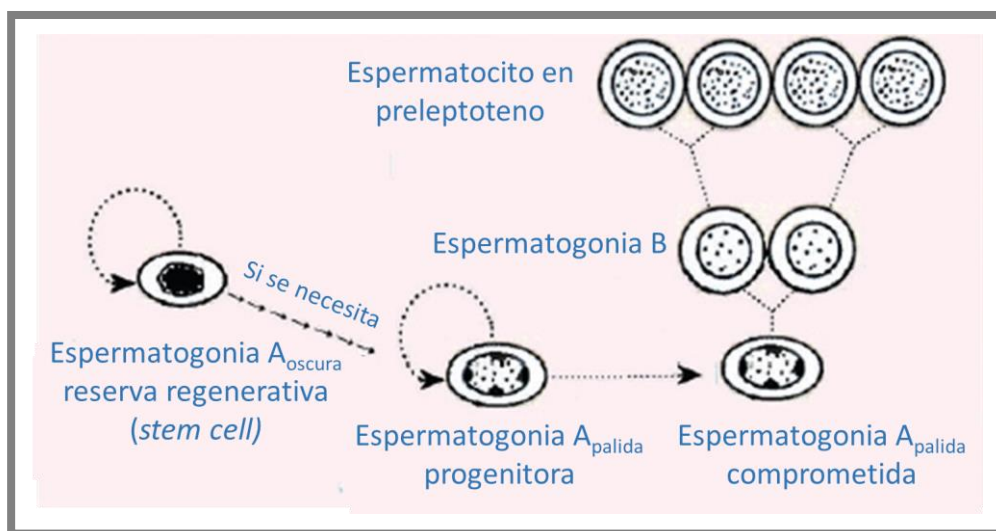


Figura 1.3 Patrón probable de desarrollo de espermatogonias (renovación de la espermatogonia progenitora $A_{\text{pálida}}$ y proliferación de la espermatogonia $A_{\text{pálida}}$ comprometida), que es el primer subproceso dentro de la espermatogénesis (imagen adaptada de Amann, 2008)

1.1.1.- Etapa proliferativa

Esta etapa tiene dos funciones principales, una mantener las reservas celulares germinales mediante división mitótica y otra en la que existe una diferenciación progresiva para obtener células germinales capaces de acometer un proceso de división celular tan especializado como es el meiótico (Amann R., 2008). Por lo tanto, mediante divisiones mitóticas se mantiene la reserva de células madre germinales masculinas, espermatogonias o espermatogonias A_{oscuras} . Algunas de estas espermatogonias A_{oscuras} reciben una señal que

las activa para su diferenciación en espermatogonia A_{claras}. Mientras que un grupo de espermatogonia A_{claras} sigue procesos proliferativos, algunas reciben señales de diferenciación y pasan a ser espermatogonia B. La división mitótica de esta última dará lugar a dos espermatocitos primarios, competentes para entrar en la siguiente etapa de la espermatogénesis: la meiosis.

1.1.2.- Etapa reduccional o Meiosis

La meiosis consiste en dos divisiones celulares consecutivas, donde se reduce a la mitad el número de cromosomas de manera que de una célula diploide (contiene $2n$ cromosomas con 2 cromátides por cromosoma; $2n$; $4c$) se obtendrán 4 células haploides (n). Para que cada gameto haploide reciba una única copia de cada par de cromosomas, la célula solo realizará una única ronda de replicación del ADN, seguidas de dos rondas de segregación cromosómica, una en cada división meiótica. En la primera división meiótica (MI) se separan los cromosomas homólogos a polos opuestos (segregación sintética, conlleva la separación de centrómeros hermanos al mismo polo). Durante la meiosis dos (MII) se produce la separación de cromátides hermanas, de forma análoga a la mitosis o segregación anfitélica de centrómeros hermanos, resultando en células haploides. El proceso de MI comienza con una profase especialmente larga, y es en esta etapa cuando se producen los dos acontecimientos más trascendentales de este proceso, uno la sinapsis o emparejamiento de los cromosomas homólogos, mediante la estructuración del complejo sinaptonémico (CS) que comporta la formación de los bivalentes meióticos y dos, la recombinación meiótica entre cromátides homólogas (Kleckner 1996).

La profase I se divide en *leptoteno*, *zigoteno*, *paquiteno* y *diploteno* (Fig. 1.4). Cada etapa de la profase I se caracteriza por un mayor grado de condensación de la cromatina, que se inicia en *leptoteno*. La membrana nuclear se comienza a desorganizar y comienza el ensamblaje del complejo sinaptonémico (mediante las proteínas SYCP2 y SYCP3 conformando el elemento axial del CS y que una vez constituido recibe el nombre de elemento lateral) (Handel y Schimenti, 2010), que permitirá establecer el emparejamiento de los cromosomas homólogos mediante la unión de las fibras de ADN al CS mediante unas proteínas de anclaje llamadas cohesinas. Comienza el proceso de recombinación mediante la

rotura de la doble cadena de ADN, inducida por las proteínas de recombinación y que a su vez desencadenan la activación de los mecanismos de reparación (San Filippo et al. 2008). En *zigoteno*, el emparejamiento de los cromosomas homólogos se va consolidando conforme el CS completa su estructura con la unión de los elementos transversales (constituidos por la proteína SYCP1) a los elementos laterales del CS (Handel y Schimenti, 2010). Comienza la reparación del ADN con la búsqueda de secuencias homólogas intactas que sirvan como molde, invadiendo la otra doble cadena y estableciendo las uniones de Holliday. Ya en la etapa de *paquiteno*, el CS está consolidado, se acaban de reparar las roturas de la doble

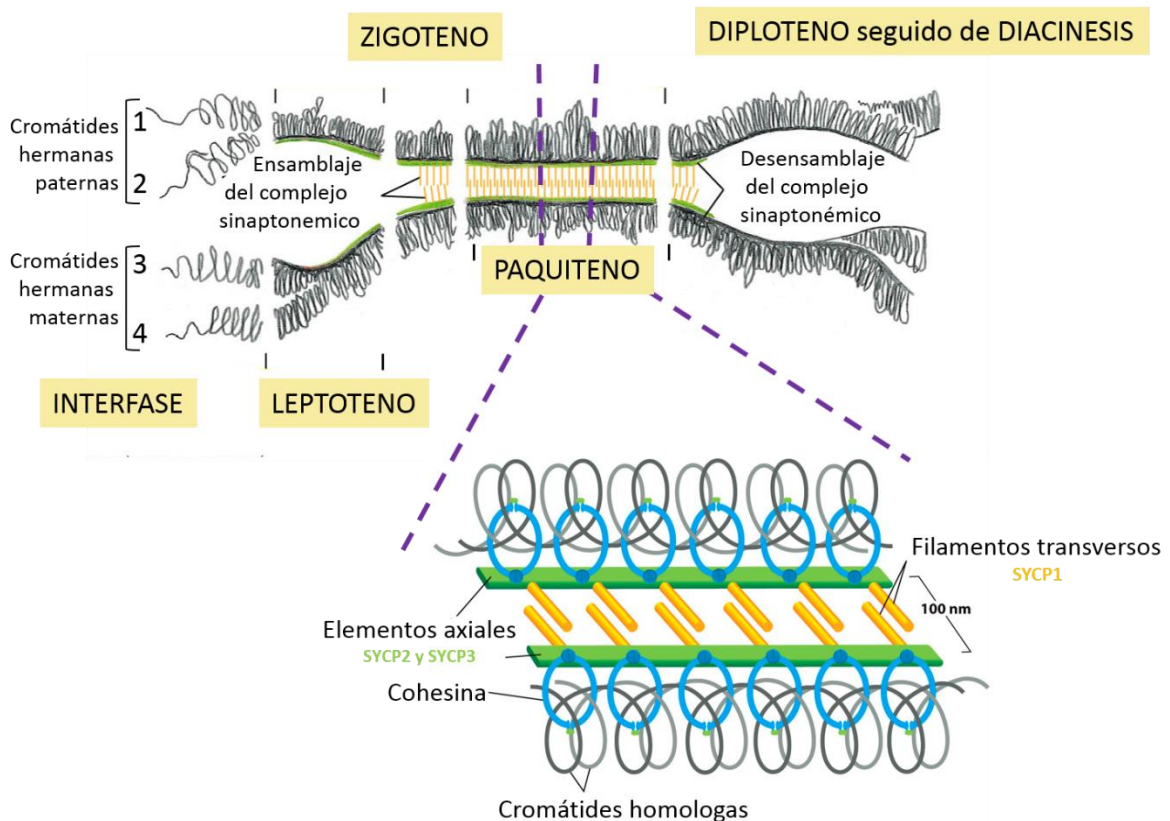


Figura adaptada de Molecular Biology of the cell 6e (Garland Science 2015)

Figura 1.4 Progresión de la profase I y estructura del complejo sinaptonémico (CS)

cadena de ADN y se completa el emparejamiento de los cromosomas homólogos, dando lugar a los bivalentes. La reparación de las cadenas de ADN se da de forma mayoritaria sin entrecruzamiento de cromátidos homólogos, por lo que, en estos casos no hay intercambio entre ellas, pero con una frecuencia menor, la reparación implica un entrecruzamiento de

cromátides homólogas, por lo que si hay un intercambio recíproco entre ellas, estos lugares de entrecruzamiento reciben el nombre de nódulos de recombinación. En ellos participa, de manera primordial, la proteína de reparación de errores MLH1 (*MutL homolog*) que se ha descrito como marcador de los puntos de recombinación meiótica a paquiteno (Barlow y Hultén; Codina-Pascual et al. 2004). La distribución de los puntos de recombinación a lo largo del bivalente, se controla de manera que sea obligada la presencia de al menos un intercambio por bivalente, pero limitando al mismo tiempo su número debido al fenómeno de interferencia (Hultén, 1974; Kleckner, 1996). Llegando al estadio de *diploteno*, los CS se desestructuran progresivamente quedando los cromosomas homólogos unidos solamente por los quiasmas que corresponden a las estructuras resultantes del proceso de entrecruzamiento en los nódulos de recombinación. Los quiasmas son esenciales tanto desde el punto de vista mecánico como del genético. Desde el punto de vista mecánico, son necesarios para mantener los cromosomas homólogos unidos y así asegurar su correcta disyunción durante la primera división meiótica. Los errores en este proceso conducen a la no disyunción y como consecuencia, a la generación de aneuploidías. Desde el punto de vista genético, los quiasmas son indicadores de que se han producido eventos de recombinación y consecuentemente de generación de diversidad genética, gracias a la creación de nuevas combinaciones alélicas. Por último se alcanza el estadio de *diacinesis* en la que la membrana nuclear se desorganiza completamente y la cromatina sigue condensándose progresivamente.

Acabada la profase I, comienza la etapa en la que se consigue el mayor grado de condensación de la cromatina. La formación del uso meiótico y la vinculación de los bivalentes a éste, conducen al estadio de metafase I. La tensión entre los cromosomas homólogos se consigue mantener gracias a los quiasmas y la unión de los microtúbulos a los cinetocoros, facilitando la correcta orientación de los bivalentes en la placa metafásica, para que ya en anafase I se produzca la segregación de los cromosomas homólogos, La segregación se producirá gracias a la degradación de las cohesinas periquiasmáticas mientras que las cohesinas centroméricas se mantienen unidas debido a la protección que ejerce la shugoshina (SGO) sobre ellas evitando su degradación manteniendo unidos los centrómeros de las cromátides hermanas (Watanabe y Kitajima, 2005; Lee et al. 2008).

Finalmente, en telofase I, que concluirá la primera división meiótica, los cromosomas homólogos se separan cada uno hacia un polo y se produce la citocinesis dando lugar a dos espermatocitos secundarios, de dotación haploide pero cada cromosoma con dos cromátides ($n, 2c$) (Page y Hawley, 2003).

Cada espermatocito secundario comenzará una segunda división meiótica. Sin mediar ninguna replicación del ADN se inicia la segunda división meiótica obteniéndose finalmente células haploides y con una sola cromátide (n, c). De este modo en la profase II se producirá un nuevo ciclo de condensación de la cromatina que llegará hasta metafase II produciéndose, en la placa metafásica, la orientación de las cromátides hermanas a polos opuestos; debido a la tensión producida por los microtúbulos sobre el cinetocoro, la shugoshina (SGO) se desestabiliza permitiendo la acción de la separasa sobre las cohesinas centroméricas (Kitajima et al. 2006), dando lugar a la segregación anfitélica de las cromátides hermanas en anafase II (Vogt et al. 2008). Después de la telofase II, finalizado el proceso meiótico, se han obtenido ~~n~~ dos espermátides haploides (n) por cada espermatocito secundario. (Fig. 1.1)

1.1.3.- Espermiogénesis

La espermiogénesis es la fase de diferenciación producida tras un complejo proceso de morfogénesis, por el cual cada espermátide se convertirá en espermatozoide, con un núcleo altamente compactado y con capacidad potencial de posteriormente moverse y fecundar (Fig. 1.1). Este proceso está regulado por la expresión de genes específicos y que a grandes rasgos comportan, además del recambio, en la cromatina, de las histonas por protaminas que le conferirá al núcleo una mayor compactación del ADN, de cambios de reposicionamiento de receptores y canales iónicos de membrana, elongación del núcleo, eliminación del citoplasma, formación del flagelo y el acrosoma, (revisado por Amann, 2008). Finalizado este proceso, los espermatozoides resultantes son liberados al lumen de los túbulos seminíferos.

1.2.- INCIDENCIA DE ANOMALIAS CROMOSOMICAS EN LA POBLACIÓN

Se conoce como anomalía cromosómica a cualquier alteración en el número o estructura de los cromosomas. La incidencia de anomalías cromosómicas constitucionales, es hasta diez veces más elevada en individuos infértiles¹ que en la población general (Van Assche et al. 1996) Estas anomalías cromosómicas constitucionales incluyen anomalías numéricas de cromosomas sexuales (p. ej. XXY o XYY), de cromosomas autosómicos (trisomías, monosomías) y múltiples de todo el contenido nuclear cromosómico (poliploidías), y anomalías estructurales tales como translocaciones recíprocas y Robertsonianas, inversiones pericéntricas y paracéntricas, inserciones y algunas deleciones. La presencia de estas anomalías cromosómicas de forma constitucional tiene un efecto en el proceso de producción de gametos (Egozcue et al. 2000). Se estima que un 50% aproximadamente de los fallos reproductivos humanos son debidos a anomalías cromosómicas. La reproducción de la especie humana destaca por una alta incidencia de embriones cromosómicamente anómalos. La mayoría de anomalías numéricas o aneuploidías aparecen *de novo* como resultado de un error en la segregación de los cromosomas durante las divisiones meióticas. Este fenómeno, conocido como no-disyunción, puede ocurrir durante la meiosis I bien debido a un error en la segregación de los cromosomas homólogos, o bien debido a una separación precoz de cromátides hermanas (Angell et al. 1993) o también durante la meiosis II por un error en la segregación de cromátides hermanas. En cuanto a las anomalías estructurales, un 80% (Jacobs 1992) son heredadas de uno de los progenitores, el cual es portador equilibrado.

Durante las etapas del desarrollo embrionario existe una elevada tasa de no evolución de la gestación y una selección negativa de las anomalías cromosómicas. La incidencia de anomalías cromosómicas decrece respecto de las semanas de gestación: 45,5% en abortos antes de la octava semana, 5,35% en muertes perinatales y un 0,3% en nacidos vivos (Jacobs y Hassold 1995) (Jacobs y Hassold, 1995). El 85% de los embarazos son gestaciones

¹ La infertilidad se define como la incapacidad de conseguir un embarazo clínico tras un año de relaciones sexuales no protegidas (Organización Mundial de la Salud (OMS)) Afecta a un 15% de las parejas en edad fértil y entre un 20-30% de los casos es de origen masculino (ART Fact Sheet (Junio 2014) URL: <http://eshre.eu/Guidelines-and-Legal/ART-fact-sheet.aspx>.)

evolutivas, de estas el 83,3% nacen vivos y sobreviven, el resto (1,7%) sufre muerte perinatal con una incidencia de entre el 5-6% de anomalías cromosómicas (Machin y Crolla 1974) de las que el 75% son anomalías numéricas y el 25% anomalías estructurales. La incidencia de anomalías cromosómicas entre los nacidos vivos y que sobreviven es de un 0,6% (Nielsen 1975), de los cuales el 60% presentan anomalías numéricas y el 40% anomalías estructurales. De las anomalías estructurales el 31% son portadores equilibrados, es decir, el 0,19% de los nacidos vivos son portadores de anomalías estructurales equilibradas y que conforman un grupo importante en la población de individuos que transmitirán esta anomalía estructural mediante meiosis a través de sus células germinales. Por otro lado, el 15% de embarazos que terminan en abortos postimplantacionales de primer trimestre tienen una incidencia de entre el 50-70% de anomalías cromosómicas (Rubio et al. 2003; Stephenson et al. 2002; Eiben et al. 1990), un 95% anomalías numéricas y un 5% anomalías estructurales (Eiben et al. 1990).

Entre las parejas infértiles, el 4,7% de ellas, que sufren más de dos abortos, uno de los dos progenitores es portador de una reorganización (De Braekeleer y Dao 1990), siendo las reorganizaciones estructurales las más frecuentes y representan el 2,1% de los abortos espontáneos: las reorganizaciones estructurales más frecuentes son las translocaciones recíprocas con una incidencia del 1,2%, translocaciones Robertsonianas con un 0,6% y las inversiones con un 0,2%. La frecuencia de anomalías estructurales aumenta según aumenta el número de abortos que presenta la pareja, para mantenerse estable después de presentar más de dos abortos (1% en parejas con un aborto, 2,2% con dos abortos y 2,4% con más de dos abortos).

La prevalencia de las anomalías cromosómicas en la población general, ha sido estimadas a lo largo de las últimas décadas en individuos nacidos no seleccionados (Jacobs et al. 1974; Hamerton et al. 1975; Buckton et al. 1980; Hansteen et al. 1982; Maeda et al. 1991; Nielsen y Wohler 1991) en los que la incidencia de las anomalías cromosómicas descritas presentan unas frecuencias medias de 0,1% para las translocaciones Robertsonianas, 0,11% para las translocaciones recíprocas 0,022% para inversiones, 0,11% para disomía del cromosoma Y para 0,04% con cromosomas marcadores. Un estudio realizado en 10.202 individuos adultos, cuyas características fenotípicas y valores seminales

eran normales, arroja una incidencia del 0,068% de portadores de translocaciones Robertsonianas, 0,05% de portadores de translocaciones recíprocas, 0,088% de portadores de inversiones, 0,05% con disomía del cromosoma Y un 0,035% con cromosomas marcadores (Ravel et al. 2006). Las frecuencias encontradas en ambos grupos de estudio, no revelan diferencias significativas más que en la incidencia de las inversiones, mayor en el grupo de estudio en adultos, ya que en los estudios en neonatos algunas inversiones son consideradas variantes polimórficas y no anomalías estructurales. (Tabla 1.1)

Tabla 1.1 Incidencia de anomalías cromosómicas en la población general

Referencia	nº individuos	Translocaciones Robertsonianas	Traslocaciones recíprocas	Inversiones autosómicas	47, XYY	Cromosoma marcador
Jacobs et al. (1974)	11,680: 7849 niños 3831 niñas	10 (0,85) [6 t(13;14)(0,5)]	10 (0,85)	2 (0,17)	12 (1,5)[2 mosaicos (0,25)]	no recogido
Hamerton et al. (1975)	13,939: 7176 niños 6763 niñas	13 (0,93) [10 t(13;14)(0,7)]	11 (0,78)	0	7 (0,9)[3 mosaicos (0,4)]	no recogido
Buckton et al. (1980)	3.993: 2072 niños 1921 niñas	3 (0,7) [3 t(13;14)]	5 (1,2) [1 t(Y;15)]	2 (0,5)		4 (1,9) 2 (0,5)
Hansteen et al. (1982)	1830: 955 niños 875 niñas	4 (2,1) [3 t(13;14)(1,6)]	5 (2,7)	0		1 (1) 4 (2,1)
Maeda et al. (1991)	14.835: 7.608 niños 7.227 niñas	11 (0,74) [9 t(13;14)(0,6)]	11 (0,74)	2 (0,13)	5 (0,66)[3 mosaicos (0,4)]	3 (0,2)
Nielsen y Wohlert (1991)	34.910: 17.860 niños 17.050 niñas	43 (1,2) [34 t(13;14)(0,97)]	49 (1,4)	12 (0,34)	19 (1)[2 mosaicos (0,1)]	23 (0,66)
Total	81.187: 43,520 niños 37,667 niñas	84 (1) [65 t(13;14)(0,8)]	91 (1,1)	18 (0,22)	48 (1,1)[10 mosaicos (0,22)]	32 (0,4)
Ravel (2006)	10202 varones adultos	7 t(13;14) (0,68)	5 (0,5)	9 (0,88)[3 inv(2)(0,3)]		5 (0,5) 4 (0,35)

la frecuencia esta dada por 1000 entre parentesis

Tabla adaptada de Ravel et al., 2006

Como se ha referido al comienzo, la incidencia de anomalías cromosómicas en la población infértil es hasta diez veces más elevada que en la población general. El componente genético es además, la causa más importante en la infertilidad masculina. Aproximadamente el 5% de los individuos que consultan por infertilidad presentan anomalías cromosómicas:

- ▲ Por delección del cromosoma Y: las regiones afectadas se conocen como AZF (factor de azoospermia) y hay varios *loci* identificados y localizados en la banda Yq11 (Vogt et al. 2008; Kent-First et al. 1999). Representan la causa más frecuente en individuos azoospermicos y oligozoospermicos (10-15% y 5-10% respectivamente, O'Flynn O'Brien et al. 2010).
- ▲ Modificación de genes específicos: la mutación de algunos genes del complejo entramado de genes de expresión, que intervienen en el desarrollo sexual y la

gametogénesis humana afectaría al resultado global del proceso, provocando la infertilidad. Los genes más comunes en el cribado génico por su elevada incidencia son los correspondientes a:

- la proteína CFTR (regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística) con una incidencia del 60-70% en individuos con ausencia bilateral congénita de vasos deferentes y 1.2% en oligozoospermicos severos (Ferlin et al. 2007)
 - los receptores de andrógenos (AR), suponen el 2% en la población infértil, el 2-3% en azoospermicos y el 2-3% en oligozoospermicos (Ferlin et al. 2007)
 - Las proteínas INSL3 y LGR8 que suponen del 4-5% de los individuos con criptorquidia.
- ▲ Alteraciones cromosómicas: pueden ser numéricas o estructurales. Las anomalías numéricas tienen una mayor incidencia entre los individuos infértiles (52%) y son las aneuploidías de los cromosomas sexuales las más frecuentes (entre tres y diez veces superior a la encontrada en la población general (Mau-Holzmann 2005). Las anomalías estructurales suponen el 48% restante de los individuos infértiles y suelen estar en equilibrio (no hay perdida ni ganancia de ADN), siendo las más frecuentes las translocaciones Robertsonianas (0,9%), seguidas de las translocaciones recíprocas (0,8%) e inversiones (0,2%) (Mau-Holzmann, 2005) (Tabla 1.2)

Tabla 1.2 Incidencia de anomalías cromosómicas en individuos infértiles Mau-Holzmann, 2005

	Azoospermicos	Oligozoospermicos	Infértiles	Estudios precios a FIV	Estudios previos a ICSI	Total Global
anomalias numericas						
XXY (%)	8,8	0,5	2	0	1	1,7
XYY (%)	0,1	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3
Mosaicos (%)	1,3	0,2	0,1	0	0,8	0,5
Total numericas	10,1	1	2,4	0,2	2,1	2,5
anomalias estructurales						
T Rob (%)	0,2	1,5	0,7	0,2	0,9	0,9
T Rcp (%)	0,7	0,9	0,5	0,5	0,9	0,8
inv sin(X,Y) (%)	0	0,3	0,3	0	0,3	0,2
Otras (%)	1,2	0,3	0,6	0	0,4	0,5
Total estructurales	2,1	2,9	2,1	0,6	2,4	2,3

1.3.- REORGANIZACIONES ESTRUCTURALES

1.3.1.- Inversiones

Las inversiones son reorganizaciones intracromosómicas producidas por dos roturas en el mismo cromosoma y su posterior reparación tras el intercambio entre el fragmento distal y el proximal, cambiando por tanto la ordenación de sus *loci*. Estas pueden ser de dos tipos, pericéntricas (el centrómero está dentro del segmento invertido) y paracéntricas (el centrómero se encuentra fuera del segmento invertido) (Fig. 1.5). Las inversiones son las reorganizaciones cromosómicas de menor incidencia en la población, entre 1-2% para las pericéntricas (de la Chapelle et al. 1974; Kaiser 1984) y entre el 0,002-0,049% para las paracéntricas (Van Dyke et al. 1983; Ferguson-Smith y Yates 1984; Warburton 1984; Fryns et al. 1986; Jacobs 1992). Estas frecuencias son entre 3-20 veces superiores en población infértil (Tabla 1.2) (Mau-Holzmann, 2005) Estas reorganizaciones suelen pasar desapercibidas en la población ya que, en estos casos, el cambio de orientación de estas regiones cromosómicas no suele alterar la función de los genes implicados. Solo son puestas de manifiesto al producirse consecuencias patológicas, bien porque algún gen relevante queda interrumpido o alterada su localización con respecto de su centro de regulación; o también por la formación, en la meiosis, de productos de segregación desequilibrados como consecuencia de efectuarse procesos de recombinación en el segmento invertido.

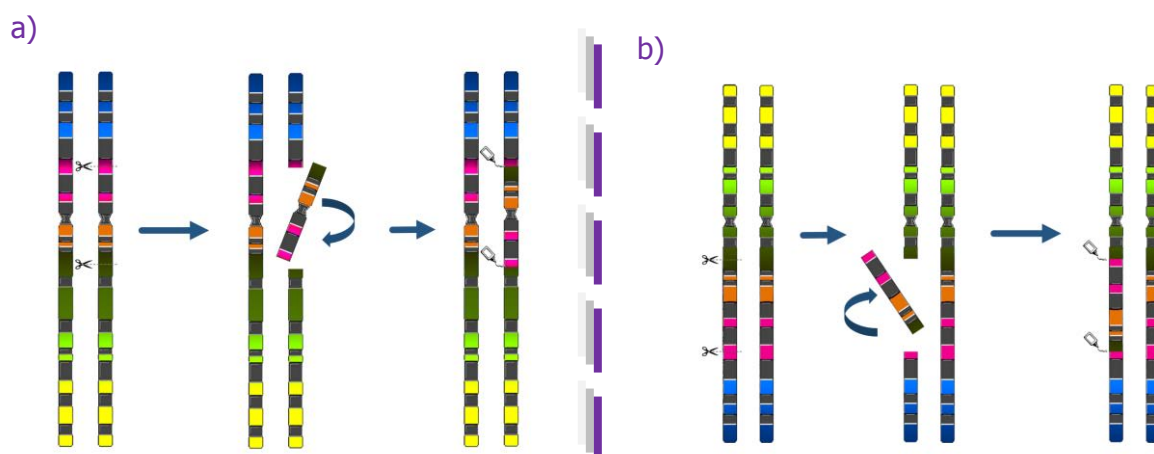


Figura 1.5 Mecanismo de formación de una inversión a) paracéntrica, b) pericéntrica

1.3.1.1.- Comportamiento meiótico de las inversiones

Los cromosomas portadores de inversión y sus homólogos deben emparejarse durante la profase I para alcanzar su correcta segregación en el proceso de gametogénesis. Para lograr la sinapsis, estos cromosomas pueden adoptar diferentes configuraciones en paquiteno, que va desde la formación de un asa o *loop* de inversión, con la que se conseguiría la completa homosinapsis (Fig. 1.6), o también pueden adoptar otras configuraciones en las que quedan regiones asináptadas y que se ha podido relacionar con el

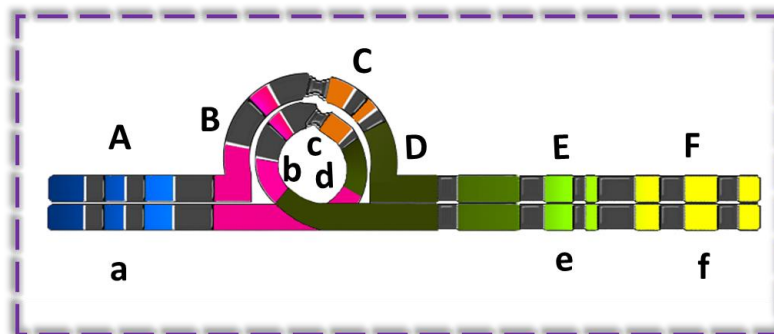


Figura 1.7 Configuración de emparejamiento sináptico en bucle o asa de inversión

tamaño del segmento invertido, es decir, la probabilidad de que la sinapsis se resuelva dejando pequeños fragmentos asinápticos se debe, o bien a que el segmento invertido es muy pequeño, o bien a que el segmento invertido es muy grande, (Kaiser, 1984) (Fig. 1.7)

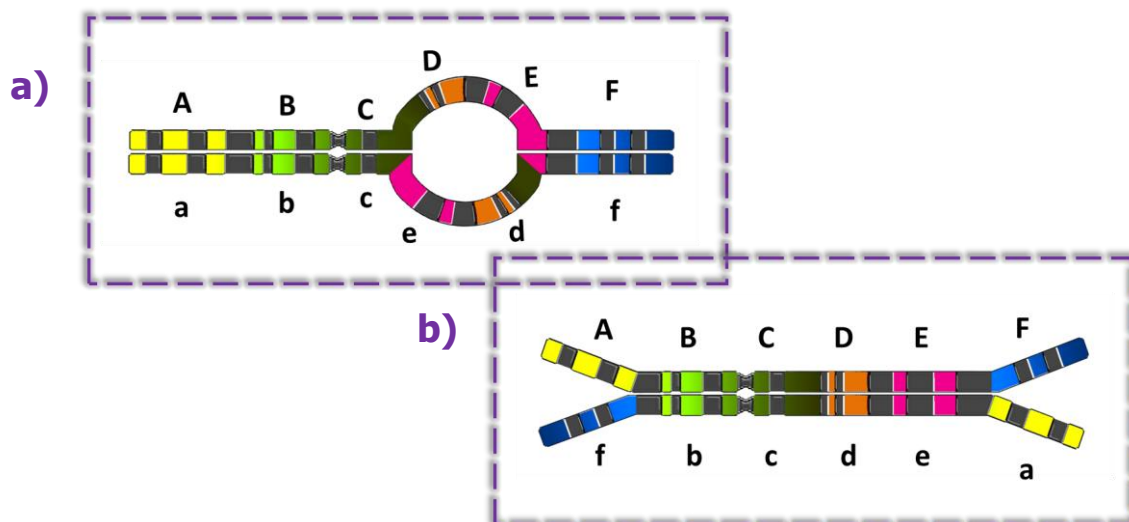


Figura 1.7 Otras configuraciones de emparejamiento a) inversión pequeña, no sinapsis zona invertida b) inversión grande, no sinapsis de las regiones no invertidas

Los individuos portadores de inversión pueden producir gametos desequilibrados. La producción de estos gametos desequilibrados dependerá de la formación de un número impar de quiasmas dentro de la región invertida y de las cromátides implicadas. Los cromosomas resultantes se denominan recombinantes y pueden presentar duplicaciones y deleciones o pérdidas de regiones importantes del cromosoma. (Fig. 1.8 y 1.9)

Los diferentes productos que se pueden generar en el caso de una inversión pericéntrica se representan de forma esquematizada en la figura 1.8 donde podemos observar que la producción de gametos normales/equilibrados o desequilibrados depende del número de quiasmas la posición y las cromátides entre las que se dé la recombinación y puede ser desde que todos los productos sean normal/equilibrado, a que todos los productos sean desequilibrados.

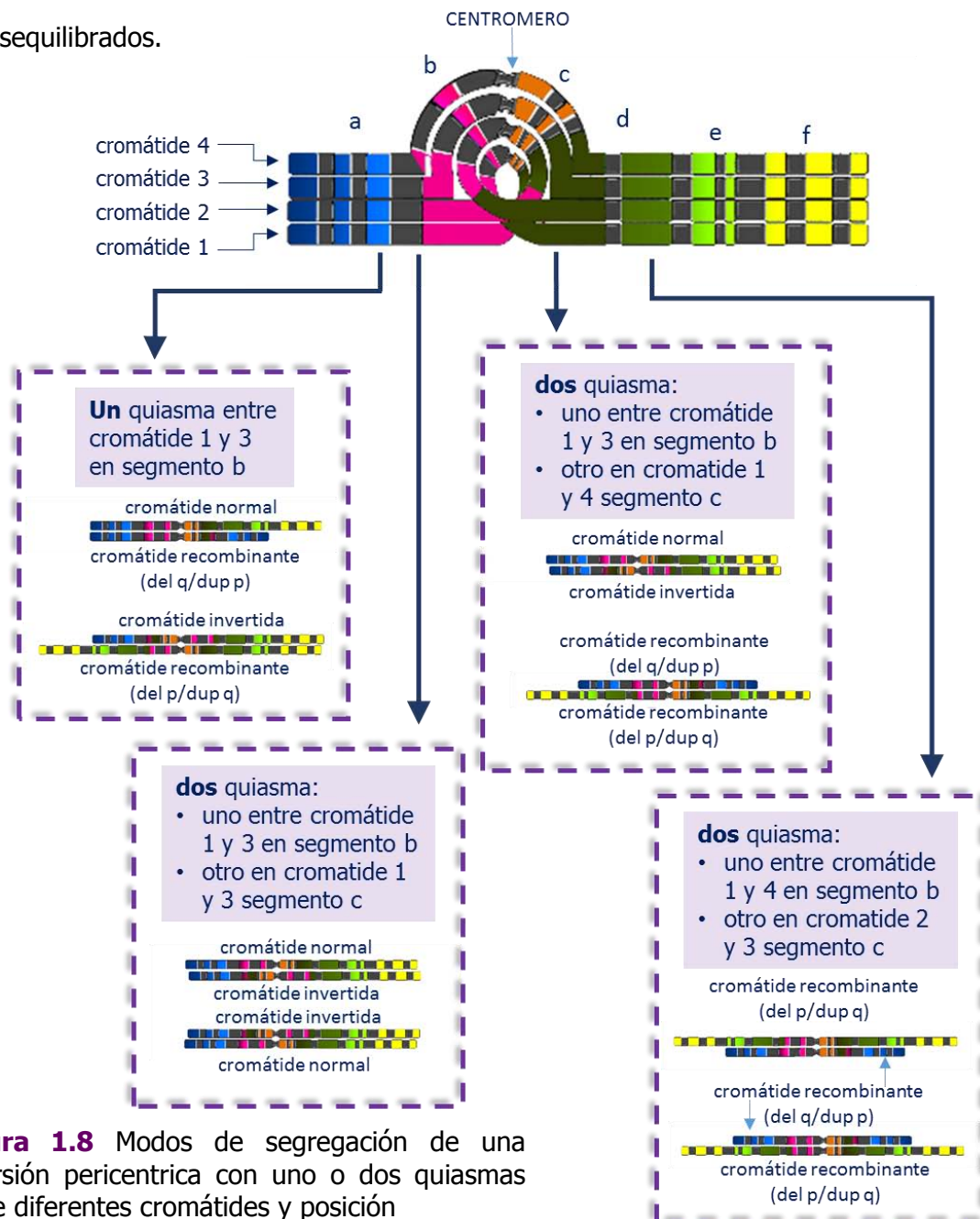


Figura 1.8 Modos de segregación de una inversión pericéntrica con uno o dos quiasmas entre diferentes cromátides y posición

En el caso de las inversiones paracéntricas el fenómeno de recombinación, con la formación de quiasmas dentro de la región invertida, tiene consecuencias muy parecidas, los cromosomas recombinantes resultantes además de duplicaciones y pérdidas son acéntricos o dicéntricos. Por otro lado en este tipo de inversión, la combinación de quiasmas dentro y fuera de la región invertida puede dar lugar a la formación de cromátides en forma de bucle o lazo (Lacadena 1996) (Fig. 1.9)

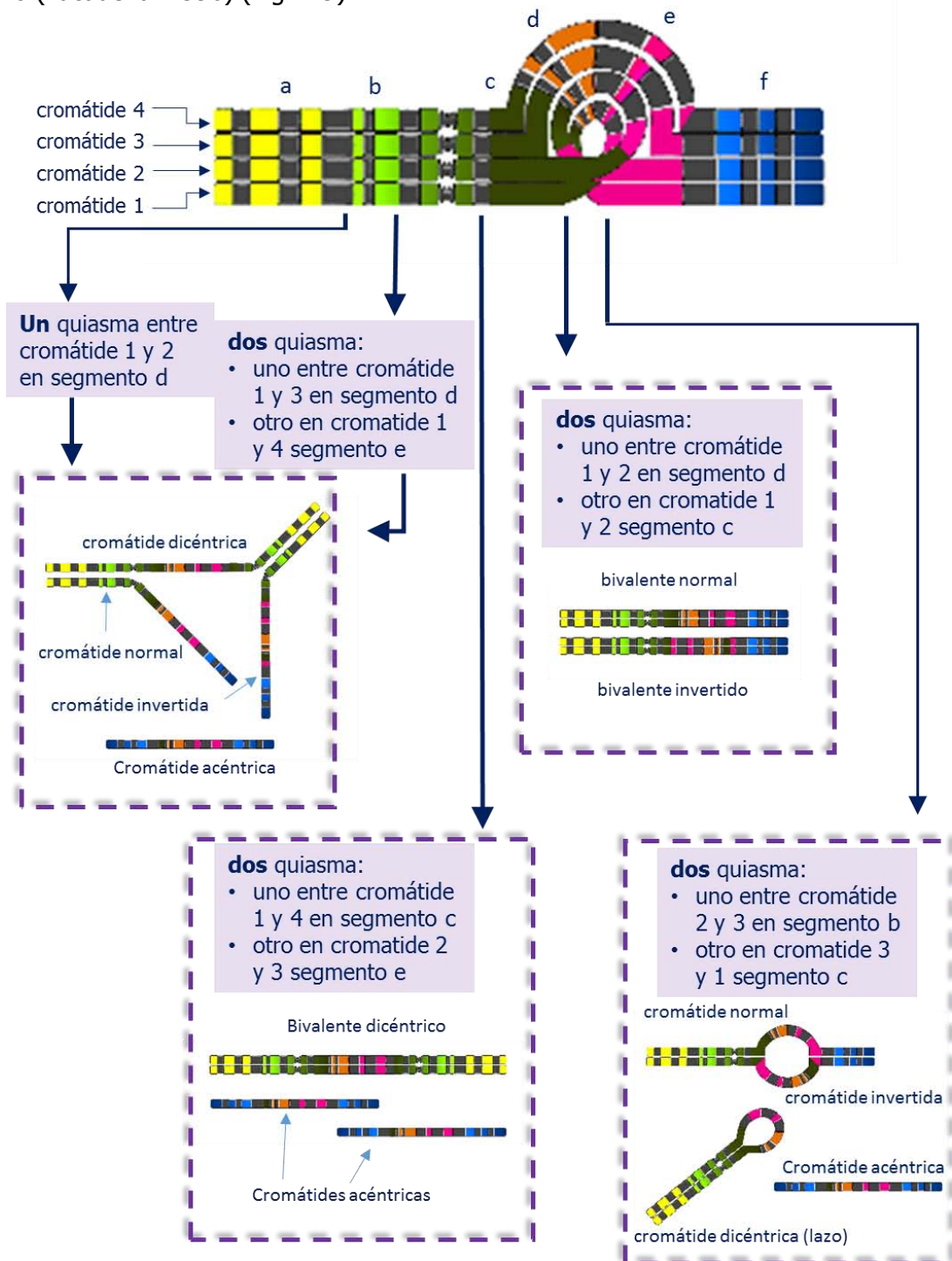


Figura 1.9 Modos de segregación de una inversión paracéntrica con uno o dos quiasmas entre diferentes cromátides y posición dentro y fuera del segmento invertido

La producción de gametos desequilibrados tanto en inversiones paracéntricas como pericéntricas dependerá de los quiasmas producidos dentro del segmento invertido y la posibilidad de que al menos se produzca un quiasma hecho que se ha relacionado con el tamaño del segmento invertido y de la incidencia de recombinación en dicho segmento (Morel et al. 2007).

1.3.2.- Translocaciones cromosómicas

Las translocaciones equilibradas son reorganizaciones en las que no hay ni pérdida ni ganancia de ADN por lo que, sus portadores, no presentan efectos fenotípicos. Se trata de reorganizaciones que implican intercambio de regiones entre dos o más cromosomas no homólogos, para ello se han de producir al menos una rotura en dos o más cromosomas y su posterior reparación con intercambio de los fragmentos generados por la rotura. Con tales premisas tenemos las translocaciones Robertsonianas, translocaciones recíprocas y translocaciones complejas o reorganizaciones cromosómicas complejas (CCR).

1.3.2.1.- Translocaciones Robertsonianas

Las translocaciones Robertsonianas, descritas por primera vez en 1916 por W.R.B. Robertson, consiste en la unión específicamente de dos brazos q de cromosomas acrocéntricos (en humanos los cromosomas 13, 14, 15, 21, 22) tras rotura de la región pericentromérica en ambos cromosomas y posterior fusión de centrómeros. Ello implica la pérdida de los respectivos pequeños brazos p. El cromosoma resultante recibirá el nombre de derivativo (ISCN 2013) (Fig. 1.10).

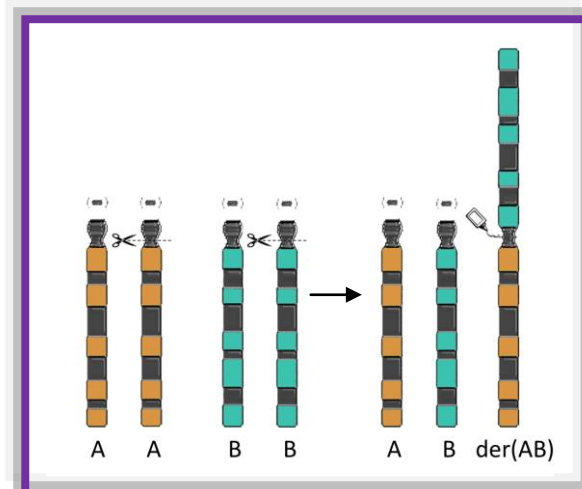


Figura 1.10 Formación de una translocación Robertsoniana

Las translocaciones Robertsonianas representan un 1,2 de cada 1000 nacimientos y una incidencia 9 veces mayor en individuos infértiles (De Braekeleer y Dao, 1991), siendo las más comunes la rob(13;14) con una incidencia del 74% y seguida, a más distancia, de la rob(14;21) con un 8%, el resto de combinaciones suceden con una frecuencia tan baja que son consideradas raras (Gardner et al. 2011). Estos autores han propuesto que la alta incidencia de la rob(13;14) y la relativamente menor de la rob(14;21) puede ser debida a que los cromosomas implicados comparten, en sus respectivos brazos p, segmentos de homología invertidos cercanos a los puntos de rotura que generan estas translocaciones (Gardner et al. 2011).

1.3.2.1.1.- Comportamiento meiótico de las translocaciones Robertsonianas

En meiosis, y concretamente en la profase I, los cromosomas homólogos han de emparejarse mediante el reconocimiento de sus secuencias homólogas. El emparejamiento cromosómico entre homólogos, en profase I, de los tres cromosomas implicados en la reorganización translocación Robertsoniana (el derivativo y los dos cromosomas no reorganizados) se consigue mediante la formación de la estructura del trivalente. Esta se puede organizar con una configuración geométrica en *cis* (los cromosomas homólogos a un mismo lado del cromosoma derivativo) o bien en *trans* (cada homólogo no reorganizado a un lado distinto del bivalente (Fig. 1.11). según se presente más o menos apareamiento de regiones heterólogas de los respectivos brazos p.

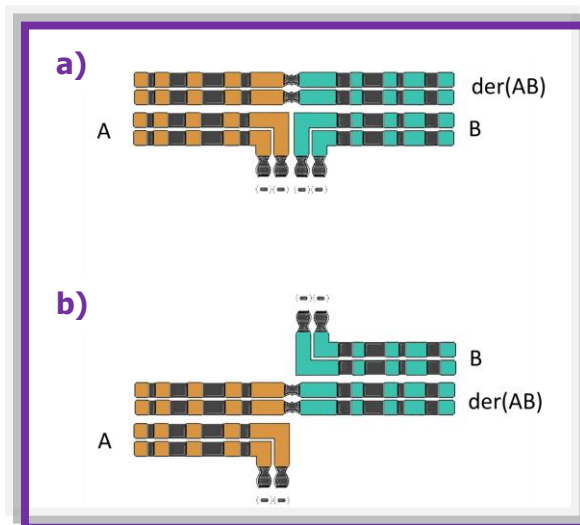


Figura 1.11 Disposición, en profase I de los cromosomas implicados en la translocación Robertsoniana formando un trivalente a) orientación *cis*, b) orientación *trans*

Durante anafase I, al igual que el resto de bivalentes, los cromosomas que conforman el trivalente han de separarse y segregar hacia polos opuestos. Existen tres formas distintas de segregación de los cromosomas que constituyen el trivalente y tan solo de una de ellas resultaran gametos normales o equilibrados. Estos tres modos son los siguientes:

- Segregación alternante (Fig. 1.12): los dos cromosomas no homólogos, no translocados, se separan hacia un polo mientras que el derivativo migra hacia el polo contrario. El resultado será de dos espermatocitos secundarios equilibrados, uno con dotación normal y el otro con el derivativo equilibrado.

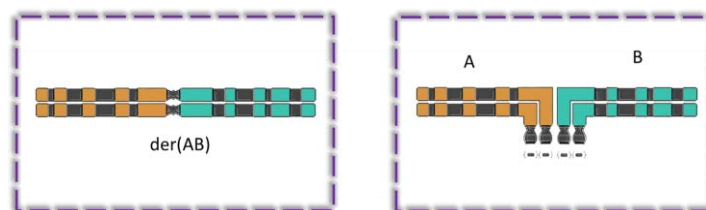


Figura 1.12 Productos de la segregación alternante

- Segregación adyacente (Fig. 1.13): los productos de segregación en este modo son ambos espermatocitos secundarios desequilibrados. El cromosoma derivativo y uno de los no translocados migran hacia un polo, resultando duplicada la información de ese cromosoma, mientras que al polo contrario migra el otro cromosoma no translocado, resultando en pérdida de información correspondiente al otro cromosoma.

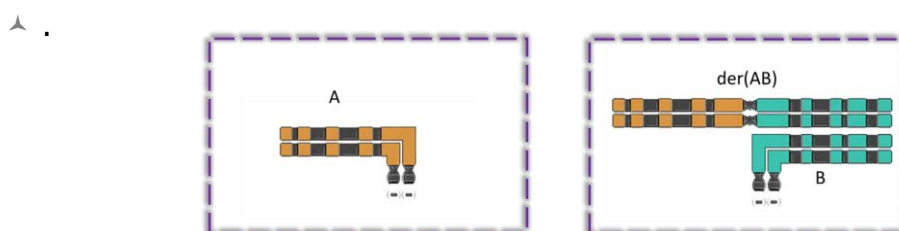


Figura 1.13 Uno de los dos opciones de productos de la segregación adyacente

- Segregación 3:0 (Fig. 1.14): la segregación de todos los cromosomas implicados en la reorganización, migran hacia el mismo polo. El resultado es desequilibrado y se produce un espermatocito secundario con doble duplicación y el otro nulisómico para los cromosomas implicados

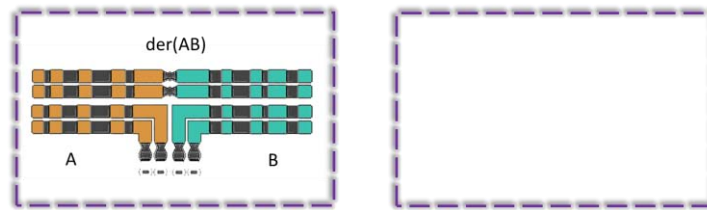


Figura 1.14 Productos de la segregación 3:0

Los estudios realizados en portadores de translocaciones Robertsonianas ha revelado un patrón de segregación similar en todos los portadores analizados con independencia de los cromosomas implicados. Estableciendo una frecuencia en promedio de 84,5% de gametos procedentes de la segregación alternante, que es la única que podría producir gametos normales o equilibrados para los cromosomas implicados; el resto serán gametos desequilibrados, de los que el 14,6% provienen de la segregación adyacente y el 0,6% de la segregación 3:0 (revisado por Anton et al. 2010).

1.3.2.2.- Translocaciones Recíprocas

Las translocaciones recíprocas son reorganizaciones cromosómicas que sobrevienen de una rotura en dos cromosomas no homólogos. Esta rotura se produce en uno de los dos brazos de cada cromosoma y la reparación se produce tras el intercambio de los fragmentos terminales, resultando dos cromosomas derivativos que se identifican según el centrómero que posea (Fig. 1.15).

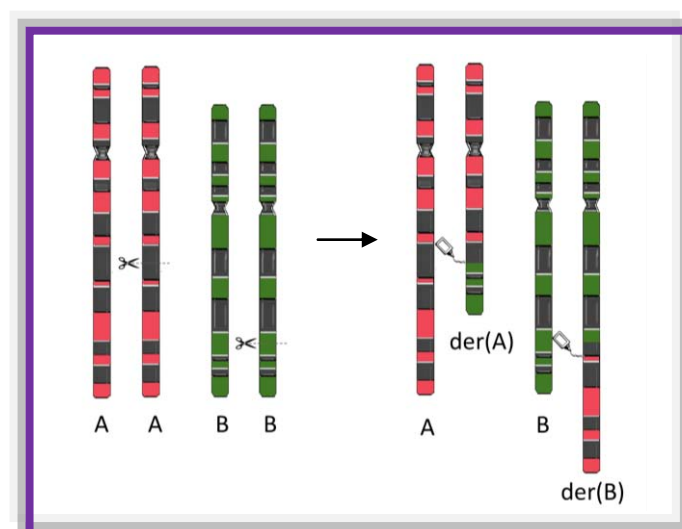


Figura 1.15 Formación de una translocación recíproca.

Aunque la mayoría de las translocaciones recíprocas suelen ser *de novo*, 1 de cada 700 nacimientos es portador de una translocación recíproca equilibrada (Nielsen y Wohler 1991) y se detecta con una frecuencia seis veces superior en población de individuos infértiles (De Braekeleer y Dao 1991) Esta reorganización puede ocurrir entre cualquier cromosoma del genoma, pero ciertamente existen regiones más susceptibles a sufrir roturas, entre las que destaca la banda 22q11 (Kato et al. 2012), siendo la $t(11;22)(q23;q11.2)$ la más frecuente en humanos (Hill et al. 2000). Kato et al. (2012) sugieren que la inestabilidad que comporta la formación de esta translocación viene dada por la presencia, en los puntos de rotura, de zonas palindrómicas ricas en nucleótidos A y T.

1.3.2.2.1.- Comportamiento meiótico de las translocaciones recíprocas

En profase I, el emparejamiento entre regiones homólogas, de los cuatro cromosomas implicados en la reorganización de la translocación recíproca se consigue mediante la formación de la figura de tetravalente. En ella se consigue el máximo nivel de apareamiento entre regiones homólogas entre los cuatro cromosomas implicados (los dos derivados y los dos cromosomas no homólogos) (Fig. 1.16)

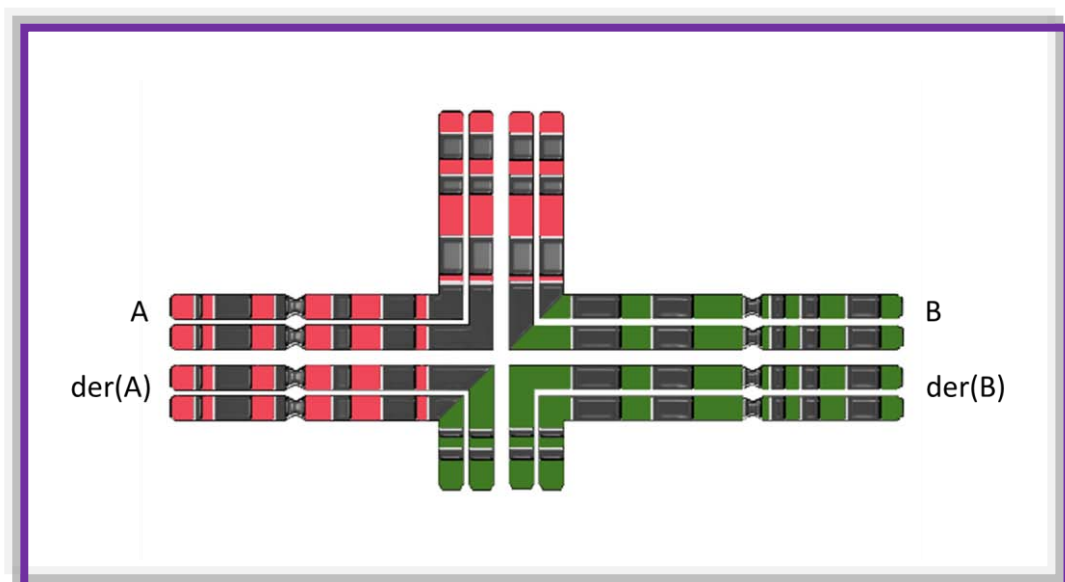


Figura 1.16 Esquema de la disposición en profase I de los cromosomas implicados en la reorganización formando un tetravalente

La resolución de la segregación del tetravalente durante la primera división meiótica, en anafase I, puede resolverse de cinco modos teóricos posibles y consecuentemente puede originar hasta 16 productos distintos en función de la distribución de los cromosomas en las células resultantes. Estos modos son los siguientes:

- \blacktriangleright Segregación alternante (2:2) (Fig. 1.17): los cromosomas no homólogos del tetravalente se separan de forma alterna, de modo que los cromosomas normales, no translocados, migran hacia un polo y los dos derivados hacia el polo contrario. Este modo de segregación resulta en un espermatocito secundario con dotación normal y el otro que recibe los dos derivados y por tanto con una dotación cromosómica equilibrada. Finalmente se producirán dos gametos normales y dos equilibrados.

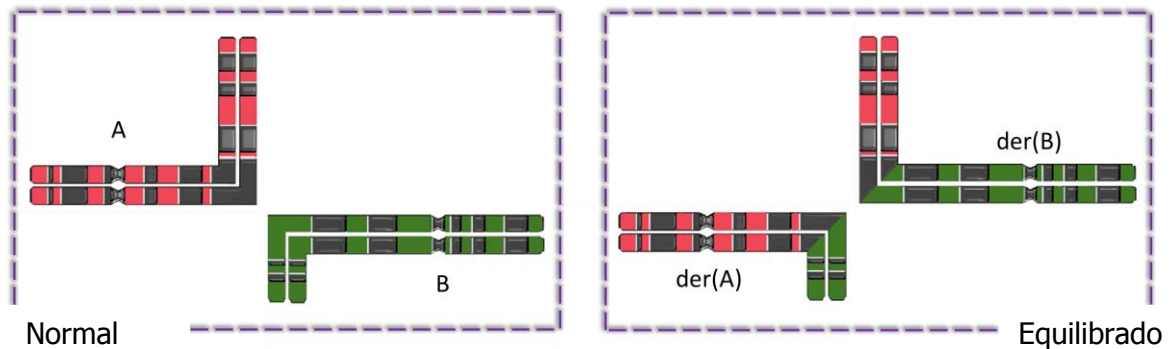


Figura 1.17 Productos de la segregación alternante 2:2

- \blacktriangleright Segregación adyacente I (2:2) (Fig. 1.18): los cromosomas cuyos centrómeros son homólogos segregan a polos opuestos de modo que a cada cromosoma normal le acompaña el derivado del cromosoma no homólogo. Los productos que se obtienen son desequilibrados conteniendo duplicación de uno de los fragmentos translocados y pérdida o deleción del otro fragmento.

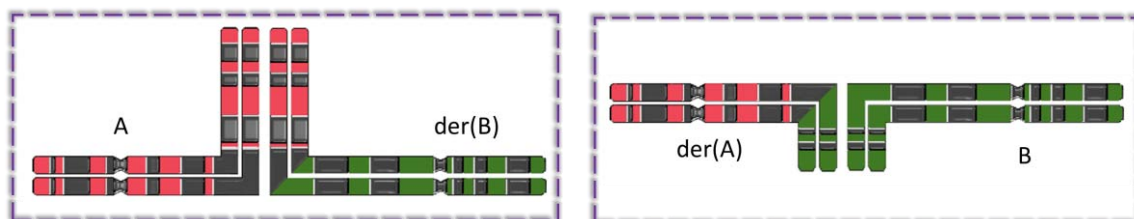


Figura 1.18 Productos de la segregación adyacente I (2:2)

- Segregación adyacente II: en este modo la segregación ocurre de forma que los dos cromosomas cuyos centrómeros son homólogos migran hacia el mismo polo. De esta manera se obtienen dos espermatocitos secundarios desequilibrados (con duplicaciones y deleciones) que contienen un cromosoma normal y su derivativo.

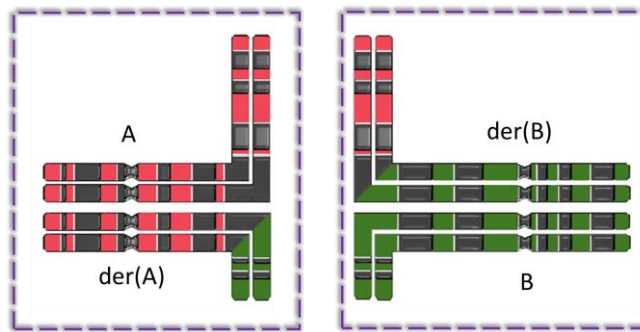


Figura 1.19 Productos de la segregación adyacente II 2:2

- Segregación 3:1 (Fig. 1.20): de esta manera hay cuatro combinaciones, que implican el reparto de tres cromosomas a un polo y el cromosoma restante de la combinación al polo contrario. Como resultado se podrían obtener hasta ocho espermatocitos secundarios desequilibrados.

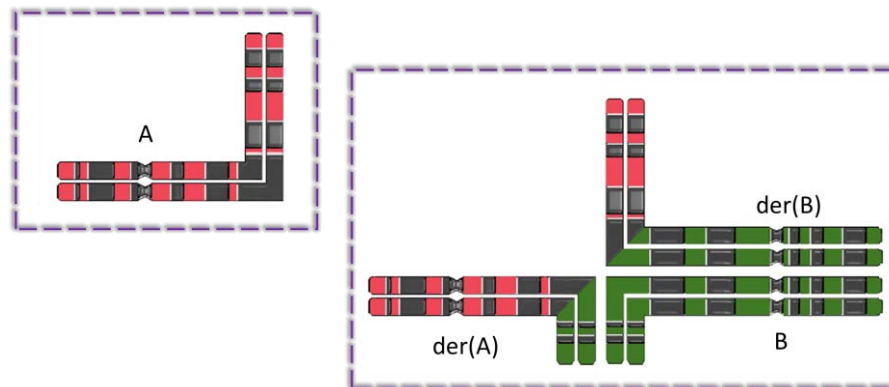


Figura 1.20 Ejemplo de productos de la segregación 3:1

- Segregación 4:0: en este caso todos los cromosomas implicados en la reorganización migran hacia el mismo polo, obteniendo dos espermatocitos secundarios desequilibrados con aneuploidías para ambos cromosomas no homólogos.

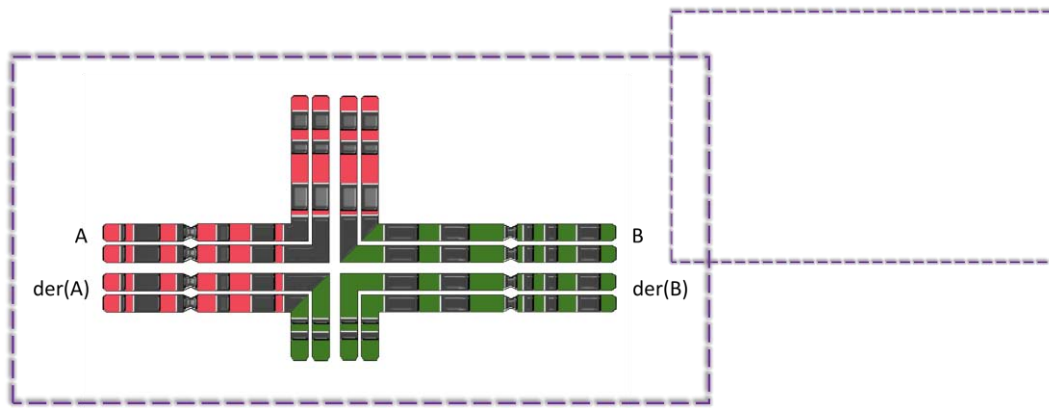


Figura 1.21 Productos de la segregación alternante 4:0

Los estudios de segregación en portadores de translocación, han permitido establecer unas frecuencias en las que se presentan los diferentes modos de segregación, si bien es cierto que existe gran variabilidad, el comportamiento general y promediado indica una segregación preferente del modo alternante frente al resto de modos. (Frédéric Morel et al. 2004; Benet et al. 2005).

En relación a los modos de segregación, no se puede desestimar la posible y probable formación de quiasmas en la región intersticial del tetravalente. La formación de al menos un quiasma intersticial provocaría la generación de cromosomas con cromátides hermanas desiguales (no complementarias en parte o cromosomas dimórficos). Este hecho comporta que la incidencia para cada tipo de segregación en cualquiera de los modos no se corresponde con la teórica esperada. Se obtendrían dotaciones desequilibradas a partir de la segregación alternante (50%) a la vez que se conseguirían productos equilibrados a partir de la segregación adyacente I (50%), con lo que la asociación de los productos equilibrado/normal con la segregación alternante no sería del todo correcta (Armstrong y Hultén), pero es un hecho que se obvia en la mayoría de estudios ya que los productos de ambos modos de segregación quedarían compensados en gran medida. Dado que el modo alternante es el modo que se ve más favorecido en la meiosis (Sybenga 1975) esta simplificación podría comportar una ligera sobreestimación de la segregación adyacente I en detrimento de la alternante. En el caso de la segregación adyacente II, los productos resultantes siguen siendo desequilibrados pero con una dotación en un 50% diferente a la esperada (Fig. 1.22).

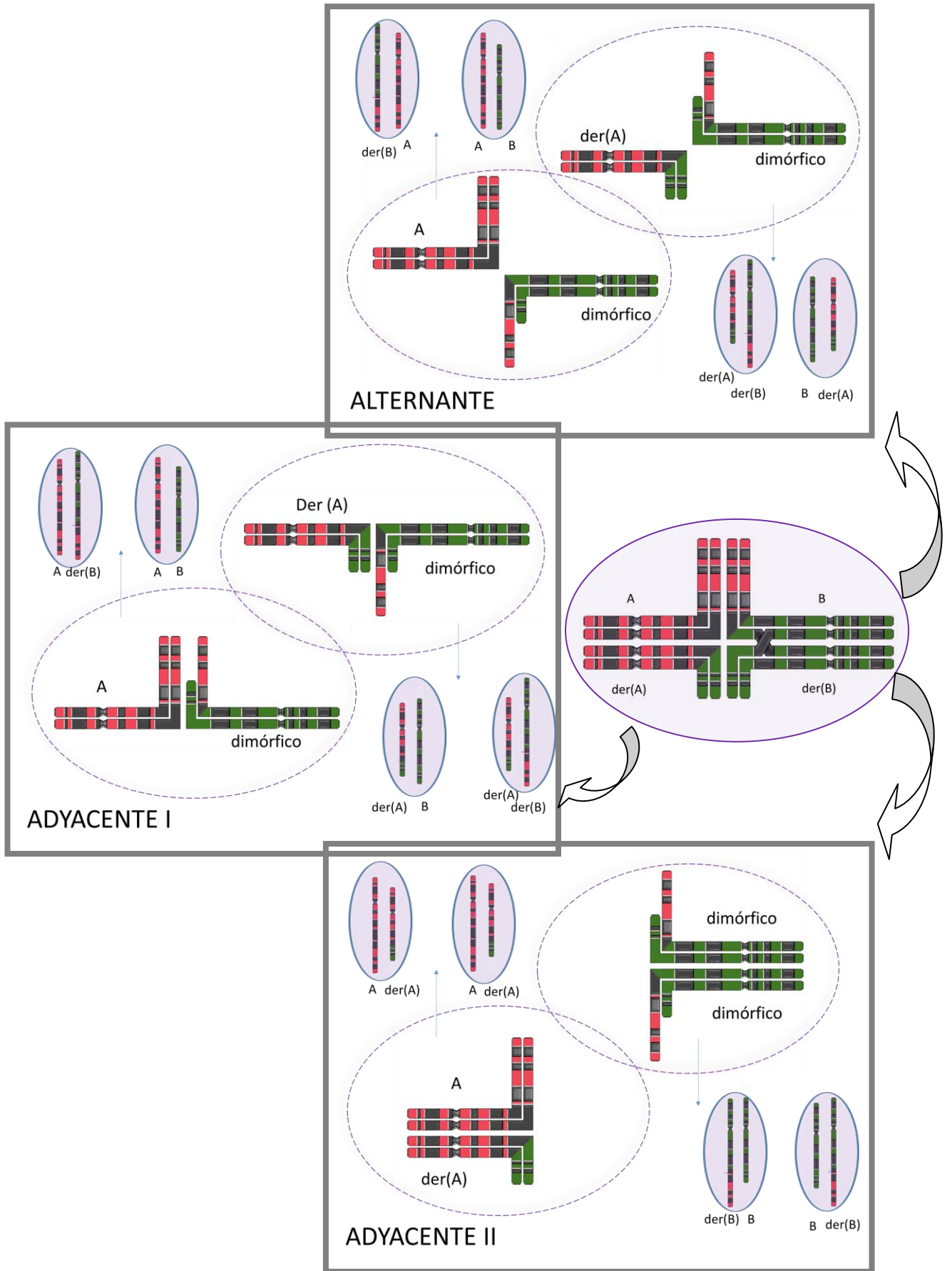


Figura 1.22 Segregación del tetravalente en caso de producirse un quiasma intersticial

1.3.2.3.- Translocaciones Complejas (CCR)

El término translocaciones complejas puede incluir diferentes tipos de reorganización según la distribución de los puntos de rotura. Se puede entender como la coexistencia de dos translocaciones recíprocas independientes en un mismo portador, aunque lo más común sería la triple translocación que implicaría una rotura en tres cromosomas distintos y el intercambio de los segmentos distales entre estos tres cromosomas implicados (Fig. 1.23). No se conoce la incidencia de este tipo de reorganizaciones en la población general, aunque en población infértil se estima en aproximadamente un 0,1% (Mau-Holzmann, 2005)

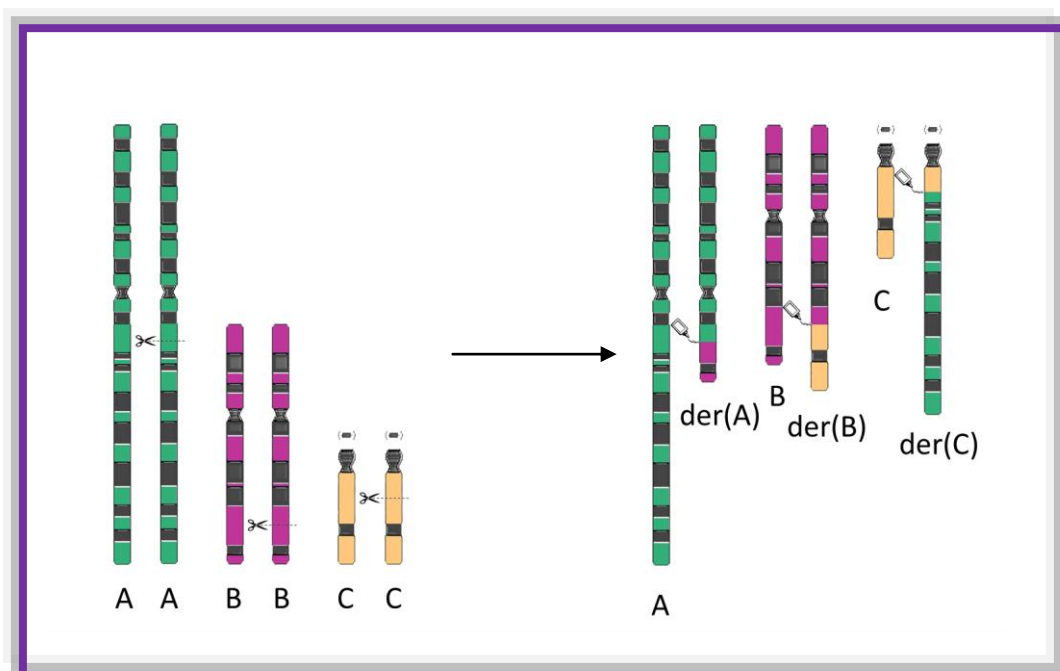


Figura 1.23 Formación de una triple translocación o translocación compleja

1.3.2.3.1.- Comportamiento meiótico de las translocaciones complejas

En profase I, el emparejamiento entre regiones cromosómicas homólogas o homosinapsis, de los seis cromosomas implicados en triples reorganizaciones o translocaciones complejas (los tres cromosomas normales y los tres derivados), también se consigue mediante la formación de la figura de apareamiento denominada hexavalente. (Fig. 1.24)

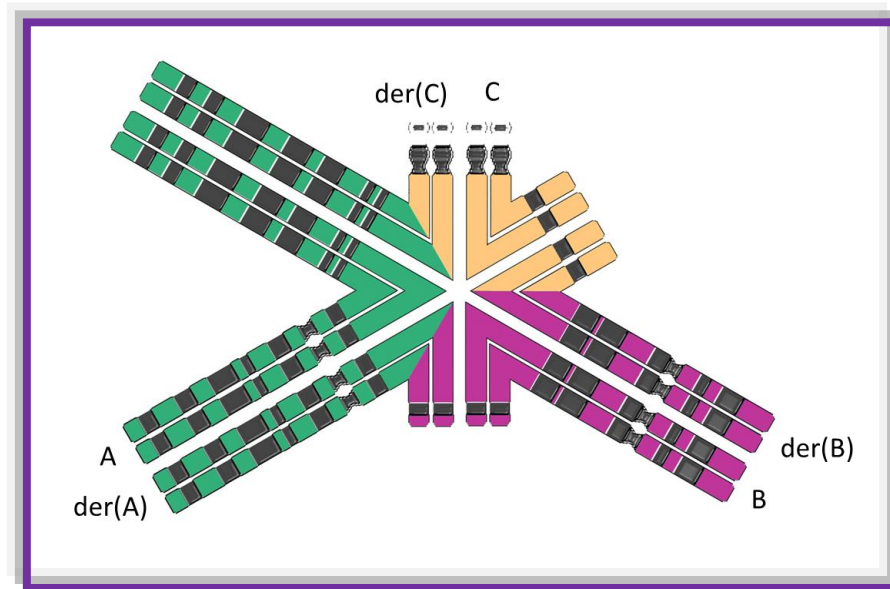


Figura 1.24 Esquema de la disposición en profase I de los cromosomas implicados en la reorganización formando un hexavalente

La figura del hexavalente es una estructura muy compleja que puede segregar de cinco modos diferentes, originando hasta 64 productos distintos (sin tener en cuenta las posibilidades de formación de quiasmas intersticiales y sus correspondientes cromosomas con cromátidas desiguales). Los modos de segregación (Fig. 1.25) son los siguientes:

- ✦ La segregación 3:3 alternante: Implica además de la migración de tres cromosomas no homólogos normales a un polo y de los otros tres cromosomas derivados al polo opuesto que es el único modo de segregación que permitirá la obtención de gametos con dotación cromosómica equilibrada o normal.

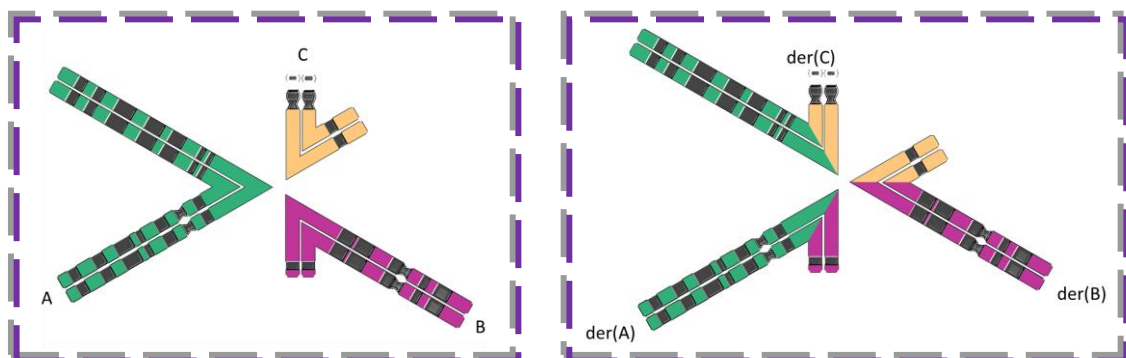


Figura 1.25 Segregación alternante con los dos productos normal y equilibrado

- Segregaciones 3:3 no alternantes: darían lugar a hasta 9 combinaciones distintas que producirían hasta 18 espermatoцитos secundarios desequilibrados.

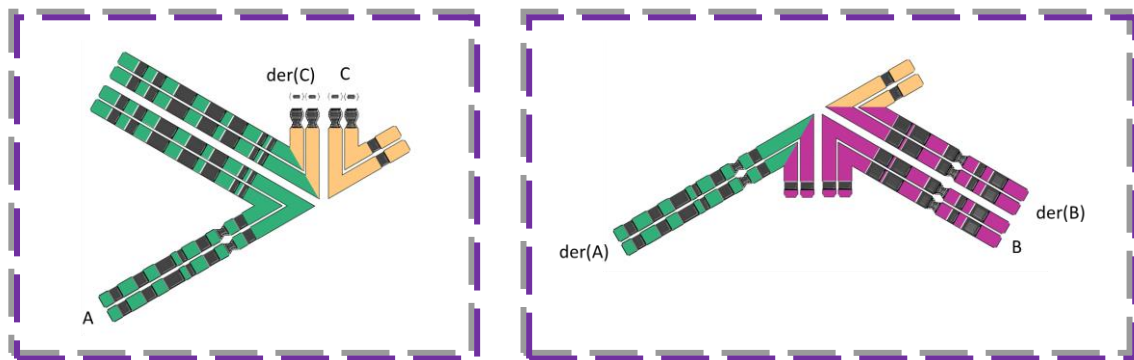


Figura 1.26 Un ejemplo de segregación 3:1 no alternante

- Segregación 4:2, (Fig. 1.27): darán lugar a 15 combinaciones diferentes que originan 30 espermatoцитos secundarios desequilibrados distintos,

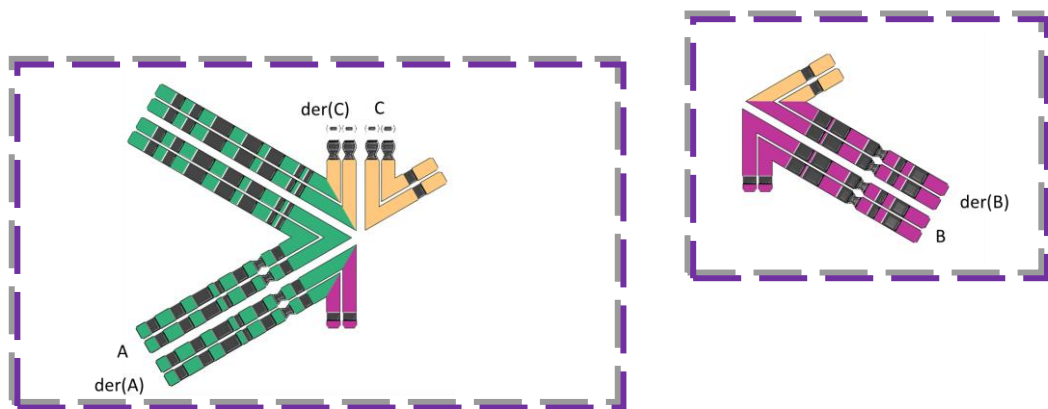


Figura 1.27 uno de los 15 modos de segregación 4:2

- Segregación 5:1, (Fig. 1.28): darán lugar a 6 combinaciones diferentes que originan 12 espermatoцитos secundarios desequilibrados distintos

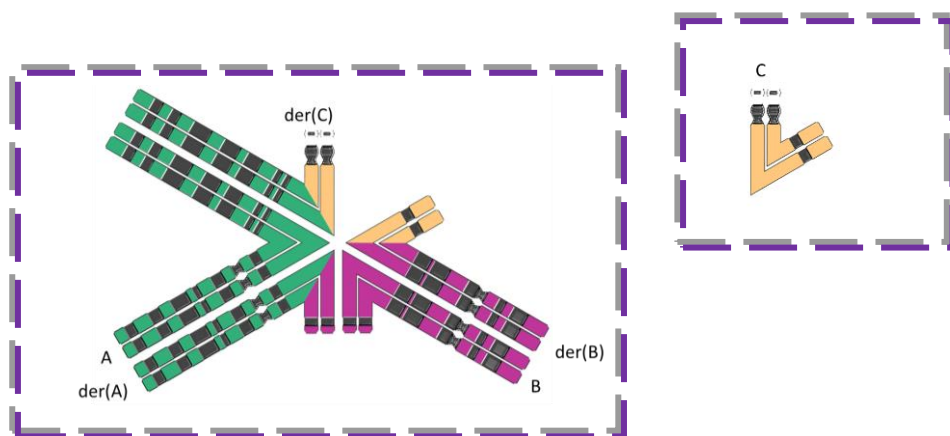


Figura 1.28 Uno de los 6 posibles modos de segregación 5:1

- Segregación 6:0 (Fig. 1.29): darán lugar a dos espermatozoides secundarios con aneuploidías para los tres cromosomas no homólogos implicados.

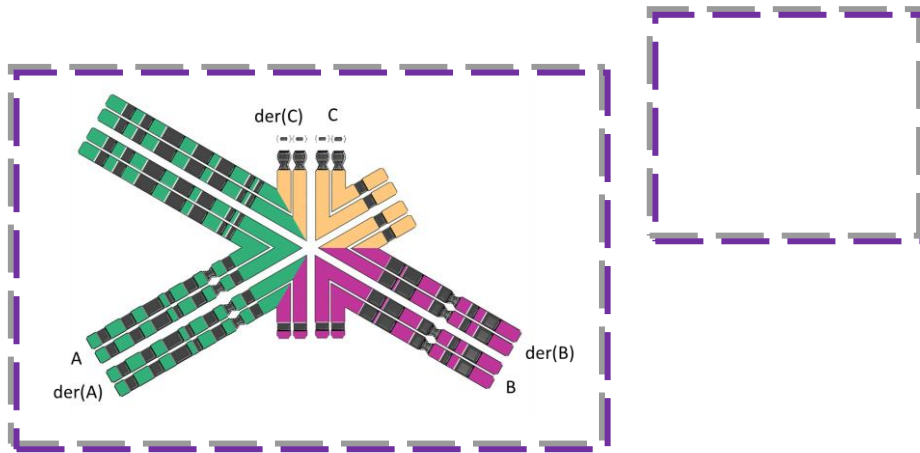


Figura 1.29 Segregación 6:0

En total 62 productos desequilibrados distintos con duplicaciones deleciones y aneuploidías y tan solo dos productos normal/equilibrado.

1.4.- RIESGO GENÉTICO DE LAS REORGANIZACIONES

La presencia de una reorganización cromosómica puede producir una alteración del proceso meiótico, además de la producción de gametos desequilibrados. Las anomalías que se pueden encontrar durante el proceso meiótico incluyen, entre otros, una disminución y/o alteración del número de quiasmas, presencia de univalentes, fragmentación, bivalentes asimétricos y poliploidías. Estas alteraciones pueden comprobarse posteriormente con la presencia de constituciones cromosómicas alteradas en el espermatozoide, pudiendo confluír en pérdida gamética, reducción de la fertilidad o aneuploidías en la descendencia (Egozcue et al. 2000).

Los cromosomas implicados en las reorganizaciones y sus homólogos deben adoptar configuraciones geométricas complejas a la hora de emparejarse en la etapa de paquiteno. Estas configuraciones favorecen el riesgo de que se provoquen regiones asináptadas, que se suelen localizar cerca de los puntos de rotura (Oliver-Bonet et al. 2005). Estas irregularidades son detectadas por diversos puntos de control a lo largo de la progresión de la meiosis activando los mecanismos de reparación. En algunas situaciones estas anomalías detectadas no pueden ser resueltas de modo que se induce el mecanismo de eliminación de la célula alterada mediante la apoptosis (Hamer et al. 2008) y produciendo pérdida gamética. En la etapa de metafase I participa un segundo punto de control, que actúa verificando la correcta distribución de los cromosomas y del uso meiótico. Una mala estructuración del uso o la presencia de cromosomas desalineados en la placa metafásica, podría ser detectado como una descompensación de fuerzas de tensión ejercidas por los microtúbulos sobre los cromosomas, por lo que se inhibiría el paso de metafase I a anafase I (Eaker et al. 2001).

A menudo, la activación de estos puntos de control significa una menor producción de gametos y por lo tanto una reducción de la capacidad reproductiva del individuo. En otras ocasiones se produce un desajuste de los puntos de control, que comportan una reducción de su funcionalidad, que en el caso de las anomalías cromosómicas, la presencia de univalentes o multivalentes comportan alteración de sinapsis y de recombinación en paquiteno que serían superadas (según se ha estudiado en modelos animales, Eaker et al.

2001) gracias a estos desajustes en los puntos de control y generando así gametos portadores de anomalías. El gametocito primario también puede eludir los puntos de control paquiténicos cuando se forman regiones asináptacas en presencia de anomalías cromosómicas, mediante el emparejamiento heterólogo con otras regiones del genoma. Este hecho también puede condicionar la correcta segregación de los cromosomas que han estado en contacto, generando anomalías cromosómicas en el espermatozoide resultante. A este fenómeno se le denominó efecto intercromosómico y fue descrito por Lejeune en 1963 al observar la alta incidencia de padres portadores de reorganización en niños con síndrome de Down.

La producción de gametos desequilibrados en portadores de reorganizaciones cromosómicas, están sujetas a los diferentes modos de segregación de las figuras geométricas de emparejamiento sináptico, adoptadas desde paquitenio y descritas en el apartado 1.3. En el caso de las inversiones dependerá de la producción o no de cromosomas recombinantes que como se detalla en el apartado 1.3.1.1. está en función del tamaño y número de quiasmas que se produzcan dentro de la región invertida. En el caso de las translocaciones cromosómicas, numerosos estudios recogidos en la literatura, han permitido determinar la influencia de cada modo de segregación en la producción de gametos desequilibrados. Estas frecuencias son menores a las que se esperarían según la frecuencia teórica de cada modo de segregación (14/16 en translocaciones recíprocas, 6/8 en translocaciones Robertsonianas, 62/64 en triples translocaciones). Esto se debe, principalmente, a que la orientación sintética de los dos centrómeros hermanos de cada cromosoma homólogo es la orientación preferente en metafase I y cualquier distorsión en la disposición de los cromosomas en la placa metafásica produciría un desequilibrio en las fuerzas del uso que activaría los mecanismos de control. Los eventos de no disyunción se ven menos favorecidos debido a la intervención de los puntos de control, aunque no podemos obviar el hecho de que la no disyunción en meiosis II es mayor en los gametos masculinos (Antonarakis et al. 1992).

1.5.- APROXIMACIONES METODOLOGICAS PARA EL ESTUDIO DE LA SEGREGACION CROMOSOMICA Y EL EFECTO INTERCROMOSOMICO.

El estudio de la segregación en hombres portadores de reorganizaciones cromosómicas equilibradas, se realiza analizando el contenido cromosómico de sus gametos. Para ello es necesario acceder al contenido del núcleo del espermatozoide que se encuentra altamente condensado. Hecho que condiciona mucho las técnicas para su estudio, ya que el espermatozoide, de forma fisiológica sólo descondensa su núcleo tras la fecundación del ovocito.

En 1976, Yanagimachi et al., demostraron la capacidad del espermatozoide humano para penetrar el ovocito de hámster desprovisto de zona pelúcida, con la consecuente posibilidad de alcanzar el estadio de metafase en condiciones de cultivo adecuadas. Fue en 1978 cuando Rudak et al. observaron por primera vez cromosomas de pronúcleo masculino y ya en 1982 cuando Martin et al. estandarizaron la metodología para la obtención de cromosomas de pronúcleo masculino. Esto fue el principio de distintos estudios cromosómicos en espermatozoide, utilizando las técnicas de citogenética clásica (bandas Q, R, G) con el fin de analizar desde los niveles basales de anomalías cromosómicas en población control, como individuos portadores de anomalías cromosómicas, o expuestos a agentes genotóxicos, entre otros (Benet et al. 1992; Templado et al. 1996; Navarro et al. 1993; Alvarez et al. 1997). Ya entrados los años noventa las técnicas moleculares no radioactivas aplicadas a la citogenética (FISH, WCP, PRINS) permitieron un análisis más rápido y eficiente de los complementos cromosómicos obtenidos (Cifuentes et al. 1998; Oliver-Bonet et al. 2006; Pellestor et al. 1997). Por tanto esta herramienta ha sido utilizada con éxito en el estudio de la segregación cromosómica de individuos portadores de reorganización, como es el caso de este trabajo.

La técnica de fusión heteróloga hámster-humano, permite el estudio de todos los cromosomas del núcleo espermático, pero presenta el inconveniente a nivel de estudio estadístico de los datos obtenidos ya que hay estudios que precisan de un gran número de células analizadas para que el resultado obtenido sea significativo, como sería el estudio del efecto intercromosómico. Por ello, y gracias a los estudios realizados sobre el proceso de descondensación de la cromatina del espermatozoide dentro del ovocito (Perreault y Zirkin

1982) se conocía que la presencia de agentes que rompían los puentes disulfuro, permitían la descondensación de la cromatina del espermatozoide. Por lo tanto el desarrollo de protocolos con este tipo de agentes reductores de los enlaces disulfuro, ha permitido el estudio de la cromatina nuclear del espermatozoide, haciéndola accesible a las sondas de hibridación *in situ*. No obstante al incremento sustancial del número de células evaluadas, esta técnica tiene el inconveniente de que no permite analizar el contenido total del núcleo espermático y que el estudio se realiza por inferencia de la presencia o no de las señales de hibridación que no cubren la totalidad del cromosoma analizado. Así mismo, tanto la estandarización de protocolos y criterios de evaluación de las señales hibridadas, como la eficiencia de estas es de gran importancia. Por lo tanto es conveniente valorar de antemano la mejor y más conveniente técnica a utilizar en los estudios que se vayan a realizar.

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1.- HIPÓTESIS

Se dispone de un sistema para la obtención de complementos de pronúcleo masculino basado en una fecundación heteróloga hámster-humano, que permite la obtención de dotaciones haploides de espermatozoide humano para su estudio citogenético. La eficiencia de este sistema puede ser mejorable mediante modificaciones en: la capacitación de los espermatozoides, el modo de bloqueo antimitótico y el sistema de identificación citogenético alternativo a las bandas G. Ello ha de permitir una gran mejora en el estudio citogenético (segregación cromosómica) de los gametos de portadores de distintas reorganizaciones cromosómicas.

2.2.- OBJETIVOS

1. Desarrollar un sistema mejorado de capacitación de espermatozoides y aplicar un antimitótico alternativo.
2. Desarrollar un sistema de pintado de cromosoma entero que diferencie los cromosomas de hámster respecto de los humanos y que permita la identificación individual de cromosomas humanos preseleccionados.
3. Aplicar el sistema de pintado de cromosoma entero al estudio de la segregación meiótica en complementos cromosómicos de pronúcleo masculino de portadores equilibrados de reorganizaciones cromosómicas.
4. Valoración de la incidencia de efectos intercromosómicos en las translocaciones recíprocas estudiadas.

3.- MATERIAL Y MÉTODO

3. 1.- MATERIAL BIOLÓGICO

En este trabajo se han utilizado muestras de semen de individuos portadores de anomalías cromosómicas estructurales, con el fin de estudiar la segregación meiótica y establecer el riesgo de descendencia desequilibrada (estudio realizado en cromosomas de espermatozoide), así como para el análisis de aneuploidias de algunos cromosomas no relacionados con las reorganizaciones (estudio realizado en cabezas descondensados de espermatozoides)

Los individuos sujetos a estudio han sido cinco portadores equilibrados de diferentes anomalías cromosómicas estructurales que se detallan a continuación en la Tabla 3.1

Tabla 3.1 Individuos portadores estudiados

Individuo	cariotipo
Sujeto 1	46, XY inv(7)(p13;q36)
Sujeto 2	46, XY t(2;11;22)(q13;q23;q11.2)
Sujeto 3	46, XY t(5;7)(q;21;q31)
Sujeto 4	46, XY t(9;17)(q12;p12)
Sujeto 5	46, XY t(9;17)(p13;q21,3)

Los cromosomas de espermatozoide se consiguen tras la fecundación heteróloga hámster humano (Martín et al. 1983; Benet et al. 1986). Los ovocitos utilizados para tal fin, proceden de hembras de hámster de la especie *Mesocricetus auratus*, también conocido como hámster sirio o dorado. Todos los hámsteres (de entre 2-6 meses) proceden de la colonia establecida en 1984 en el servicio de estabulación de la Universitat Autònoma de Barcelona. Las hámsteres se mantienen bajo estrictas condiciones de estabulación; agua *ad libitum*, pienso para roedores PANLAB y un suplemento vegetal dos veces a la semana (zanahorias o lechuga), 14 horas de luz y 10 de oscuridad, una temperatura de 20-22°C y una humedad del 40-70 %.



Hámster Sirio o dorado

3. 2.- OBTENCIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SEMEN

Las muestras de semen se han obtenido por medio de masturbación manual, después de 2-3 días de abstinencia sexual, y recogidos en frascos estériles de poliestireno. Las muestras de semen se dejan licuar a temperatura ambiente durante 30-40 minutos. Una vez licuada se comienza el procedimiento de congelación que consiste en los siguientes pasos:

1. Valoración del semen de acuerdo con la normativa de la WHO (World Health Organization; 1992) (Volumen $\geq 2\text{ml}$, concentración $\geq 20 \times 10^6$ de espermatozoides, motilidad $\geq 50\%$, morfología $\geq 30\%$ de formas normales).
2. Resuspensión de la muestra en crioprotector a una proporción de 1:1 (ver apartado 3.5.5.)
3. Agitar suavemente durante unos minutos hasta obtener una emulsión homogénea
4. Alícuotar la emulsión en criotubos estériles de 1 ml previamente identificados con los datos del donante.
5. Depositar las alícuotas, en un contenedor de congelación (Nalgene® Cryo1°C), a -80°C durante un mínimo de 4 horas.
6. Transferir con rapidez a un tanque de nitrógeno líquido (-196°C) hasta su utilización.

3. 3.- OBTENCIÓN DE CROMOSOMAS DE ESPERMATOZOIDE HUMANOS: FECUNDACIÓN HETERÓLOGA HÁMSTER-HUMANO.

El proceso para la obtención de complementos de pronúcleo masculino se puede ver esquematizado en la Fig. A y se detalla a continuación.

3.3.1.- Procesado y capacitación de muestras de semen

El tiempo requerido para una adecuada capacitación es difícil de determinar ya que hay gran variedad entre muestras de semen. Este factor junto con la dificultad de obtener la cantidad de muestras necesarias para realizar su estudio, hace necesario el uso de ionoforo de calcio A23187 (Kamiguchi y Mikamo 1986; Alvarez et al. 1996). El uso de ionoforo nos permite acelerar y unificar los tiempos de capacitación de las diferentes muestras, además de permitirnos el uso de fracciones más pequeñas de muestra así como rentabilizar las muestras de baja calidad

El ionoforo de calcio A23187 es un complejo lipolítico que induce la reacción acrosómica aumentando la capacidad penetrante del espermatozoide, incrementando así el

rendimiento de la técnica de fusión interespecífica hámster-humano. El proceso consiste en los siguientes pasos:

1. Descongelar la muestra durante 5-10 minutos a temperatura ambiente
2. Diluir la muestra en 4 ml de medio Biggers-Whitten-Whittingham (BWW) suplementado con 0,3% de albúmina sérica humana (HSA) (BWW₃) (ver apartado 3.5.5.)
3. Centrifugar durante 6 minutos a 600 g para eliminar los restos de crioprotector y plasma seminal.
4. Retirar el sobrenadante con cuidado y disgregar el sedimento (botón celular) por agitación suave.
5. Diluir el *botón celular* en 2 ml de medio BWW₃ y centrifugar 6 minutos a 600 g.
6. Descartar el sobrenadante y disgregar, con suavidad, el *botón celular*.
7. Resuspender en 0,5 ml de medio BWW₃ y sedimentar centrifugando 3 minutos a 300g.
8. Dejar el tubo inclinado (aproximadamente 45°) incubando durante 1 h a 37°C y 5% CO₂ con el fin de seleccionar los espermatozoides móviles por medio de migración vertical o *swim-up*.
9. Recoger el sobrenadante con los espermatozoides más móviles, en un tubo estéril.
10. Centrifugar 6 min. a 600 g.
11. i descartar el sobrenadante con cuidado y resuspender el botón celular de los espermatozoides más móviles, en una solución de ionoforo de calcio A23187 en medio BWW₃. La concentración final del Ionoforo ha de ser de 10 µM. Incubar 10 minutos a 37°C y 5% CO₂.
12. Centrifugar 6 minutos a 600 g.
13. Descartar el sobrenadante.
14. Resuspender el *botón celular* en 0,4 ml de medio BWW₃₃.
15. Realizar la capacitación durante 2-3 h máximo a 37°C y 5% CO₂.
16. Determinar la concentración de espermatozoides de las placas de inseminación transcurrida 1-1,5 h del periodo de capacitación.
17. Preparar la placa de inseminación (ver apartado 3.5.5.) y dejar incubando a 37°C y 5% CO₂ hasta el momento de la inseminación.

3.3.2.- Obtención de ovocitos de hámster e inseminación interespecífica

Se induce una maduración sincronizada de un elevado número de folículos para la consecuente súper ovulación en hámster adultas (2-3 meses). Este proceso se induce mediante la inoculación intraperitoneal de gonadotropinas. Los valores de hormona están determinados para un animal de tamaño medio (100-140 g). Los pasos a seguir se realizan en placas de cultivo (ver apartado 3.5.5.) y se describen a continuación:

1. El primer día del ciclo de las hámsteres (4-8 animales por experimento) inocular en la zona peritoneal de 35-40 UI de PMSG.
2. Transcurridas 58-60 h se inoculan 30-35 UI de HCG.

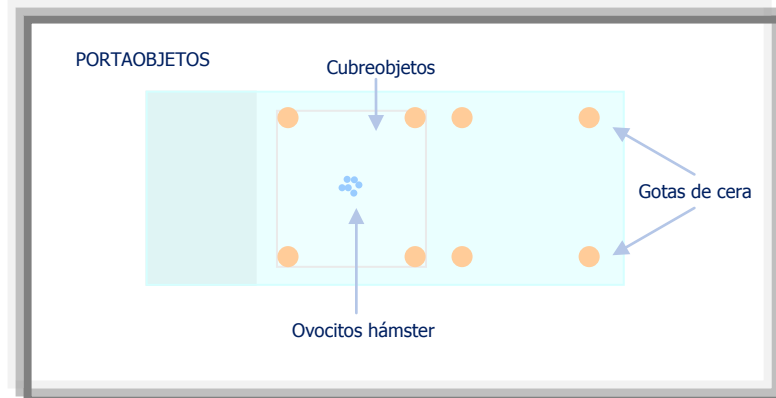
3. Transcurridas 16,5-17 h se sacrifican las hámsteres (anestesia y muerte por asfixia con CO₂).
4. Disección inmediata de los oviductos, eliminación de restos de sangre (inhibidor de la fecundación) e inmersión en medio BWW₃.
Bajo control de estéreo microscopio (10x-20x aumentos) y con la ayuda de un capilar adecuadamente preparado se realizan los siguientes pasos:
5. Extracción del *cúmulus* (grupo de células que forman un tejido laxo que envuelve los ovocitos) por perfusión: mediante descarga a presión de medio BWW₃ a través de la fimbria, utilizando una jeringa de 1 ml provista de aguja despuntada.
6. Tratamiento del *cúmulus* con hialuronidasa 0,1% en medio BWW₃, hasta que se disgregan las células del *cúmulus* y se liberan los ovocitos (aproximadamente de 30-50 por animal).
7. Lavado de los ovocitos en medio BWW₃, para eliminar los restos del *cúmulus*
8. Tratamiento con Tripsina 0,1% en medio BWW₃, hasta eliminar la zona pelucida de los ovocitos liberándose el primer corpúsculo polar sin exceder el tiempo evitando dañar la membrana de los ovocitos.
9. Lavado en medio BWW₃ y a continuación breve lavado en medio BWW₃₃ (medio usado durante la inseminación).
10. Inseminación interespecífica de los ovocitos de hámster obtenidos y los espermatozoides humanos ya capacitados, en la placa de medio BWW₃₃ donde se encuentran los espermatozoides ya capacitados,
11. Coincubación máxima de 3 h

3.3.3.- Control de penetración o hámster test

Con el fin de determinar el índice de penetración y el porcentaje de fecundación que precisamos para tener un óptimo rendimiento de la técnica el primer control se realiza entre 30 y 40 minutos después de la inseminación. Consiste en:

1. Se valora el grado de penetración de los espermatozoides en algunos de los ovocitos (5-10) inseminados. Para ello se preparan unos portaobjetos, a los que hemos previamente depositado unas gotas de cera formando dos cuadrados ambos de un tamaño algo más reducido que un cubreobjetos. Se succionan los ovocitos con poco volumen de medio y se colocan justo en medio de las cuatro gotas.
2. Inmediatamente se coloca un cubreobjetos sobre los ovocitos y bajo estéreo microscopio (10x aumentos), suavemente se aplastan los vértices del cubreobjetos adhiriéndose a la cera del portaobjetos. De esta manera los ovocitos quedan comprimidos pudiéndose visualizar, al microscopio de contraste, mediante objetivos de x4 y x20, su interior.
3. Se analiza tanto el número de ovocitos penetrados, que muestran las cabezas de espermatozoides hinchadas (Fig. 3.1), como el número de cabezas hinchadas por ovocito. Las condiciones más adecuadas se dan cuando el porcentaje de fecundación de los ovocitos es del 50% de los ovocitos analizados y el índice de penetración está entre 1,5 y 2, máximo.

a)



b)

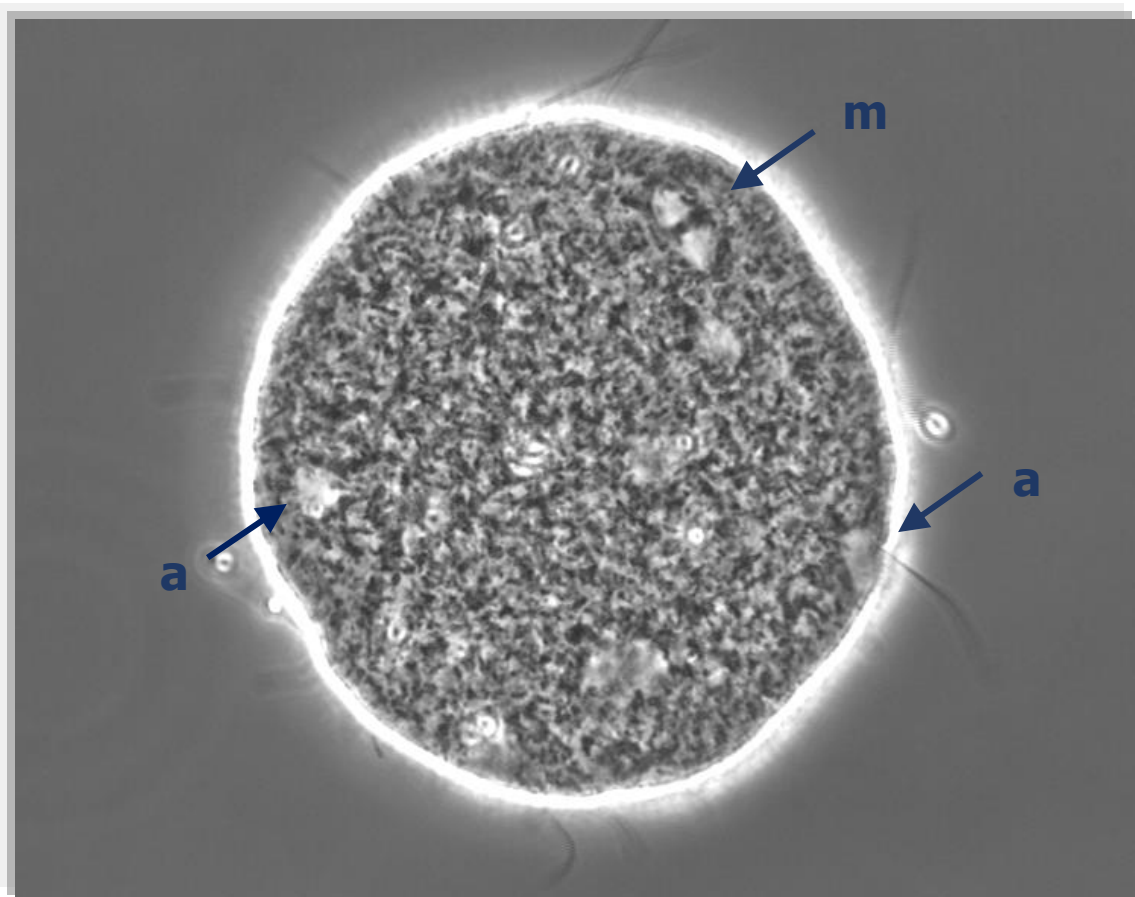


Figura 3.1 a) Porta para realizar el control de penetración b) Imagen de un ovocito de hámster presionado, pudiéndose observar las cabezas de espermatozoide hinchadas (a) y la placa metafísica (m).

3.3.4.- Cultivo de los cigotos heterólogos

Una vez obtenido el índice de penetración y el porcentaje de fecundación deseado se procede al cultivo de los ovocitos penetrados o cigotos heterólogos. Brevemente consistiría en:

1. Lavado de los ovocitos penetrados o cigotos heterólogos con medio F-10 (ver apartado 3.5.5.)
2. Transferencia de los cigotos heterólogos a una placa de F-10
3. Se dejan incubando en atmósfera 5% CO₂ y a 37°C durante 4-7 h
4. Pasado este tiempo, se transfieren los cigotos heterólogos a una placa de F-10 que contiene vinblastina a una concentración de 0,1 µg/ml. Nota: la vinblastina es antimitótico, bloquea la mitosis, detiene las células en metafase y también puede interferir con el metabolismo de los aminoácidos; su acción es específica de la fase M del ciclo de división celular y para la división en la primera metafase mitótica de los cigotos heterólogos
5. Se dejan incubando en atmósfera 5% CO₂ y a 37°C durante unas 12-14 horas

3.3.5.- Obtención de los complementos cromosómicos de pronúcleo masculino

Los cigotos heterólogos, transcurrido el periodo de incubación descrito anteriormente, son fijados sobre un portaobjetos desengrasado con alcohol isopropílico según el método de Tarkowski (1966). El proceso se realiza con la ayuda de un estereoscopio. Brevemente:

1. Se prepara una placa de cuatro pocillos con solución de citrato sódico al 1% (solución hipotónica) a la que previamente se ha impregnado el fondo con suero fetal de vaca (FCS) para evitar que los cigotos heterólogos queden adheridos a la superficie de la placa. Dejamos actuar el hipotónico durante 5-10 minutos
2. Se utiliza la placa con un hipotónico nuevo tras retirar el hipotónico con suero de los pocillos.
3. Se sacan algunos cigotos heterólogos (10-20) de la placa de F-10 y se ponen en uno de los pocillos durante 5 minutos Nota: con una pipeta se dejan en el primer pocillo y con otra limpia se cambian inmediatamente a otro pocillo para eliminar restos de parafina de las placas de medios, ya que podrían interferir impidiendo una buena fijación del material
4. Pasado el tiempo se dejan, en una pequeña gota de hipotónico, sobre un portaobjetos previamente desengrasado con metanol frío.
5. Se añade una gota (20 µl) de fijador Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1) sobre los cigotos heterólogos
6. En cuanto se hacen evidentes los heterocigotos, se localizan bajo el estereoscopio y se marca la zona en la que se encuentran con el lápiz de diamante, por debajo del portaobjetos.

7. En cuanto aparece la irización y sin dejar que la muestra se seque ni un momento, se le añade otra gota de Carnoy. Nota: la segunda gota es fundamental que se ponga lo más rápido posible ya que es crucial para una buena fijación
8. Se siguen añadiendo gotas de Carnoy (2-3) justo antes de que se cierre la irización y hasta que los cigotos heterólogos dejan de verse a través del estereoscopio.
9. Los portaobjetos con los complementos cromosómicos fijados se almacenan a -20°C hasta su posterior análisis.

En las extensiones cromosómicas de los cigotos heterólogos se puede identificar i) el complemento cromosómico femenino del hámster ($n = 22$ cromosomas) i ii) el o los complementos cromosómicos de pronúcleo masculino de espermatozoide humano ($n = 23$ cromosomas). Este último muestra descondensación de bloques de heterocromatina centromérica y constitutiva de los cromosomas 1, 9, 15, 16, Y (Fig. 3.2)

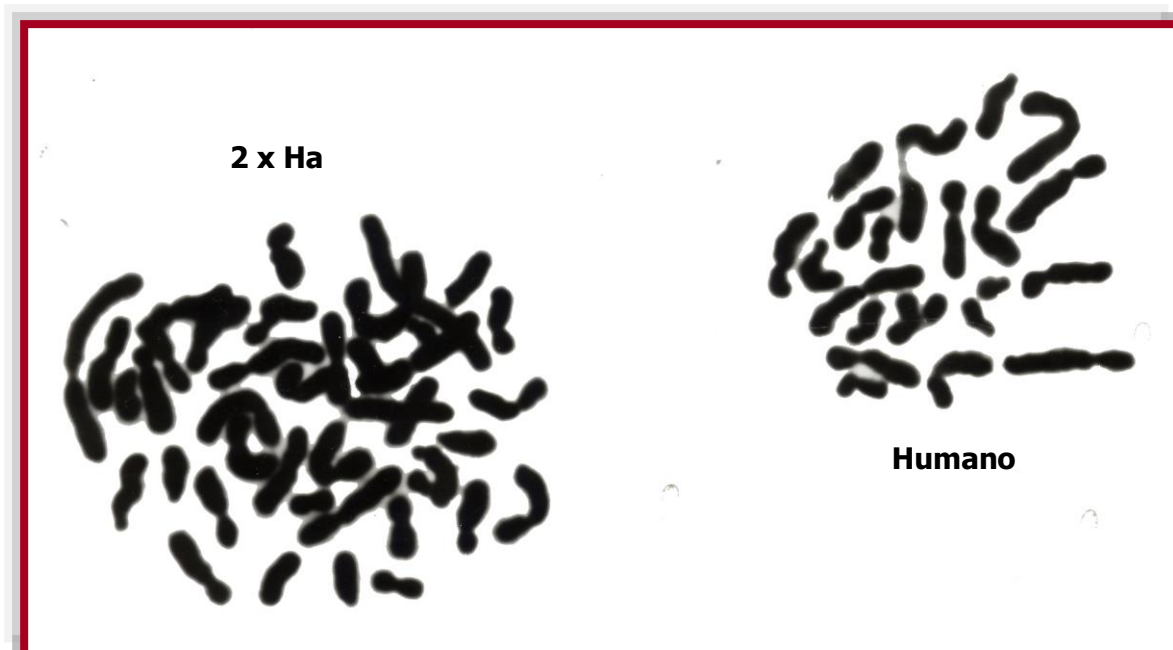


Figura 3.2 Extensión cromosómica de cromosomas de pronúcleo masculino humano a la derecha de la imagen y dos complementos de pronúcleo de hámster

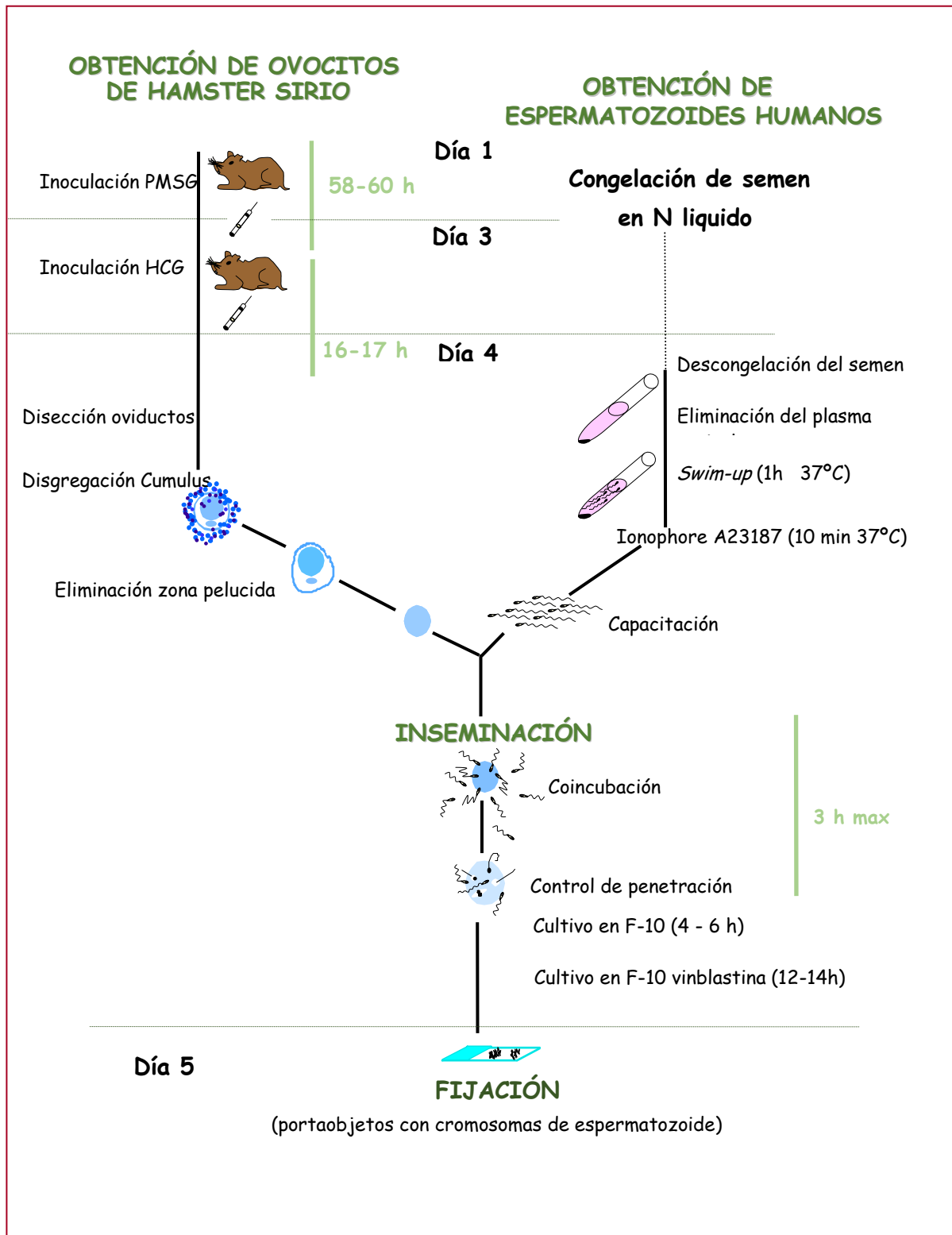


Figura A. Esquema de la técnica de obtención de cromosomas de espermatozoide

3. 4.- OBTENCIÓN DE PREPARACIONES DE NÚCLEOS DESCONDENSADOS DE ESPERMATOZOIDES

3.4.1- Fijación de las muestras de semen

Las muestras de semen utilizadas, frescas o congeladas, siguen el mismo procedimiento que consiste en los siguientes pasos:

1. Se licuan o descongelan las muestras de semen a temperatura ambiente
2. Se lavan con medio hipotónico (KCL 0,075 M) para eliminar los restos de crioprotector y/o plasma seminal centrifugando 6 minutos a 600 g.
3. Se retira el sobrenadante y se disgrega el *botón celular*.
4. Se añaden 6-7 ml de Carnoy gota a gota y con agitación.
5. Centrifugar 6 minutos a 600 g.
6. Se repiten los pasos 3. a 5. al menos dos veces.
7. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el *botón celular* en 0,5-1 ml de Carnoy.
8. Se extiende el material ya fijado dejando caer una gota sobre un portaobjetos desengrasado con metanol.
9. Los portaobjetos con espermatozoides fijados se almacenan a -20°C hasta su posterior análisis.

3.4.2.- Descondensación de núcleos de espermatozoides

Las muestras de cabezas, núcleos, de espermatozoide fijados han de someterse a un tratamiento de descondensación de la cromatina para hacerla accesible en el proceso de hibridación *in situ*. Para ello se siguen los siguientes pasos:

1. Sometemos las muestras fijadas al a un baño de 2xSSC durante 3 minutos para eliminar los restos de Carnoy.
2. Se deshidratan las muestras en baños sucesivos en etanol (70%, 90%, 100%) de 2 minutos y secado al aire.
3. Se sumergen las muestras en una solución de ditionitrol (DTT) de 10 a 15 minutos según la muestra (ver apartado 3.5.5.).
4. Se lavan los restos de DTT sumergiendo el portaobjetos/las muestras en 2xSSC durante 3 minutos.
5. Se deshidratan las muestras en baños sucesivos en etanol (70%, 90%, 100%) de 2 minutos y secado al aire.

3. 5.- ANALISIS DE LOS COMPLEMENTOS DE PRONUCLEO MASCULINO Y DE NÚCLEOS DESCONDENSADOS DE ESPERMATOZOIDE MEDIANTE HIBRIDACION IN SITU

Para poder realizar el análisis mediante hibridación *in situ* de los complementos cromosómicos y las cabezas hinchadas, núcleos descondensados, de espermatozoides, correspondientes a individuos portadores de reorganizaciones (ver Tabla 3.1), son necesarias sondas de ADN correspondientes a los diferentes cromosomas, implicados, que se desea analizar (ver Tabla 3.2).

Previamente a la aparición, en el mercado, de sondas cromosómicas purificadas y marcadas con fluorocromos, las sondas de ADN utilizadas eran sondas elaboradas previa extracción, purificación y marcaje de ADN bien de tejido, bien de genotecas de ADN cromosómico clonado en vectores víricos.

Tabla 3.2 Sondas de ADN utilizadas a lo largo de este trabajo

<i>Sondas</i>	<i>Localización</i>	<i>Marcaje</i>	<i>Procedencia</i>
WCP 2		Spectrum Orange /Spectrum Green	Vysis inc, Izasa (España)
WCP 5		Spectrum Orange	Vysis inc, Izasa (España)
CEP 6	Alpha satélite 6	Spectrum Green	Vysis inc, Izasa (España)
WCP 7		Spectrum Green	Vysis inc, Izasa (España)
ATCC 7	genoteca LL07NS01	Biotina/Digoxiginina	The american type culture colection (Manassas, VA 20110 USA)
Tel 7q	7q-ter	Spectrum Orange	Vysis inc, Izasa (España)
CEP 7	Alpha satélite 7	Spectrum Green	Vysis inc, Izasa (España)
WCP 9		Spectrum Green	Vysis inc, Izasa (España)
WCP 11		Spectrum Orange	Vysis inc, Izasa (España)
WCP 17		Spectrum Orange	Vysis inc, Izasa (España)
CEP 18	Alpha satélite 18	Spectrum Aqua	Vysis inc, Izasa (España)
LSI 21	21q22.13-21q22.2	Spectrum Orange	Vysis inc, Izasa (España)
WCP 22		Spectrum Green	Vysis inc, Izasa (España)
CEP X	Alpha satélite X	Spectrum Green	Vysis inc, Izasa (España)
CEP Y	Alpha satélite Y	Spectrum Orange	Vysis inc, Izasa (España)
Genómica hámster		Biotina/Digoxiginina	Elaboración propia

WCP sonda de pintado cromosómico

CEP sondas centroméricas

LSI sondas locus específica

Tel sondas subteloméricas

3.5.1.- Obtención, marcaje y preparación de las sondas de ADN

3.5.1.1.- Extracción de ADN genómico de Hámster

En principio con este método se pueden obtener 2 mg de ADN, en fragmentos de 100 a 150 Kb, por gramo de tejido. Para obtener el ADN genómico aislado para su posterior utilización, se siguen los siguientes pasos:

1. Preparar un tubo de polipropileno de 10 ml con 1,2 ml de tampón de digestión (ver apartado 3.5.5.)
2. Se disecciona, preferentemente, un lóbulo de hígado de Hámster.
3. El tejido obtenido de la disección se corta en trocitos lo más pequeños posible utilizando una tijera curva esterilizada, la manipulación ha de ser rápida para evitar la degradación del tejido.
4. Una vez triturado el tejido se incorpora al tubo que contiene el tampón de digestión agitándolo vigorosamente hasta obtener la máxima homogenización posible.
5. Se añade Proteinasa K a una concentración final de 0,1 mg/ml y se deja incubando durante 12-18 horas a 56° C en agitación (los tubos se tapan con *parafilm*)
6. Una vez completada la digestión se realizan 2 desproteinizaciones con Fenol:cloroformo-isoamil alcohol:
 - Añadir V:V la solución de Fenol:cloroformo-isoamil alcohol
 - mezclar por inversión del tubo durante 10 minutos
 - Separar las dos fases por centrifugación (1.700g durante 10 minutos a 4°C Centrifuga Sorvall rotor SS34)
 - Transferir la fase acuosa a otro tubo de centrifuga y repetir la extracción

NOTA: Si las fases no se separan bien añadir 1 volumen de tampón de digestión, agitar i re centrifugar. La causa de este problema, puede ser la presencia de un exceso de detritos celulares o bien una gran cantidad de ADN.

Extracciones fenol:cloroformo: se pretende que las proteínas y los detritos celulares queden retenidas en la fase orgánica y que el ADN quede retenido en la fase acuosa.

Fenol: desnaturaliza y solubiliza las proteínas; también solubiliza los oligoelementos de bajo peso molecular y los nucleótidos. El fenol puede solubilizar los ARN que presenten una cola polyA larga. El pH del fenol ha de ser 8, pues sino parte del ADN quedará retenido en la interfase.

Cloroformo: También desnaturaliza las proteínas y además estabiliza la interfase entre la fase acuosa y el fenol. Utilizando los dos solventes a la vez se reduce la retención de fase acuosa en la fase orgánica.

Alcohol isoamilico: evita la formación de espuma y la separación de las fases.

7. Se centrifuga la fase acuosa sola. Recuperación de la fase acuosa.
8. Se extrae, con isoamilalcohol de los restos de cloroformo. Centrifugar y recuperar la fase acuosa.
9. Se elimina el isoamilalcohol mediante extracción con éter saturado (éter:agua, preparado justo antes de usar) y elimina el éter que queda arriba y las trazas dejando evaporar unos minutos en un baño a 60° C
10. Se añade 1 µg/ml de RNAsa y 0,1% de SDS
11. Se incuba una hora a 37° C

12. Se desproteína con Fenol:cloroformo-isoamilalcohol, dos veces
13. Se recupera y centrifuga la fase acuosa
14. Se realiza una última extracción con fenol:cloroformo-isoamilalcohol
15. Se añade a la fase acuosa 0,5 volúmenes de acetato amónico 7,5 M y agitar por inversión
 - Sales: para poder precipitar el ADN se ha de conseguir una concentración de cationes monovalentes >0,1 M. Se pueden utilizar diferentes tipos de sales:
 - NaCl: es la menos soluble en etanol al 70% por tanto después de los lavados el ADN puede quedar sucio
 - acetato amónico o acetato sódico
16. Se añaden 2,5 volúmenes de etanol absoluto
 - etanol: En presencia de cationes monovalentes entre 0,1 y 0,5 M el etanol es capaz de alterar la estructura de los ácidos nucleicos y de hacerlos precipitar
17. Se agita por inversión hasta que se forme el "algodoncillo" de ADN característico
 - Incubación a -20° C o a -70° C: la incubación a bajas temperaturas ayuda a la precipitación del ADN cuando este se encuentra en pequeñas concentraciones
18. Se recupera el ADN por centrifugación durante 2 min a 1700 g
 - La centrifugación breve en presencia de una alta concentración de sales evita que gran parte del RNA precipite
19. Se elimina el sobrenadante
20. Se lava dos veces el botón celular con etanol 70% (transferir el ADN a un eppendorf en el segundo lavado)
 - Etanol 70%: es capaz de disolver sales y moléculas orgánicas pequeñas
21. Se centrifuga y elimina el etanol para después dejar secar
22. Resuspender el botón celular en TE

3.5.1.2.- Amplificación de la sonda recibida de ATCC

Las sondas que recibimos de ATCC (American Type Culture Collection) son genotecas de cromosomas concretos, que están clonados en un vector Charon 21 A (fago que infecta a la cepa de *E.coli* LE392).

Para cada sonda existe un título teórico, que en principio si el transporte ha sido correcto, debe ser el real. En caso de que ese título sea insuficiente (o sea, $<10^7$) para realizar la amplificación se debe realizar una preamplificación (ver 3.5.1.2.1). En caso de que sea suficiente y no se necesite la preamplificación se pasará a titular el vial, sólo por precaución (ver 3.5.1.2.2) y para tener el título lo más preciso posible, para seguir con la amplificación (ver 3.5.1.2.3) y posterior purificación del ADN (ver 3.5.1.2.4). Brevemente se describen los diferentes pasos seguidos para la obtención de las sondas de ADN:

3.5.1.2.1.- Preamplificación (Cultivo líquido a pequeña escala)

Preparar, el día antes, un cultivo de la cepa *E.coli* LE392 en medio LB enriquecido con maltosa al 0,2% (ver apartado 3.5.5.).

1. Mezclar 100 µl de un cultivo fresco de *E.coli* LE392 con aproximadamente 10^6 pfu de bacteriófago en un tubo estéril.
2. Incubar 15 minutos a 37°C para permitir la adsorción del bacteriófago.
3. Añadir 4 ml de medio LB 0,2% maltosa e incubar a 37°C y con agitación durante 6-12 horas (hasta que ocurra la lisis).
4. Después de que haya ocurrido la lisis se añaden 2 gotas de cloroformo y se continúa la incubación 15 minutos más para asegurar que todo el cultivo está lisado.
5. Centrifugar el cultivo lisado 10 minutos a 4000 g y 4° C.
6. Recoger el sobrenadante, añadir una gota de cloroformo y guardar a 4° C. El título que se espera suele ser de alrededor de 10^{10} pfu/ml y suele permanecer invariable mientras se conserve a 4° C.

3.5.1.2.2.- Titulado de un lisado

1.- Preparación de las células bacterianas para el cultivo en placa

- a.- Poner 50 ml de medio LB 0,2% maltosa estéril en un matraz estéril de 250 ml e incubar, previo inóculo de una sola colonia (colonia que extraemos de una siembra en escocés de células de *E. coli* para obtener colonias aisladas) de *E. coli* LE392, a 37° C durante toda la noche y en agitación (250 ciclos/min). = cultivo de noche

NOTA: Se hace crecer la bacteria en presencia de maltosa ya que así se facilita la posterior adsorción del bacteriofago λ . Este azúcar induce el operon de la maltosa que contiene el gen lamB que codifica para el receptor del bacteriofago λ .

- b.- Centrifugar el cultivo de células a 4000g durante 10 min.

- c.- Descartar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 10 mM de MgSO₄ estéril (unos 20 ml). Conservar a 4°C aunque se obtienen mejores resultados cuando se usan células de un cultivo fresco.

2.- Preparación del bacteriófago para su cultivo en placa (Fig. B):

- a.- Preparar un banco de diluciones a partir del *stock* de bacteriófago en 10 mM de MgSO₄, de forma que las diluciones sembradas a partir del título teórico proporcionen un número de calvas que sean fáciles de contar (entre 10 y 100)

NOTA: una calva deriva de la infección de una sola bacteria por una sola partícula vírica. Las partículas víricas originadas infectan bacterias vecinas generando otra generación de partículas hermanas. Bajo estas circunstancias el resultado de sucesivas rondas de infección, es una aparente zona de lisis que se puede ver como un área clara en contraste con la turbidez del medio colindante.

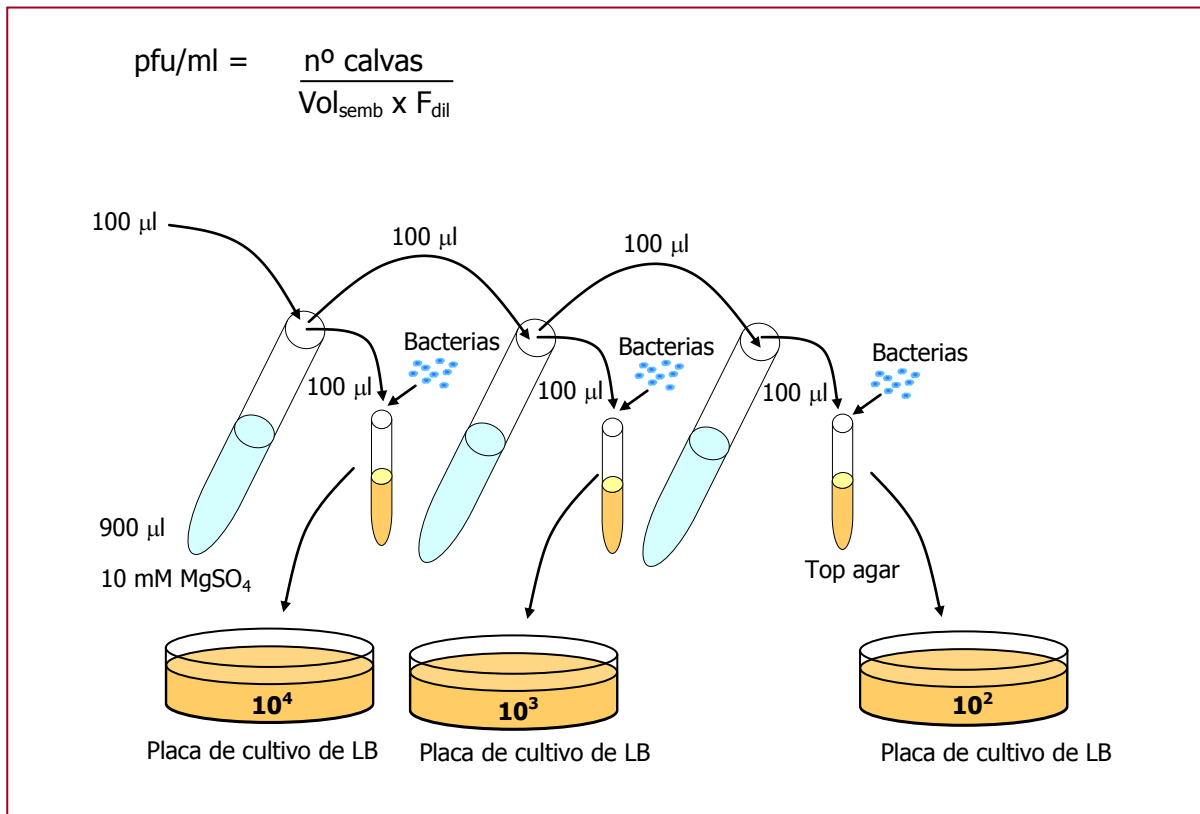


Figura B. Banco de diluciones para el contaje del bacteriofago

3.- Siembra en placa (confluente):

- a.- Poner 100 µl de cada dilución que se quiera sembrar en un tubo estéril.
- b.- Añadir 100 µl de las bacterias preparadas, mezclar e incubar durante 20 min a 37°C
- c.- Añadir 3 ml de medio *top agar* (calentado a 47°C) mezclar y sembrar en placa con medio LB rápidamente. Repetir el proceso para cada tubo.
- d.- Dejar solidificar para después tappar la placa y ponerla a incubar en una estufa a 37°C toda la noche (las placas se ponen en la estufa boca abajo para evitar que el agua que se condense en la tapa y moje el medio).

4.- Calculo del título:

Se cuenta el número de calvas y mediante la fórmula del apartado 2 se calcula las pfu/ml, teniendo en cuenta el factor de dilución en cada caso y el volumen sembrado que es siempre 0,1 ml.

3.5.1.2.3.- Amplificación (Infección de baja multiplicidad)

1. Cultivo de noche de una sola colonia de *E.coli* LE392 en 100 ml de medio LB 0,2 % maltosa en un matraz estéril de 250 ml, o si es posible de 500 ml, incubación a 37°C y agitación (250 ciclos/min)

2. Lectura de la DO_{600} del cultivo. Calcular la concentración de células asumiendo que $1 DO_{600} = 8 \times 10^8$ células/ml
3. Recoger en un tubo estéril una alícuota que contenga 10^{10} células y centrifugar a 4000g durante 10 min a T^{amb} . Descartar el sobrenadante.
4. Resuspender el botón celular en 3 ml de 10 mM $MgSO_4$
5. Infección del cultivo a proporción con una $MOI = 0,05$ (5×10^8 pfu/ 10^{10} cfu). Se deja incubando durante 20 min a $37^\circ C$ con agitación intermitente.
6. Se inocula el cultivo infectado en 500 ml de medio LB 0,2% maltosa dentro de un matraz de al menos 1 L de capacidad. Se deja incubando con agitación a $37^\circ C$ durante 9-12 h, hasta que la lisis sea completa (un lisado completo contiene una considerable cantidad de restos celulares, siendo fácilmente apreciable la lisis del cultivo infectado, apareciendo el medio más transparente debido a la precipitación de los restos celulares).
7. Transcurrido el tiempo de incubación y producida la lisis (si esta no se ha producido se puede dejar incubando de 2 a 3 h más), se añaden 10 ml de cloroformo y se deja incubando 10 minutos más.

3.5.1.2.4.- Purificación

3.5.1.2.4.1.- Purificación del fago:

1. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se añade ADNsa I pancreática y RNAsa, cada una a una concentración final de 1 $\mu g/ml$ para eliminar los ácidos nucleicos de la bacteria. Incubar 30 min. a T^{amb} .
2. Añadir NaCl sólido 1 M (29,2 g por 500 ml de cultivo). Disolver y dejar una hora en hielo. NOTA: la adición de NaCl promueve la disociación de los fagos de los residuos de las bacterias y es requerida para la precipitación de los fagos en presencia de polietilenglicol (PEG).
3. Se eliminan residuos por centrifugación a 11.000 g durante 10 min. a $4^\circ C$. Se recoge el sobrenadante en un recipiente limpio.
4. Se añade polietilenglicol (PEG) sólido a una concentración final del 10% (p.e. 50 g por 500 ml de sobrenadante. Se disolverá a T^{amb} . y en agitación durante toda la noche.
5. Se enfría en agua fría y se mantiene al menos una hora en hielo para permitir la precipitación de los fagos.
6. Se recoge el precipitado de fagos por centrifugación a 11.000 g 10 min. a $4^\circ C$. Se decanta el sobrenadante y se deja drenar el fluido, dejando invertido el tubo durante 5 min., se elimina con una pipeta el fluido restante.
7. Resuspender el botón celular en 10 mM $MgSO_4$ (8 ml por cada 500 ml de sobrenadante en el paso 3 del proceso de purificación).
8. Extracción del PEG y residuos celulares de la suspensión por adición de un volumen igual de cloroformo. Mezclar mediante vortex 30 sg. Separar fase acuosa de fase orgánica por centrifugación a 3000 g 15 min. a $4^\circ C$. Se recupera la fase acuosa la cual contiene las partículas del fago.

9. Colectar las partículas víricas por centrifugación a 25.000 r.p.m. durante 2 h a 4°C en un rotor Beckman SW28 (o equivalente). Para esta centrifugación se deben utilizar tubos COREX que aguanten como mínimo 15.000 r.p.m.
10. Tirar el sobrenadante. El botón de fago debe ser bien visible (sin embargo es bastante transparente). Añadir 1-2 ml de 10 mM MgSO₄ al tubo y dejar durante la noche a 4°C, preferentemente en una plataforma mecedora.
11. A la mañana siguiente resuspender bien. Ya se puede proceder a la extracción del ADN del fago.

3.5.1.2.4.2.- Purificación del ADN del fago:

1. Se añade proteinasa K a una concentración final de 50 µg/ml (para eliminar las proteínas de la cápside vírica).
2. Se añade 10% SDS a una concentración final de 0,5%. Mezclar por inversión del tubo.
3. Incubación de 1 h a 56°C.
4. Enfriar la mezcla de digestión a T^{amb}.
5. Desproteinización con fenol. Se recupera la fase acuosa.
6. Extracción con fenol: cloroformo-isoamilalcohol (24:1) y se recupera la fase acuosa.
7. Extracción con cloroformo-isoamilalcohol (24:1). Recuperar la fase acuosa.
8. Añadir acetato sódico 3 M pH=7 a una concentración final de 0,3 M y mezclar bien.
9. Añadir 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y dejar reposar a T^{amb} durante 30 min.
10. Centrifugar 10 min. a 13.000 g. Eliminar del todo el sobrenadante
11. Lavar el botón celular con etanol 70% frío y transferir el botón celular a un tubo eppendorf. Centrifugar a 13.000 g 10 min.
12. Eliminar del todo el sobrenadante y secar el *botón celular*
13. Disolver en TE y comprobar la extracción mediante electroforesis (ver apartado 3.5.5.)

3.5.1.3.- Marcaje y preparación del ADN sonda

3.5.1.3.1.- Marcaje del ADN sonda

Las diferentes sondas son marcadas, con diferentes moléculas no fluorescentes como son la Biotina y la Digoxigenina, mediante *kits* comerciales de *nick-traslation*. Brevemente los pasos seguidos para el marcaje son los siguientes:

- 1.- En un tubo eppendorf, enterrado en hielo (4°C), se añaden:
 - ❖ Para el marcaje con biotina (utilizamos el *kit* de BRL, guardado a -20°C)
 - (a) 5 µl. solución 10x dNTP Mix (*kit* biotin-14-dATP).
 - (b) 1 µg. de sonda.
 - (c) H₂O destilada hasta 45 µl. Se agita suavemente.
 - (d) 5 µl solución 10x Enzym Mix (ADNpolimerasa/ADNasa I)
50 µl.
 - ❖ Para el marcaje con Digoxigeneina (*kit* de Boehringer Mannheim, guardado a -20°C)
 - (a) 10 µl dNTP-mixture (ver apartado soluciones en stock y medios)
 - (b) 0.1 a 2 µg de sonda
 - (c) 2 µl 10xTampón (vial 6)
 - (d) H₂O destilada hasta 18 µl. Se agita suavemente.
 - (e) 2 µl Enzyme-mixture (ADNpolimerasa/ADNasa I)
20 µl.
- 2.- Mezclar y centrifugar unos segundos
- 3.- Incubación a 16°C en un baño (vaso de agua a 16°C aislado en caja de corcho) durante 90 min.
- 4.- Añadir 50 µl. de solución STOP-MIX (ver apartado 3.5.5.)
- 5.- Filtración en columnas de Sephadex G25.

Preparación de columnas Sephadex G25

Estas columnas se utilizan para purificar el ADN sonda marcado, de los nucleótidos sobrantes, para así mantener la especificidad de la sonda marcada. Las columnas se preparan siguiendo los siguientes pasos:

1. Se prepara una jeringa de 1 ml y rellenamos con lana de vidrio hasta la marca de 0,1 ml.
2. Se prepara la columna de Sephadex tomando con una pipeta Pasteur Sephadex G25 hidratado con TE, que tenemos en stock (ver apartado 3.5.5.), y se llena una jeringa de 1 ml, centrifugamos a 1600 g 4-5 min. para eliminar el TE. Se repite ésta operación hasta que la columna queda llena y compacta.
3. Se Lava la columna con TE tres veces, centrifugando a 1600 g 4-5 min cada vez.
4. Se hace bajar el ADN a través de la columna de la siguiente manera:
 - *Poner la muestra de sonda en la parte superior de la columna

*Centrifugar a 1600 g de forma que se recupera la sonda en un eppendorf. La sonda queda recogida en un volumen aproximadamente igual al volumen filtrado.

NOTA: La sonda marcada se puede guardar a -20°C durante al menos 1 año.

3.5.1.3.2.- Comprobación del marcaje con Biotina o Digoxigenina

Antes de comenzar la hibridación de los complementos cromosómicos dicha comprobación se debe realizar para asegurar que se ha conseguido el marcaje deseado. El proceso seguido es el mismo independientemente de la molécula de marcaje incorporada, mientras que los *kits* de detección si son específicos para cada molécula. El proceso consta de los siguientes pasos:

1. Preparación del ADN control

Se parte de un ADN λ marcado y que se encuentra a una concentración inicial de 0,2 ng/ μl en 6xSSC. Se preparan las siguientes diluciones usando el "*ADN dilution buffer*" del *kit* BluGENE (en el caso de que la molécula incorporada sea Biotina) o bien del *kit* DIG Nucleic acid detection *kit* (en caso de que la molécula incorporada sea Digoxigenina):

Dilución A: se añaden 2 μl de ADN λ marcado (200 pg/ μl) en 98 μl de *ADN dilution buffer*. La concentración final será de 10 pg/2,5 μl .

Dilución B: Se añaden 50 μl de la dilución A en 50 μl de *ADN dilution buffer*. La concentración final será de 5 pg/2,5 μl .

Dilución C: Se añaden 50 μl de la dilución B en 50 μl de *ADN dilution buffer*. La concentración final será de 2,5 pg/2,5 μl .

Dilución D: SE añaden 50 μl de la dilución C en 50 μl de *ADN dilution buffer*. La concentración final será de 1,25 μl /2,5 μl .

2. Preparación del ADN marcado para su comprobación

Para ello el ADN marcado y filtrado por las columnas de Sephadex se diluye de la siguiente forma:

Dilución 1: Se añade 1 μl de la muestra marcada y filtrada en 100 μl de TE.

Dilución 2: Se añade 1 μl de la dilución 1 en 50 μl de *ADN dilution buffer*. Se esperará una concentración de 5 pg/2,5 μl , (ya que se parte del marcaje de 1 μg de sonda que después se ha diluido en 100 μl de TE)

3. Preparación del filtro de nylon

a). Se recorta un filtro de tamaño 7x4 cm. (Para la manipulación del filtro se deben usar guantes sin polvo; se procurará utilizar unas pinzas planas para coger el filtro). Marcar una esquina mediante un pequeño corte para así determinar la orientación del filtro.

b). Poner 2,5 μl de cada dilución control sobre el filtro, en orden decreciente de concentración, y en horizontal. Debajo de estas gotas se pondrán 2,5 μl del ADN marcado. Dejar secar las gotas y ponerlo entre papel Whatman.

c). Exposición del filtro en el transiluminador durante 5 min por la cara en la que se ha puesto el ADN o bien incubar durante 30 min. en un horno a 120°C .

4. Detección del ADN marcado e inmovilizado en filtro de nylon

Todas las incubaciones se realizan a temperatura ambiente, a no ser que se indique otra cosa, y con agitación suave (excepto la reacción de coloración) para ver la composición de las soluciones de trabajo (ver apartado 3.5.5.)

- a) Lavado del filtro durante 1 min. en tampón 1.
- b) Incubación durante 20 min. a 42°C en 30 ml de tampón 2.
- c) Lavado breve en tampón 1.
- d) Incubación del filtro durante 15 minutos en 2 ml de disolución de anticuerpo-conjugado dentro de una bolsa de hibridación soldada. La disolución se prepara antes de ser usada diluyendo 2 μ l del preparado de streptoavidina-phosphatasa alcalina del *kit* en 2 ml de tampón 1.
- e) Lavado del filtro dos veces en 20 ml tampón 1 durante 15 min. cada uno.
- f) Equilibrado durante 3 minutos en 20 ml de tampón 3
- g) Incubación del filtro a oscuras dentro de una bolsa de hibridación soldada con 3 ml de solución de coloración recién preparada y específica para cada molécula de marcaje incorporada (ver apartado 3.5.5.) . El precipitado de color comienza a formarse al cabo de pocos minutos y la reacción se completa después de unas horas. No se debe mover la bolsa.
- h) Cuando las marcas ya se observan se para la reacción lavando con *stop buffer*.

NOTA: el filtro mojado se puede fotocopiar o fotografiar. Se puede dejar secar para guardarlo, entonces el color pierde intensidad pero retorna si se vuelve a mojar.

3.5.1.3.3.- Preparación de la sonda marcada para la hibridación

Los 100 μ l. de sonda recogida por filtración a través de la columna de Sephadex se procesan para obtener una mezcla adecuada de trabajo. Para ello se seguirán los siguientes pasos:

1. A la sonda marcada se le añaden:
 - a) m_b ng ADN geonómico humano (200-300 pb) (el valor de m_b depende del valor del factor Q más favorable -entre 4 y 5 para tiempos de hibridación cortos-).[Tabla 3.3]
 - b) 2,5 Vol. Etanol frío
 - c) 0,1 Vol. Acetato sódico 2 M
2. Mezclar bien por inversión del tubo, y dejar precipitar durante 30 min a -20°C
3. Centrifugar 30 min. a 4°C
4. Descartar el sobrenadante y añadir 2,5 vol. de Etanol frío, mezclar invirtiendo el tubo
5. Centrifugar 15 min. a 4°C
6. Descartar el sobrenadante y dejar secar
7. Disolución del botón celular en 10 μ l de Formamida pura
8. Incubar a 37°C durante 30 minutos para disolver el ADN. Guardar en la nevera

Siendo Q igual a la media de copias no marcadas y marcadas de cada secuencia específica para el cromosoma diana:

$$Q = \frac{f_i \times m_b}{m_p}$$

Donde el número de copias marcadas es proporcional a m_p o ng de sonda, y el número de copias no marcadas es proporcional a f_i (fracción de ADN genómico contenido en el cromosoma i) x m_b (ng de ADN competidor).

TABLA 3.3: Relación del contenido de ADN de cada cromosoma respecto del contenido total de un núcleo

Nº DE CROMOSOMA	Contenido ADN (% autosoma total)	$\frac{\text{Cont ADN} \times 2}{100 f_i}$
1	4,32	0,086
2	4,22	0,084
3	3,49	0,069
4	3,34	0,066
5	3,20	0,064
6	3,02	0,060
7	2,77	0,055
X	2,70	0,054
8	2,55	0,051
9	2,37	0,047
10	2,33	0,046
11	2,38	0,047
12	2,35	0,047
13	1,86	0,037
14	1,80	0,036
15	1,69	0,033
16	1,55	0,031
17	1,49	0,029
18	1,40	0,028
20	1,20	0,024
19	1,08	0,021
Y	0,92	0,018
22	0,86	0,017
21	0,82	0,016

Newton E. Morton. PNSA (USA) Vol. 88: 7474-7476 (Morton 1991).

3.5.2.- Hibridación *in situ* con sondas de ADN marcadas: *técnica de pintado cromosómico (painting) para complementos cromosómicos de pronúcleo masculino y para cabezas hinchadas, núcleos, de espermatozoides.*

Las muestras fijadas pueden ser muestras recién fijados o de muestras congeladas. En caso de ser muestras congeladas se dejarán a T^{amb} evitando que se condense el agua sobre la superficie de la muestra. Por otro lado y en ambos casos se procede al pretratamiento de las muestras o refijación del material antes de comenzar, para así evitar pérdidas de material por el proceso de hibridación (Pinkel et al. 1988)

Pretratamiento de las muestras o Refijación

Todos los pasos se hacen sin agitación, para evitar que el material se desprenda por la acción mecánica del medio.

1. Baño de 5 min a T^{amb} en PBS
2. Baño de 5 min a T^{amb} en PBS/50mM MgCl_2
3. Postfijación en 1% Formaldehído en PBS/50mM MgCl_2 durante 10 min
4. Baño de 5 min a T^{amb} en PBS
5. Deshidratación en serie de etanoles (70%, 90%, 100%), 5 min en cada uno y dejar secar al aire

NOTA: Los etanoles se reciclan, excepto el de 70%, se guardan sellados con parafilm y a la T a la que se necesitan.

3.5.2.1.- Hibridación *in situ* con sondas marcadas con moléculas no fluorescentes (Biotina / Digoxigenina) y detección indirecta

Hibridación

1. Se prepara la sonda necesaria, poniéndola durante al menos 30 minutos en un baño a 37°C .
2. Se añade un volumen de "mix-master" igual al volumen de sonda que se va a utilizar.
3. Sobre las muestras con el material diana, previamente refijadas, se aplica la cantidad adecuada de sonda (depende de la cantidad de material existente en cada muestra) y se cubre con un cubreobjetos.
4. Se sellan los portaobjetos con cola impacto de papel.
5. Desnaturalización de los "portaobjetos + sonda" durante 3 min en un horno a 90°C
6. Incubación de las muestras toda la noche a 37°C en el incubador dentro de una cámara húmeda
7. Se sacan los portas del incubador y se retira la goma con unas pinzas
8. Introducción de los portas en una cubeta con 2xSSC a T^{amb} para que se desprendan los cubreobjetos

9. Las muestras se lavan tres veces en 50% Formamida/2xSSC pH=7,0 a 44°C durante 5 min cada uno
10. Se realizan tres lavados más de 5 min cada uno en 0,1xSSC a 58°C
11. Se realiza un lavado rápido (1 min) en 4xSSC/0,2% Tween 20 a 44°C
12. Incubación de 15 min en un baño de 5% Leche en polvo/4xSSC-0.2% Tween20 a 44°C

Detección con marcaje indirecto

Se trabaja en condiciones de mínima luz y con anticuerpos específicos para la molécula incorporada en el marcaje de la sonda (A= Avidina para Biotina y B= Anti-Digoxigenina para Digoxigenina).

NOTA Los anticuerpos se preparan 10 min antes de sacar las muestras de la estufa. Se diluyen a la concentración a la que son necesarios según el tipo de anticuerpo a utilizar (ver Tabla 3.4.1 y 3.4.2, referente a 1^{er} y 3^{er} anticuerpo).

1. Sobre un cubreobjetos se ponen 15-20 μ l de anticuerpo por cada muestra. Se introducen las muestras en una caja húmeda y se incuban durante 30 min a 37°C.
 2. Se retiran los cubreobjetos mediante un golpe seco.
 3. Se lavan tres veces en 4xSSC/0,2% Tween 20 a 44°C durante 5 min cada uno
- NOTA: Los anticuerpos se preparan 10 min antes de sacar las muestras de la estufa. Para la amplificación que se requiera se diluyen a la concentración necesaria según el tipo (ver Tabla 3.4.1 y 3.4.2 referente al 2^{do} anticuerpo).
4. Se ponen 15-20 μ l de anticuerpo en un cubre pequeño para la amplificación. Se introducen los portas en una caja húmeda y se incuban a 37°C durante 30 min.
 5. Se quitan los cubreobjetos mediante un golpe seco.
 6. Se lavan tres veces en 4xSSC/0,2% Tween 20 a 44°C durante 5 min cada uno
 7. Se repiten los pasos 1, 2 y 3 de la detección
 8. Se deshidratan los portaobjetos en serie de etanoles (70%, 85%, 100%) pasándolos 1 min en cada uno y secándolos al aire

TABLA DE ANTICUERPOS PARA LA DETECCIÓN

TABLA 3.4.1 Tipos de anticuerpos para la detección

DIGOXIGENINA		BIOTINA		Tipo marcaje
Anti-digoxigenina-RODAMINA	Anti-digoxigenina (mouse)	Anti-biotina (mouse)	Avidina-FITC o Avidina-TRITC	1 ^{er} anticuerpo
	Anti-mouse (FITC o TRITC) rabbit		Anti-Avidina Biotin. (seep)	2 ^{do} anticuerpo
	Anti-rabbit (FITC o TRITC) goat		Avidina-FITC o Avidina-TRITC	3 ^{er} anticuerpo
RODAMINA = rojo, FITC = verde, TRITC = rojo				SEÑAL

TABLA 3.4.2 Factor de dilución de los anticuerpos usados

TIPO DE ANTICUERPO	Vol. aliquota	Factor dilución
Anti-digoxigenina-rodamina	1 ml	1:5
Anti-digoxigenina (mouse)	2 µl	1:250
Anti-mouse-TRITC (rabbit)	5 µl	1:100
Anti-rabbit-TRITC (goat)	5 µl	1:100
Anti-mouse-FITC (rabbit)	5 µl	1:100
Anti-rabbit-FITC (goat)	2 µl	1:100
Anti-biotina (mouse)	2 µl	1:250
Avidina-TRITC	5 µl	1:100
Avidina-FITC	1,25 µl	1:400
Antiavidina biotinizada	5 µl	1:100

Tinción

Se trabaja en condiciones de mínima luz, siendo el modo de aplicación el siguiente:

1. Aplicación de 10 μ l de la mezcla de tinción (ver Tabla 3.5).
2. Sellar con un cubreobjetos pequeño intentando que no queden burbujas y que la solución se distribuya homogéneamente por toda la muestra.
3. Observación de los portaobjetos mediante objetivo de inmersión de 100x aumentos y oculares de 10x aumentos en microscopio de Fluorescencia Olympus AX70 (Olympus Optical Co., Hamburg, Alemania) dotado de filtros adecuados para la visualización de los diferentes fluorocromos ya sea de forma conjunta (filtro de triple banda FITC/Pi/DAPI) como individualmente (filtros de banda única específicos para DAPI, FITC, TRITC y Aqua)
4. Las imágenes son capturadas mediante un sistema de procesamiento de imágenes (Cytovision Ultra, Applied Imaging Inc. Ltd.) acoplado al microscopio de fluorescencia o bien fotografiadas con película Kodak Ektachrome de 400 ASA.

TABLA 3.5 Tipos de tinción para las preparaciones

Tipo de tinción	[] Sol. madre μ g/ml	dilu A en 90% AF	[] dilu en uso ng/ μ l
DAPI	5000	50 ng/ μ l	0.125
Propidio Iodide	1000	20 ng/ μ l	0.8
DAPI + PI	0.125 ng/ μ l DAPI + 0.8 ng/ μ l PI		

(Af = Antifade marca VECTOR)

3.5.2.2.- Hibridación *in situ* fluorescente con sondas marcadas directamente con fluorocromo: técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (sondas comerciales VYSIS)

Se trabaja en condiciones de mínima luz a lo largo de todo el proceso, para evitar pérdida de intensidad de los fluorocromos. El proceso de hibridación aplicado será el mismo para todas las sondas comerciales VYSIS utilizadas, mientras que, el proceso de detección dependerá del tipo de sonda utilizada (sondas para pintado cromosómico: detección lenta; sondas locus específica, teloméricas y centroméricas: detección rápida; en casos de combinación de sondas prevalece la detección lenta). De modo más detallado el proceso que se sigue es el recomendado por la casa comercial con alguna modificación, y que se describe a continuación:

Hibridación

1. Se deja a T^{amb} la sonda que se va a usar
2. Una vez la sonda ha alcanzado la T^{amb} se prepara la mezcla de hibridación (por cada 10 μ l de mezcla, 7 μ l son de tampón proporcionado por la casa comercial y los 3 μ l restantes pueden ser 1 μ l de tres sondas diferentes o bien 2 μ l ó 1 μ l de una o dos sondas y el resto hasta 3 μ l de agua)
3. Sobre las muestras diana, previamente refijadas (ver apartado 3.5.2.), se aplica una cantidad de mezcla de hibridación adecuada para cubrir el área a hibridar (5-10 μ l por porta)
4. Se cubren las muestras con cubreobjetos y se sellan con cola impacto de papel.
5. Se desnaturaliza las "muestras + sonda" durante 3 min. en un horno a 90°C.
6. Se incuban los portas toda la noche a 37°C dentro de una cámara humedad.
7. Se sacan las muestras de la estufa y se retira la cola con unas pinzas.

Detección lenta

1. Se introducen las muestras en una cubeta con 2xSSC a T^{amb} para que caigan los cubreobjetos sin dañar las preparaciones.
2. Se realiza un lavado de posthibridación a 45°C y con agitación suave que consiste en:
 - a. Tres lavados de 10 min en 50% Formamida/2xSSC (pH 7).
 - b. Un lavado de 10 min en 2xSSC.
 - c. Un lavado de 10 min en 2xSSC/0.1% Tween 20.
3. Se lavan 5 min en 2xSSC/0.1% Tween 20 a T^{amb}
4. Se deshidratan las muestras en serie de etanoles (70%, 85%, 100%) pasándolos 1 min en cada uno y dejándolos secar al aire.
5. Tinción de las muestras (ver apartado tinción y Tabla 3.5).

Detección rápida

1. Se introducen las muestras en una cubeta con 0,4xSSC a 73°C para que caigan los cubres sin dañarlas, 1-2 segundos.
2. Lavar durante 2 minutos en la misma solución anterior (0,4xSSC a 73°C).
3. Lavar en 2xSSC/0,1% Tween 20 a T^{amb} .
4. Se deshidratan las muestras en serie de etanoles (70%, 85%, 100%) pasándolos 1 min en cada uno y dejándolos secar al aire.
5. Tinción de las muestras (ver apartado tinción y Tabla 3.5).

Nota: Las condiciones de astringencia (T de las soluciones, % de formamida), en las diferentes formas de detección, variaran según la intensidad obtenida para cada sonda

3.5.3.- Criterios de recuento para el análisis mediante FISH de cabezas hinchadas, núcleos, de espermatozoides

El análisis de las diferentes señales de hibridación obtenidas en los estudios realizados en cabezas hinchadas, núcleos, de espermatozoides, han seguido unos rigurosos criterios de recuento, los cuales se detallan a continuación:

1. Se analizarán, únicamente, células enteras, con los bordes bien definidos y sin superposiciones.
2. Se considerarán disomía (o diploidía) cuando las dos señales para un mismo cromosoma (o para todos los del complemento) tengan la misma medida e intensidad y se encuentren separadas como mínimo una distancia igual al diámetro de la señal.
3. La nulisomía para los cromosomas sexuales, se considerará cuando en el núcleo observado, la señal correspondiente al cromosoma autosómico utilizado como control (batería de sondas para cromosomas X, Y,18) sea de la misma medida e intensidad que la observada, para este mismo cromosoma, en los núcleos cercanos.
4. Todas las señales dudosas han sido reanalizadas por dos o más observadores.

- Estudio de aneuploidía en cabezas hinchadas, núcleos, de espermatozoides de individuos control

En caso de portadores de translocación la frecuencia de aneuploidía para cromosomas no implicados ha sido determinada mediante FISH en núcleos descondensados de espermatozoides. Para ello se han utilizado sondas centroméricas para los cromosomas X, Y, 6, 18 y locus específica para el cromosoma 21 (Tabla 3.2).

Los controles usados son nueve individuos, para el estudio con las sondas de los cromosomas 6 y 21, de los cuales se han analizado un total de 28.044 espermatozoides y cinco individuos de los que se analizaron un total de 50.572 espermatozoides con las sondas para los cromosomas X, Y y 18 (Blanco et al. 1996 y 1997).

3.6.- ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico de este trabajo, se ha realizado con el programa estadístico SPSS v20 (Statistic Package for Social Sciences, SPSS Inc; Chicago, IL (USA). Así se han utilizado diferentes tests en función de las características de cada estudio. Para comparaciones entre diferentes grupos independientes de datos, se han utilizado pruebas no paramétricas para muestras independientes, como la U de Mann-Whitney. Para estudios comparando grupos dependientes de muestras, se han utilizado tanto el test χ^2 con corrección de Yates para comprobación de hipótesis como de correlación de Pearson y Test de Fisher con aproximación de Katz

3.7.- SOLUCIONES Y MEDIOS

Para las muestras de semen

MEDIO CRIOPRESERVADOR

Se desinfectan previamente 3 huevos en un recipiente con agua destilada y desinfectante.

Para 100 ml de medio:

Yema de huevo.....	30 ml
Glicerol.....	14 ml (al 7%)
H ₂ O estéril.....	56 ml
Glucosa.....	1,98 g
Citrato sódico.....	1,72 g

- 1- Se Homogeneiza e inactiva a 56⁰C durante 27-30 min.
- 2- Se deja enfriar y una vez frío se añaden 2 g de glicocola
- 3- Se ajusta el pH a 7,2-7,4. No se añaden antibióticos.
- 4- Se alícuota y conservan a -20⁰C (Hasta 3 meses)

Toda la preparación en condiciones de esterilidad

SOLUCIÓN DTT 10 Mm

Dithiotritol (DTT).....	0,07715 gr
Trizma base.....	0,60550 gr
Triton X-100.....	0,5 ml
H ₂ O hasta.....	50 ml

Para la técnica hámster-humano

STOCK A

*NaCl.....	2,770 g	
KCl.....	0,178 g	
KH ₂ PO ₄	0,081 g	
MgSO ₄ .7 H ₂ O.....	0,147 g	
Glucosa.....	0,500 g	
Lactato de Sodio (sol 60%).....	1,850 ml	50 ml
**Penicilina/estreptomicina.....	0,500 ml	
H ₂ O tridestilada.....	47,65 ml	

* La Albúmina sérica humana (HSA) líquida al 20% que se utiliza para suplementar el medio BWB contiene también NaCl por tanto:

Stock A para BWB ₃ : NaCl.....	2,7025 g
Stock A para BWB ₃₃ : NaCl.....	2,0280 g

** Alícuotas de 1 ml conservadas a -20°C :

Estreptomina. 50 mg/ml

Penicilina..... 100.000 UI/ml Resuspendidas en agua

Conservación a 4°C , hasta 3 meses.

STOCK B

NaHCO ₃	0,4212 g
*Rojo fenol (sol. B).....	0,5000 ml
H ₂ O Tridestilada	19,500 ml
Total.....	20,000 ml

* Solución madre A de rojo fenol 0,5% en H₂O Tridestilada

Solución B de rojo fenol 0,05%:

10 ml sol B= 1 ml sol A + 9 ml H₂O

Conservar a 4°C hasta dos semanas.

STOCK C

Piruvato sódico.....	0,018 g
H ₂ O Tridestilada hasta	5 ml

Conservar a 4°C hasta 2 semanas

STOCK D

CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,126 g
H ₂ O Tridestilada hasta	5 ml

Conservar a 4°C hasta 3 meses.

STOCK E

*HEPES ácido 2 M.....	5 ml
**HEPES básico 2 M.....	5 ml
Rojo fenol (sol B).....	0,25 ml
H ₂ O Tridestilada hasta	50,0 ml

* HEPES ácido 2 M: 23,83 g HEPES + H₂O tridestilada hasta 50 ml

** HEPES básico 2 M:

- Preparar una solución 3 M de NaOH: 6 g NaOH + 50 ml H₂O tridestilada

- Preparar la solución 2 M de HEPES básico: 23,83 g HEPES + NaOH 3 M hasta 50ml

Conservar a 4°C hasta 3 meses.

STOCK ENZIMAS

► Hialuronidasa:

Se mantiene un stock de solución madre a una concentración de 10 mg/ml en alícuotas de 300 μl

► Tripsina

Se mantiene un stock de solución madre a una concentración de 10 mg/ml en alícuotas de 300 μ l

STOCK VIMBLASTINA

Se mantiene un stock de solución madre a una concentración de 2 μ g/ml en alícuotas de 150 μ l

COMPOSICION DE LOS MEDIOS BWW

Se preparan con los "stocks" de las soluciones salinas anteriores (A+B+C+D+E). Cada *stock* supone la misma proporción en los medios BWW₃ y BWW₃₃. Pero hay, sin embargo, un *stock* A específico para cada uno: A₃ y A₃₃, que se diferencian en la cantidad de NaCl. La cantidad de H₂O tridestilada que se añade variará en función de la cantidad de HSA (albúmina sérica humana) con la que se complementa, y que es líquida y concentrada al 20%.

El medio base sin suplementar se filtra con filtro Millex® con membrana Durapore (PVDF) de 0,22 μ (Millipore Corporation, Bedford MA) y se mantiene a 4°C. La albúmina se añade 24 h antes de la utilización del medio completo. El medio suplementado así se mantiene en el incubador.

El medio BWW se utiliza para:

- * Procesamiento del semen
- * Capacitación de espermatozoides
- * Preparación de ovocitos
- * Coincubación de gametos

Medio BWW ₃			Medio BWW ₃₃		
STOCKS	1 EXP.	2 EXP	STOCKS	1 EXP	2 EXP
A ₃	5 ml	10 ml	A ₃₃	1 ml	2 ml
B	5 ml	10 ml	B	1 ml	2 ml
C	0,5 ml	1 ml	C	0,1 ml	0,2 ml
D	0,5 ml	1 ml	D	0,1 ml	0,2 ml
E	5 ml	10 ml	E	1 ml	2 ml
ALBUMINA	0,75 ml	1.5 ml	ALBUMINA	1,65 ml	3,3 ml
H ₂ O Trid.	33,25 ml	66,5 ml	H ₂ O Trid.	5,15 ml	10,3 ml
Vol _f	50 ml	100 ml	Vol _f	10 ml	20 ml

COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS F-10

Medio base *Nutritive mixture F-10 with glutamine* (GIBCO)

Se utiliza para el cultivo de ovocitos inseminados.

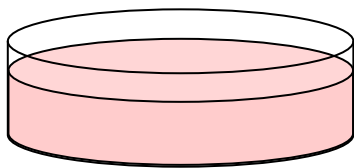
Medio F-10 completo STOCK	1 EXP.	2 EXP.	3 EXP.
F-10 base	6,375 ml	12,750 ml	19,125 ml
FCS	1,125 ml	2,250 ml	3,375 ml
L-GLUTAMIN200 mM	0,037 ml	0,074 ml	0,111 ml
Peni/Strepto	0,038 ml	0,076 ml	0,114 ml
Vol_f	7,575 ml	15,150 ml	22,725 ml

Medio F-10 ATUR (0,1 µg/ml de Vimblastina): 2,375 ml F-10 Completo + 0,125 ml stock Vimblastina = 2,5 ml vol_f

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS

Las placas se cubren con parafina líquida antes de que las gotas de medio se junten o bien lleguen a la pared de la placa.

1- OBT: obtención placa para la disección de los oviductos y obtención de los *cumulus*. Dos placas pequeñas con 2 ml de medio BWW₃



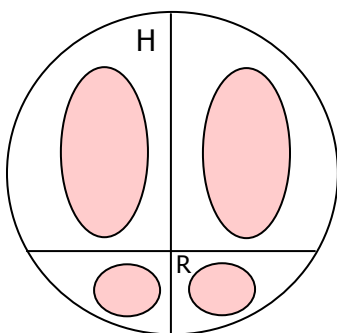
2- H: Hialuronidasa (digestión enzimática de los tejidos del oviducto).

R: lavados

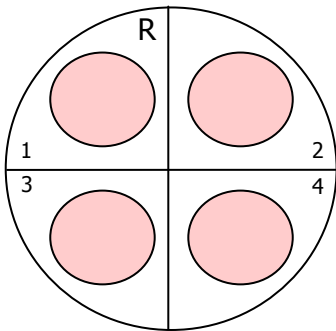
2 placas grandes con:

2 gotas/placa de 450 µl de BWW₃/gota + 70 µl stock Hialu/gota (concentración final en gota 0.1%)

2 gotas/placa de 200 µl de BWW₃/gota = gotas de lavado



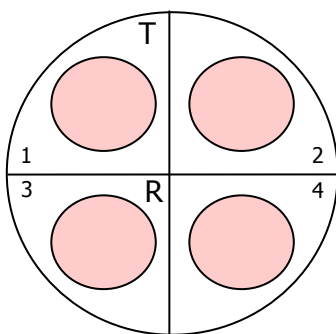
3- R: Lavados.



2 placas grandes con:
4 gotas/placa de 200 μ l de BWW₃/gota

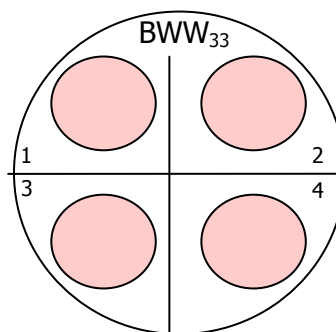
4- T: Tripsina. Digestión enzimática de la zona pelucida del ovocito permitiendo la penetración

R: Lavado de los ovocitos de restos de tripsina



2 placas grandes con:
2 gotas/placa de 180 μ l BWW₃/gota + 30 μ l stock Tripsina/gota
(concentración final 0,1 % en gota)
2 gotas/placa de 200 μ l BWW₃/gota

5- BWW₃₃: Lavado previo antes de la inseminación

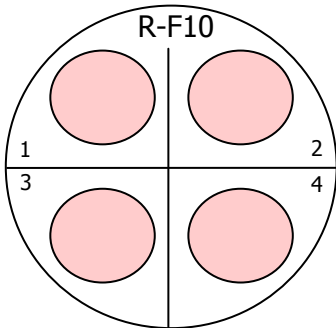


2 placas grandes con:
4 gotas/placa de 200 μ l de BWW₃₃/gota

PLACAS CON MEDIO F-10

Para la coincubación de gametos y cultivo de heterocigotos.

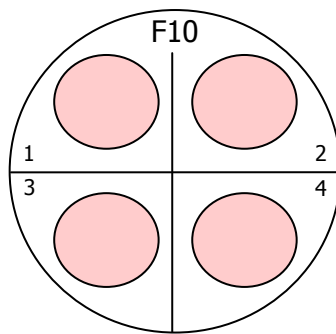
1- R-F-10: lavados en medio F-10 completo



2 placas grandes con:

4 gotas/placa de 200 μ l de F-10 completo/gota

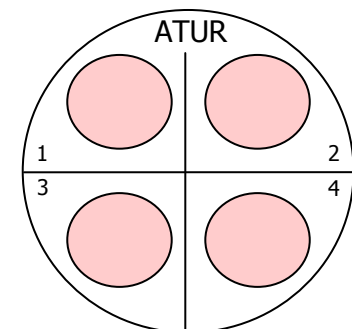
2- F-10 Coincubación de gametos durante 12 horas. Obtención de heterocigotos en medio F-10 completo.



2 placas grandes con:

4 gotas/placa de 200 μ l de F-10 completo

3- F-10 ATUR: con adición de vimblastina se para la división nuclear en la I-metáfase embrionaria.



2 placas grandes con:

4 gotas/placa de 200 μ l de medio F-10 ATUR/gota

Para la extracción del ADN

- TAMPÓN DE DIGESTIÓN:

100 mM NaCl.....	12,5 ml NaCl 0,1 M
10 mM Tris HCl pH 8.....	50 ml Tris HCl 0,1 M
25 mM EDTA pH 8.....	125 ml EDTA 0,1 M
0,5 % SDS.....	62,5 ml SDS 4%

Para la amplificación de genotecas clonadas en virus

- MEDIO LB

NaCl.....	2,5 gr	
Tryptone.....	5,0 gr	
<i>Yeast Extract</i>	2,5 gr	
H ₂ O hasta.....	500 ml	Autoclavar

Para complementar el medio añadiremos en medio autoclavado las siguientes soluciones estériles:

1 M CaCl ₂	2,5 ml
50% Maltosa.....	2,5 ml
1 M MgSO ₄	7,0 ml

- LB TOP AGAR..... 100 ml de medio completo + 0,7 gr agar
- LB PLACAS (14 placas aprox.).....300 ml de medio + 4,5 gr agar

Para electroforesis en geles de agarosa

- 50xTAE

Tris base.....	242 g
Ácido acético.....	57,1 ml
EDTA 0,5 M.....	100 ml
H ₂ O hasta.....	1000 ml

pH= 8.0

- PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ELECTROFORESIS:

- 1/5 volumen de tinte de electroforesis
- 4/5 volumen de muestra o bien de muestra + agua

- PREPARACIÓN DEL TINTE DE ELECTROFORESIS:

- 0,25 % Bromofenol blue

30 % Glicerol en agua

- TAMPÓN DE ELECTROFORESIS:
1/50 volúmenes de 50xTAE
49/50 volúmenes de agua

- GEL DE AGAROSA:

Depende del porcentaje de agarosa a la que necesitemos el gel, fragmentos lineares de DNA de diferente tamaño migran a diferente velocidad a través de geles de diferentes concentraciones. Se establece una relación lineal entre el logaritmo de la movilidad electroforética del DNA (μ) y la concentración del gel (γ) como se describe en la ecuación:

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r \gamma$$

μ_0 = libre movilidad electroforética del DNA

K_r = coeficiente de retraso

La agarosa se disolverá en tampón 1xTAE y por calor, cuando ya no quema y antes de que gelifique, se le añade un volumen de Bromuro de etidio suficiente para la posterior observación de las muestras en un transiluminador de UV. El Bromuro de etidio es un agente intercalante y emite luz visible cuando se irradia con luz UV (floroforo).

• CARACTERÍSTICAS DEL PATRÓN DE ELECTROFORESIS:

ξ BstEII pb	% sobre la cantidad	ng en 5 μ l	Nº de banda
>14 Kb	suma 1+4	--	0
8454	17,4	35	1
7242	14,9	30	2
6369	13,1	26	3
5686	11,7	23	4
4822	9,9	20	5
4324	8,9	18	6
3675	7,6	15	7
2329	4,8	9,6	8
1939	4,0	8	9
1371	2,8	5,6	10
1264	2,6	5	11
702	1,4	3	12
224	<0,5	1	13
117	0,2	0,4	14

[ξ Bst EII] = 200 ng/5 μ l:

4 μ l de ξ

10 μ l Tinte

36 μ l agua

50 μ l

Para el marcaje de la sonda

● STOP MIX:

0,1% Bromofenol Blue.....	10 mg	
0,5% Azul Dextran	50 mg	
0,1% NaCl.....	200 µl. (5M NaCl)	
20 mM EDTA.....	400 µl. (0,5 M EDTA)	
20 mM Tris Cl (pH=7,5).....	75 µl. (1 M Tris Cl)	
	Hasta 10 ml de agua tridestilada	

Para la detección del marcaje de la sonda

● TAMPÓN 1:

0,1 M Tris.....	12,11 g	6,05 g	
0,1 M NaCl.....	5,40 g	2,70 g	
H ₂ O hasta.....	1000 ml	500 ml	pH= 7,5

● TAMPÓN 2

Se prepara el día antes. 3% BSA en TAMPÓN 1:

3 g BSA	en	100 ml	Tampón 1
1,5 g "	en	50 ml	"
0,75 g "	en	25 ml	"

● TAMPÓN 3

0,1 M Tris.....	12,11 g	1,21 g	
0,1 M NaCl.....	5,40 g	0,54 g	
50 mM MgCl ₂	10,16 g	1,01 g	
H ₂ O hasta.....	1000 ml	100 ml	pH=9,5

● STOP BUFFER

10,0 ml Tris 1 M	$\left\{ \begin{array}{l} 20,0 \text{ mM Tris} \\ 75,5 \text{ mM EDTA} \\ \text{H}_2\text{O hasta} \end{array} \right\}$	2,422 g
75,5 ml EDTA 0,5 M		28,33 g
414,5 ml H ₂ O		1000 ml

● SOLUCIONES DE COLORACIÓN:

Para Biotina	13,2 µl NBT
	3,0 ml Tampón 3 (se mezcla)
	10,0 µl BCIP
Para Digoxigenina	13,5 µl NBT
	3,0 ml Tampón 3 (se mezcla)
	10,5 µl X-Fosfato

Para la hibridación

- TE

Para 500 ml:

0,7878 g Tris Cl
0,1861 g EDTA
500 ml H₂O Tridestilada

- PBS

137 mM NaCl..... 8.0 g
14 mM Na₂HPO₄ 2,508 g
2,68 mM KCl..... 0,2 g
1,1 mM KH₂PO₄ 0,150 g
H₂O hasta 1000 ml

- 1 M MgCl₂

20,33 g en 100 ml H₂O

- PBS / 50 mM MgCl₂ (100 ml)

1 M MgCl₂..... 5 ml
PBS..... 95 ml

- PBS / 50 mM MgCl₂ / 1 % Formaldehído

PBS / 50 mM MgCl₂..... 48,5 ml
Formaldehído..... 1,5 ml

- 20xSSC

3 M NaCl 175,32 g 87,66 g
0,3 M Citrato sodico..... 88,22 g 44,11 g
H₂O Tridestilada hasta..... 1000 ml 500 ml

4xSSC..... 200 ml 20xSSC + 800 ml H₂O

2xSSC..... 100 ml 20xSSC + 900 ml H₂O

1xSSC..... 250 ml 2xSSC + 250 ml H₂O

0,4xSSC..... 50 ml 4xSSC + 450 ml H₂O

0,1xSSC..... 50 ml 1xSSC + 450 ml H₂O

- SEPADEX G25 HIDRATADO CON TE

Se mezclan 30 g de Sephadex G25 con 250 ml de TE, se deja que repose dentro de una botella durante toda la noche. Al día siguiente se retira el sobrenadante por medio de una pipeta Pasteur estéril y se añaden 250 ml de TE (suspensión que se usará para preparar las columnas).

- MIX-MASTER

20% Dextran sulfato:

2 g Dextran sulfato

1 ml 20xSSC

9 ml H₂O

Se disuelve a 70°C en agitación durante 1h. Alícuotas de 1ml, guardar a -20°C

- AVIDINA BIOTINILADA

0,5 mg Avidina Biotinilada

1,0 ml H₂O Tridestilada

Alícuotas de 50 µl, guardar a -20°C. Alícuota de trabajo en nevera, máximo 1 mes

- DAPI

5 mg DAPI

1 ml H₂O Tridestilada

Alícuotar y guardar a -20°

Concentración de trabajo 0,015 ng/µl

- PROPIDIUM IODIDE

1 mg Propidium Iodide

1 ml H₂O Tridestilada

Alícuotas grandes y pequeñas. Se guardan a -20°C

- 4xSSC/0,2% TWEEN 20

1 l 4xSSC

2 ml Tween 20

Botellas de 500 ml

- 5% BSA en 4xSSC

En un tubo cónico se pone BSA (Albúmina Sérica Bovina) hasta la marca de 0,5 ml y se añade 4xSSC hasta la marca de 10 ml, se diluye agitando con el vortex.

- 50% FORMAMIDA/1xSSC

Formamida.....	500 ml.....	150 ml.....	100 ml
----------------	-------------	-------------	--------

H ₂ O TriDest.....	450 ml.....	135 ml.....	90 ml
-------------------------------	-------------	-------------	-------

20xSSC.....	50 ml.....	15 ml.....	10 ml
-------------	------------	------------	-------

Total	1000 ml.....	300 ml.....	200 ml
-------------	--------------	-------------	--------

pH= 7,0

- 70% FORMAMIDA/2xSSC

Formamida.....	350 ml.....	70 ml
----------------	-------------	-------

20xSSC.....	50 ml.....	10 ml
-------------	------------	-------

H ₂ O TriDest.....	100 ml.....	20 ml
-------------------------------	-------------	-------

Total.....	500 ml.....	100 ml
------------	-------------	--------

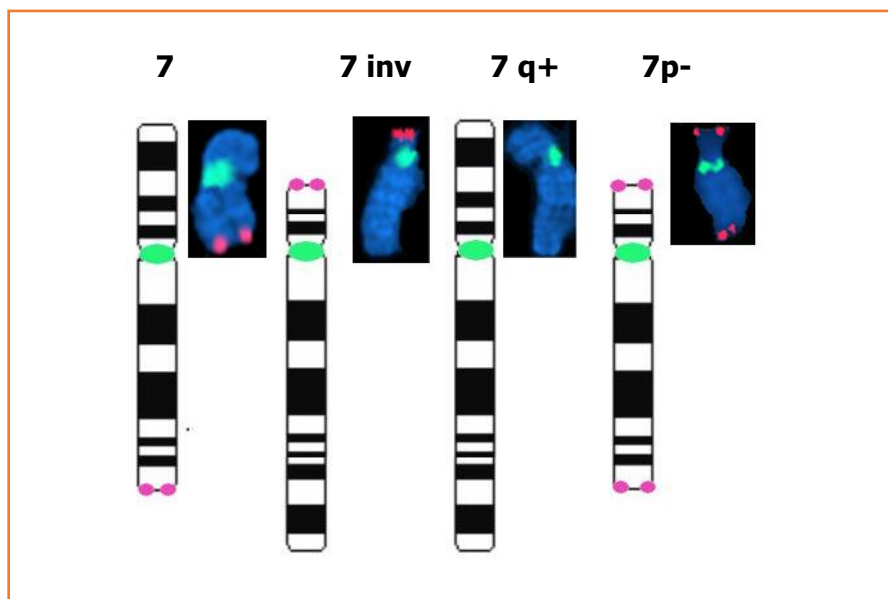
4.- RESULTADOS

4.1.- SUJETO 1, individuo portador equilibrado de la inversión pericéntrica inv(7)(p13;q36)

4.1.1.- Estudio de la segregación meiótica

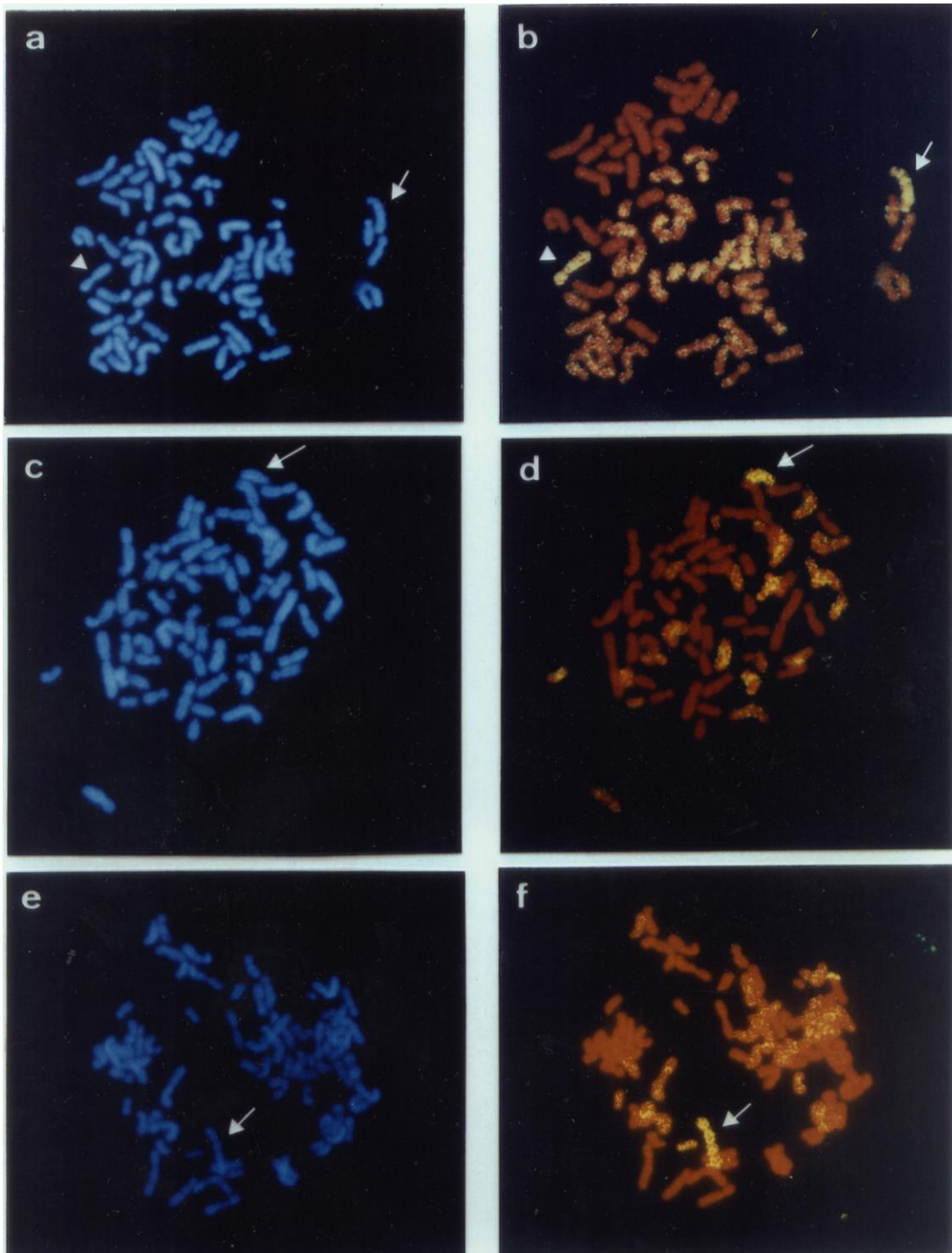
Se ha analizado, con éxito, la segregación meiótica en caso de un varón portador equilibrado, heterocigoto, de la inversión inv(7)(p13;q36), previamente estudiada mediante bandas-G. Este análisis se ha realizado sobre complementos cromosómicos de pronúcleo masculino de cigotos heterólogos, aplicando el pintado cromosómico (WCP), i también aplicando sondas centroméricas y teloméricas que flanquean el punto de rotura, de modo que se puedan identificar los diferentes productos de segregación (Fig 4.1) Este análisis con sondas centroméricas y teloméricas también se ha realizado sobre cabezas hinchadas, núcleos, de espermatozoide.

Figura 4.1 Ideograma para los cromosomas 7 i inv7 (no recombinantes) i para los cromosomas recombinantes (7q+ i 7p-) derivados de la reorganización cromosómica inv(7) con el correspondiente cromosoma tras aplicar la FISH para CEN7 i Tel7qTer que posibilita, de forma inequívoca, su caracterización haciendo posible el estudio de la segregación meiótica.



Los resultados obtenidos en un total de 114 complementos analizados mediante WCP, muestran que 92 (80,7%) de los complementos no tienen cromosomas recombinantes (51 (44,74%) son portadores de un cromosoma 7 normal y 41 (35,96%) son portadores del cromosoma 7 invertido) (Fig. 4.2); y 22 (19,3%) complementos si tienen cromosomas recombinantes (10 (8,77%) poseían el cromosoma recombinante rec(7)dup(p)del(q) y 12 (10,53%) eran portadores del cromosoma recombinante rec(7)dup(q)del(p)) (Fig 4.2)(Tabla 4.1)

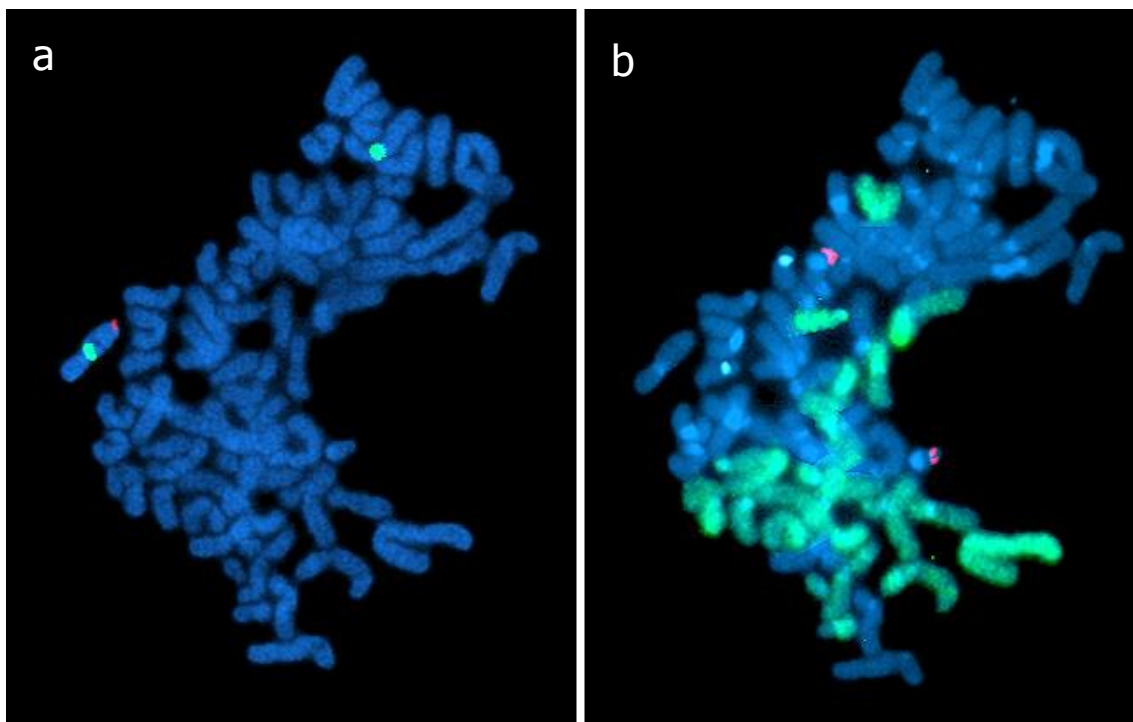
Figura 4.2 Pintado cromosómico del cromosoma 7 humano, realizado en complementos de pronúcleo masculino obtenidos por fecundación heteróloga hámster-humano. a), c), e) Tinción DAPI de los cromosomas humanos y de hámster. b) Dos complementos humanos mostrando un cromosoma 7 normal (cabeza de flecha) y un cromosoma 7 invertido (flecha). d) y f) Las flechas indican las formas recombinantes $rec(7)dup(q)del(p)$ y $rec(7)dup(p)del(q)$ respectivamente. En b), d) y f) los cromosomas de hámster se pueden distinguir de los humanos gracias al marcado fluorescente generalizado de los cromosomas del pronúcleo femenino.



Además se han estudiado 126 complementos cromosómicos de pronúcleo masculino de cigoto heterólogo/ha-hu aplicando sondas centroméricas y teloméricas mencionadas. Un total de 107(84,9%) no contienen cromosomas recombinantes (50 (39,7%) son portadores de un cromosoma 7 normal y 57 (45,2%) son portadores del cromosoma 7 invertido (Fig. 4.2 b)) y 19 (15,0%) si contenían cromosomas recombinantes (10 (7,9%) poseían el cromosoma recombinante $\text{rec}(7)\text{dup}(p)\text{del}(q)$ y 9 (7,1%) eran portadores del cromosoma recombinante $\text{rec}(7)\text{dup}(q)\text{del}(p)$) (Fig 4.2 d) y f) respectivamente) (Tabla 4.1). Se ha establecido con éxito la relación entre cromosomas sexuales X e Y aplicando sobre 107 de los complementos cromosómicos de cigotos heterólogos ha-hu anteriores, evidenciando una proporción no diferente de la relación 1:1 esperada.

Además la sonda genómica de hámster es muy eficaz diferenciando el complemento humano del complemento de hámster especialmente en extensiones poco extendidas (Fig 4.3)

Figura 4.3 Imagen secuencial del doble tratamiento efectuado sobre complementos cromosómicos obtenidos tras la fusión de gametos hámster- humano. a) Hibridación *in situ* fluorescente con sonda centromérica del cromosoma 7 (verde) y telomérica 7q (roja). b) Hibridación *in situ* fluorescente con sondas centroméricas para los cromosomas Y (rojo) 18 (azul) y sonda genómica de hámster (verde)



Como se ha dicho también se ha realizado análisis de la segregación meiótica utilizando la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) con sondas centroméricas y teloméricas sobre cabezas hinchadas, núcleos, de espermatozoide. La FISH con sondas CEN 7 y TEL 7q ter del cromosoma 7 además de incluir un sonda centromérica del cromosoma 18, a modo de control de la FISH. Del total de 5.782 espermatozoides analizados, 5.181 (89,6%) son portadoras de un cromosoma 7 normal o invertido, (no recombinante) mientras que 601 (10,4%) son portadores de una de las formas recombinantes (279 (4,8%) portadores de la forma rec(7)dup(q)del(p) y 322 (5,6%) portadores de la forma rec(7)dup(p)del(q)) Fig 4.4 (Tabla 4.1)

Figura 4.4 Patrón de hibridación en el análisis de las cabezas hinchadas, núcleos, de espermatozoides

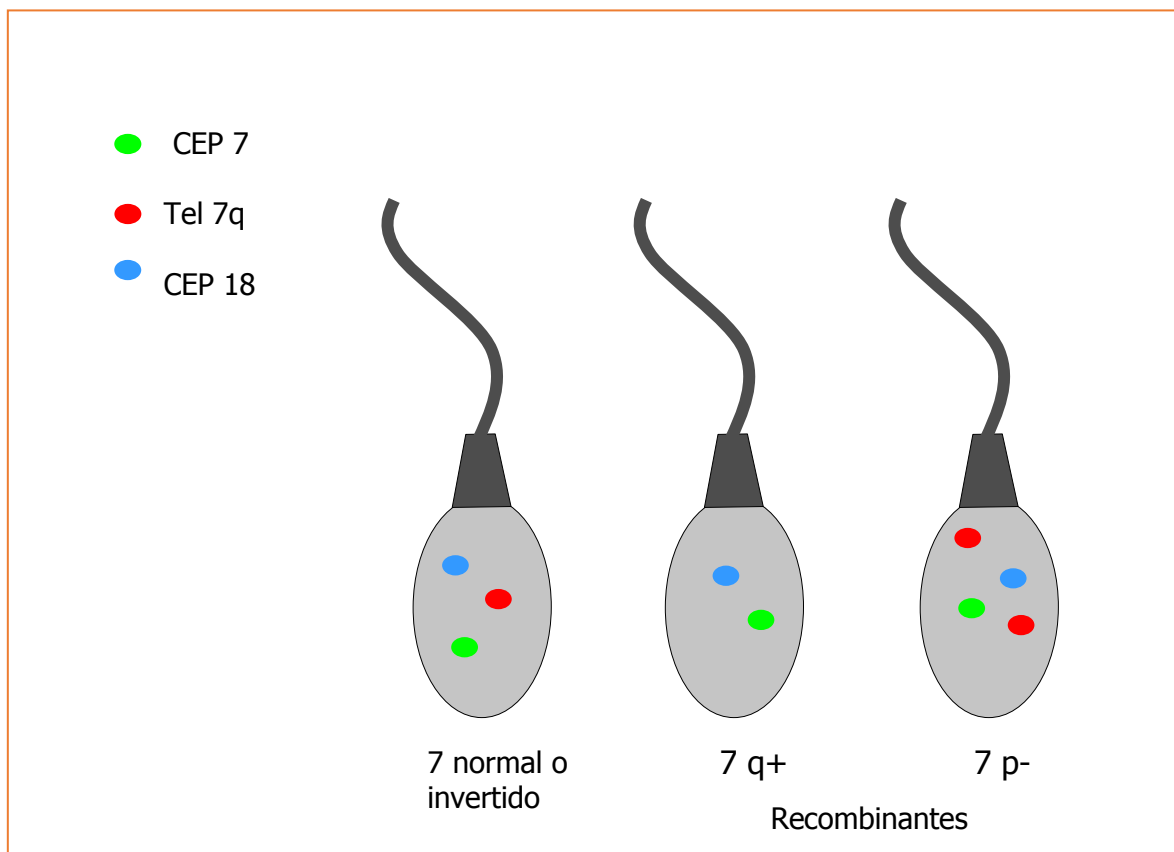


Tabla 4.1. Segregación meiótica de un individuo heterocigoto, inv(7)(p13;q36)

Tipo de análisis	WCP cromosomas		FISH cen/tel cromosomas		FISH cen/tel Núcleos	
	No.	(%)	No	(%)	No.	(%)
No recombinante:						
Cromosoma 7	51	(44,7)	50	(39,7)	-	-
Inv(7)	41	(36,0)	57	(45,2)	-	-
Subtotal	92	(80,7)	10	(84,9)	5.181	(88,9)
Recombinante:						
rec(7)dup(p)del(q)	10	(8,8)	10	(7,9)	322	(5,6)
rec(7)dup(q)del(p)	12	(10,5)	9	(7,1)	279	(4,8)
Subtotal	22	(19,3)	19	(15,0)	601	(10,4)
Total	114	(100)	12	(100)	5.782	(100)

4.2.- SUJETO 2, individuo portador equilibrado de la reorganización cromosómica compleja (CCR) t(2;11;22)(q13;q23;q11.2)

Los resultados obtenidos en este apartado han sido publicados (Cifuentes et al. 1998), ver en anexo.

4.2.1.- Estudio de la segregación meiótica

Se ha analizado la segregación meiótica, con éxito, en un total de 208 complementos cromosómicos de pronúcleo masculino de cigoto heterólogo/ha-hu de un individuo portador de una reorganización cromosómica compleja aplicando sondas de pintado cromosómico marcadas con tres fluorocromos distintos: el 2 en amarillo, el 11 en rojo y el 22 en verde. Se han identificado un total de 32 tipos de segregación 3:3 (que incluyen complementos normales, equilibrados y desequilibrados), 21 tipos de segregación 4:2 (diez con dos cromosomas, nueve con cuatro cromosomas y dos con cinco cromosomas resultante de una segregación 4:2 más la no disyunción en la segunda división meiótica del cromosoma 2 normal en uno de los casos y del cromosoma 22/2 en el otro caso) y dos tipos de segregación 5:1 (uno con un solo cromosoma y otro con seis cromosomas resultante de la segregación 5:1 más la no disyunción en la segunda división meiótica del cromosoma trasloado 11/22) (Tabla 4.2)

La frecuencia de espermatozoides portadores de complementos normales o equilibrados es de 13,5% (9,62% y 3,85% respectivamente). La frecuencia de espermatozoides desequilibrados es de 86,5% (64,9% de segregación 3:3; 20,7% de segregación 4:2, y 0,96% de segregación 5:1) (Tabla 4.3) (Fig. 4.5: a-f). La relación de los cromosomas sexuales fue determinada en 134 complementos cromosómicos de espermatozoides y no es diferente de la relación 1:1 esperada.

Tabla 4.2 Diferentes tipos de segregación observados:

<u>Segregación 3:3</u>		
2, 11, 22	2, 2/11, 11	11, 22, 22 *
2/11, 11/22, 22/2	11/22, 22, 22/2	11, 22/2, 22/2*
2, 2/11, 22/2	2, 2/11, 22	2/11, 11, 11*
2, 11/22, 22	11, 11/22, 22/2	2, 2, 22 *
2/11, 11, 22/2	2, 11/22, 22/2	2/11, 22, 22*
2, 11, 11/22	2/11, 11, 22	11/22, 22, 22*
2/11, 22, 22/2	11, 22, 22/2	2, 22/2, 22/2 *
2, 2/11, 11/ 22	11, 11/22, 22	2/11, 2/11, 11/22*
2, 22, 22/2	2, 11, 22/2	2, 2, 22/2*
2/11, 11, 11/22	2/11, 11/22, 22	11/22, 11/22, 22/2*
2/11, 2/11, 22*	2/11, 11/22, 11/22*	
<u>Segregación 4:2</u>		
2, 2/11	2, 11/22, 22, 22/2	2/11, 11, 22, 22/2
2, 11	2/11, 11/22, 22, 22/2	2, 22/2
11/22, 22	2, 11/22	2, 2/11, 11, 22
2, 11, 22, 22/2	2, 2/11, 11, 22/2	11, 22
2/11, 22	2, 11, 11/22, 22/2	2, 2/11, 11/22, 22/2
2, 2/11, 11/22, 22	2/11, 22/2	2/11, 11/22
2, 2, 2/11, 11, 22/2*	2/11, 11, 22, 22/2, 22/2*	
<u>Segregación 5:1</u>		
2, 2/11, 11, 11/22, 11/22, 22*		
11/22		

Abreviaciones

2/11 = der(2)t(2;11)(q13,q23)

11/22= der(11)t(11;22)(q23,q11.2)

22/2 = der(22)t(2;22)(q13;q11.2)

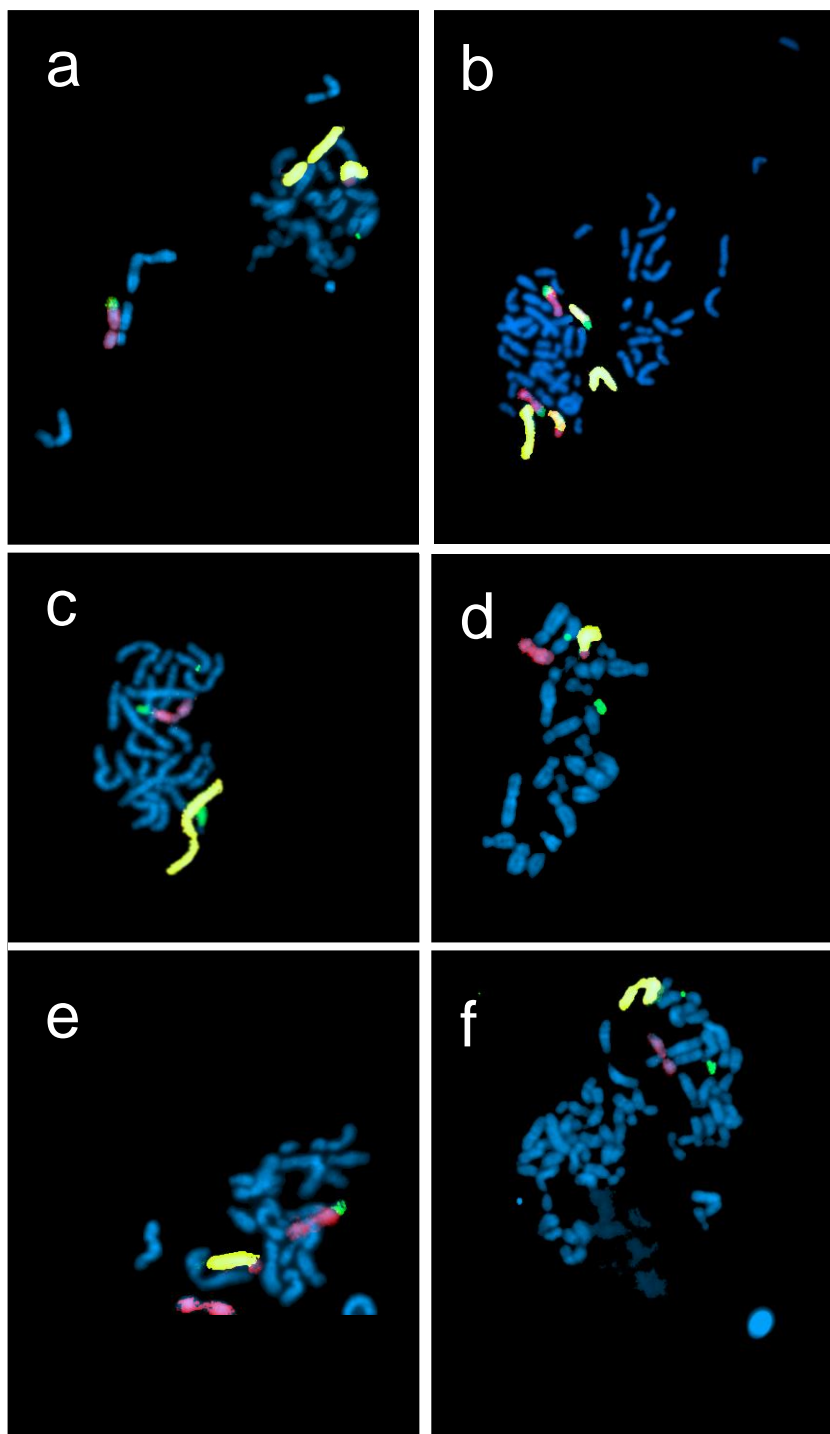
* = complementos disómicos

Tabla 4.3 Segregación meiótica de cromosomas de pronúcleo masculino de cigotos heterólogos/ha-hu de una translocación triple

Portador	Segregación	Tipo	Numero	Porcentaje	
t(2;22;11)(q13;q11.2;q23)	Alternante	normal	20	9,62 %	
		equilibrado	8	3,85 %	
	Subtotal: equilibrado			28	13,5 %
	Adyacente*	3:3	4:2	135	64,9 %
			5:1	43	20,7 %
			6:0	2	0,96 %
			-	-	-
	Subtotal: desequilibrado			180	86,5 %
	Total			208	100 %

*diferentes combinaciones de segregación adyacente I y adyacente II

Figura 4.5 Complementos cromosómicos de pronúcleo masculino de cigoto heterólogo /ha-hu con diferentes productos de segregación. Pintado cromosómico mediante FISH del cromosoma 2 (amarillo), 11 (rojo) y 22 (verde). El centrómero del cromosoma X puede verse (verde) si está presente. Complementos cromosómicos que contienen: a) Cromosoma 2, der(2), der(11) y X. b) Dos complementos cromosómicos, uno con cromosomas 2, der(11) y der(22), y el otro con los cromosomas 2, der(2) y der(11). c) Cromosoma 2, der(11), 22 y X. d) Cromosoma der(2), 11, 22 y X. e) Cromosoma der(2), 11 y der(11). f) Cromosoma 2, 11, 22 y X.



4.3.- SUJETO 3, individuo portador equilibrado de la translocación recíproca t(5;7)(q21;q31)

Los resultados obtenidos en este apartado han sido publicados (Cifuentes, Navarro, Blanco, et al. 1999) ver anexo

4.3.1.- Estudio de la segregación meiótica

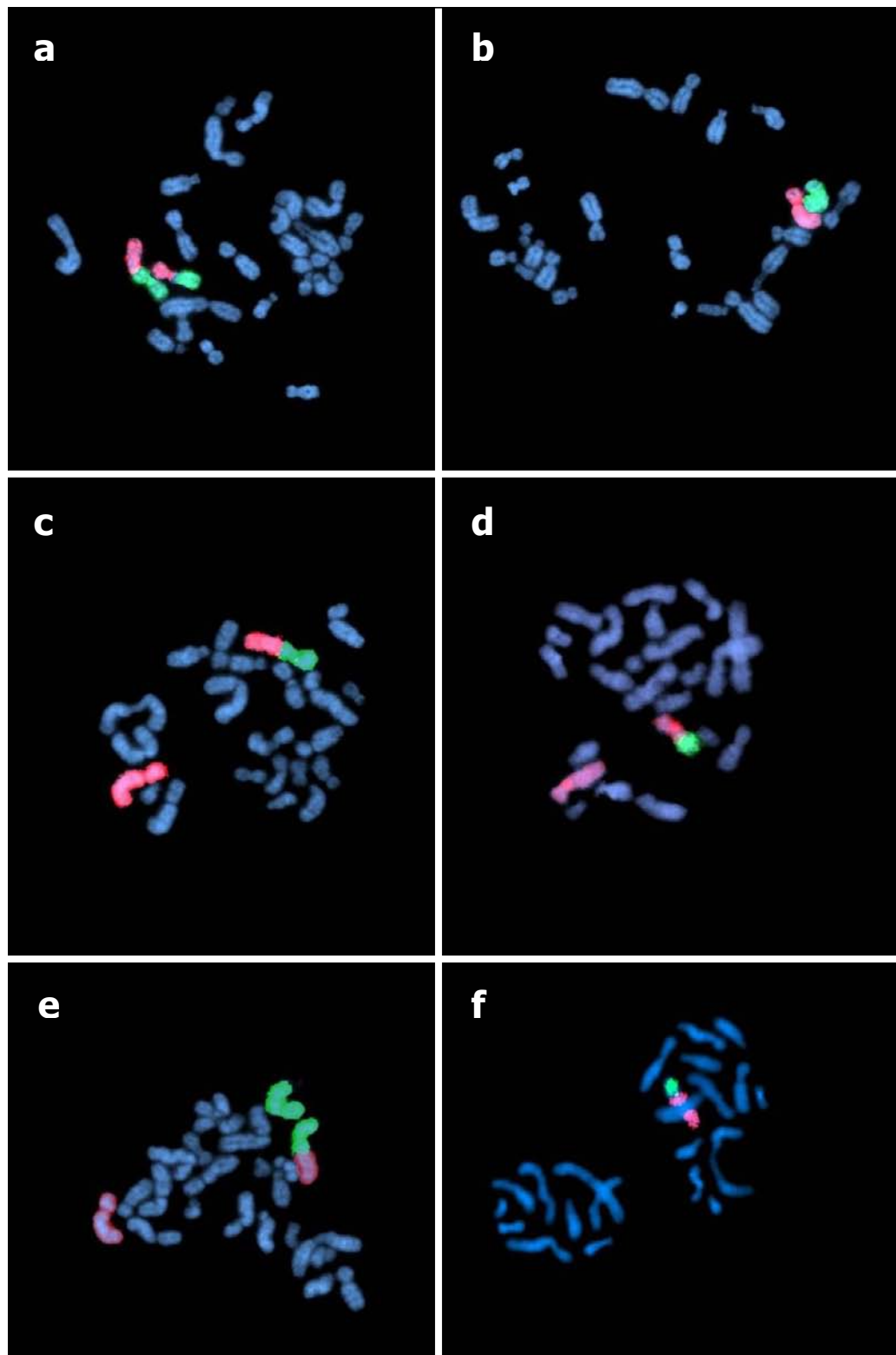
Se ha analizado con éxito, la segregación de los cromosomas translocados 5 y 7, en un total de 296 complementos de pronúcleo masculino de cigotos heterólogos ha-hu aplicando la técnica FISH con librerías de ADN para dichos cromosomas enteros, denominada pintado cromosómico.

Todos los tipos de segregación 2:2 y 3:1 han sido observados (Fig. 4.6 a-e). De los 296 complementos de espermatozoide 147 (49,7%) resultan de la segregación alternante, (83 (28,0%) con la dotación cromosómica normal) y 64 (21,6%) con la dotación cromosómica translocada equilibrada (con ambos derivados der5 i der7)). Un total de 96 (32,4%) complementos resultan de la segregación Adyacente 1, 48 (16.2%) de la segregación Adyacente 2 y 5 (1,7%) de la segregación 3:1 (Tabla 4.4). Entre los productos de la segregación alternante, la frecuencia de los complementos portadores de dotación normal no es significativamente diferentes de la frecuencia de complementos portadores de los cromosomas translocados (test χ^2 , $p = 0,3843$). El riesgo teórico de descendencia desequilibrada para este individuo corresponde al 50,3% (Tabla 4.4).

Tabla 4.4 Segregación meiótica de los cromosomas implicados en una t(5;7)

Segregación	Tipo	Numero	Porcentaje
Alternante	normal	83	28,0 %
	equilibrado	64	21,6 %
Subtotal: equilibrado		147	49,7 %
Adyacente-1	5;der(7)	47	15,9 %
	7;der(5)	49	16,6 %
Adyacente- 2	5;der(5)	29	9,8 %
	7;der(7)	19	6,4%
3:1		5	1,7%
Subtotal: desequilibrado		149	50,3 %
Total		296	100 %

Figura 4.6 Complementos cromosómicos de espermatozoide conteniendo diferentes productos de segregación. Pintado cromosómico (WCP) de los cromosomas 5 (rojo) y 7 (verde). a) Equilibrado. b) Normal. c) Adyacente 1. d) Adyacente 2. e) 3:1 portador de dos cromosomas normales, el 5 y el 7, y un cromosoma translocado der(7); esta metafase contiene solo 23 cromosomas ya que el cromosoma 19 se ha perdido. f) 3:1 portador de un solo cromosoma der(5)



4.3.2.- Estudio de la aneuploidía

La aneuploidía no relacionada con los cromosomas implicados en la reorganización (cromosomas 6, 18, 21, X y Y) se ha realizado sobre cabezas hinchadas, núcleos, de espermatozoide. Se han analizado un total de 20.118 espermatozoides de dicho portador t(5;7): 10.201 espermatozoides para los cromosomas 6 y 21 y 9.912 espermatozoides para los cromosomas X, Y, 18. Las frecuencias de hiperploidía de gonosomas y autosomas detectados para el portador de la translocación, así como para individuos control, se detallan en la Tabla 4.5. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los controles y el individuo portador de la translocación para la frecuencia de disomias de los cromosomas autosómicos estudiados. Para las disomias de los cromosomas sexuales, se han observado frecuencias significativamente más bajas para el individuo portador de la translocación *versus* los controles (Tabla 4.5). La frecuencia total de espermatozoides diploides para el individuo portador de la translocación (0,1%) también es menor que en controles (0,26%) (Tabla 4.5). La proporción entre los cromosomas sexuales fue determinada en 9.917 células y no es diferente de la proporción 1:1 esperada (test χ^2 , $p = 0.8153$).

Tabla 4.5 Frecuencia de espermatozoides diploides e hiperploides t(5;7)(q21;q31)

Constitución cromosómica	t(5;7) %	Controles %(\pm SD)	χ^2
Normal:			
23 X	50,96	49,98(\pm 0,91) ^(b)	
23 Y	47,28	48,70(\pm 1,18) ^(b)	
Hiperploidia Gonosomas:			
X-X-18	0,01	0,10(\pm 0,04) ^(b)	
Y-Y-18	0,07	0,16(\pm 0,06) ^(b)	
X-Y-18	0,07	0,11(\pm 0,05) ^(b)	
Total	0,15	0,37	0,0039
Hiperploidia autosomas:			
6-6-21	0,09	0,13(\pm 0,11) ^(a)	0,8159
18-18-X o 18-18-Y	0,03	0,10(\pm 0,03) ^(b)	0,0614
6-21-21	0,23	0,37(\pm 0,12) ^(a)	0,1937
Diploidia:			
X-X-18-18 o Y-Y-18-18 o X-Y-18-18	0,09	0,25(\pm 0,15) ^(b)	0,0028
6-6-21-21	0,11	0,27(\pm 0,10) ^(a)	0,0039

^a Blanco et al. 1996

^b Blanco et al. 1997

4.4.- SUJETO 4, individuo portador equilibrado de la translocación recíproca t(9;17)(q12;p12)

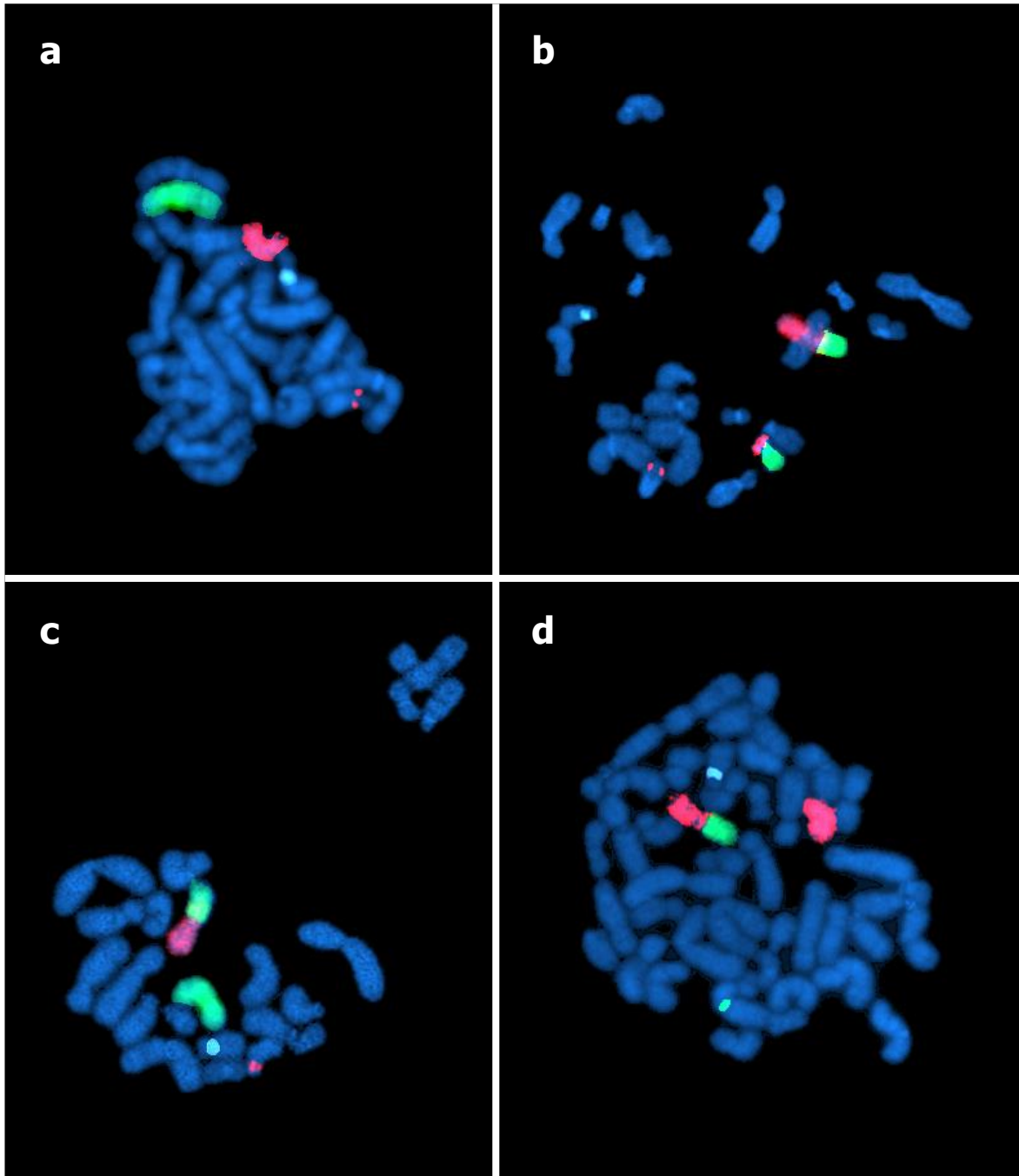
4.4.1.- Estudio de la segregación meiótica

El estudio de la segregación meiótica se ha realizado con éxito en un total de 85 complementos de pronúcleo masculino de cigoto heterólogo ha-hu. Se han identificado todos los productos de segregación 2:2 y 3:1 posibles (Fig. 4.7). De los 85 complementos analizados 44 (51.8 %) son resultado de la segregación alternante (27 (31.8 %) con la dotación de cromosomas 9 y 17 normal y 17 (20 %) con los cromosomas translocados derivados) en una proporción 1:1 esperada (Tabla 4.6). Los restantes 41 (48.2 %) complementos resultan de la segregación Adyacente 1, Adyacente 2 y 3:1 con frecuencias 27,1 % (23); 17,6 % (15) and 3,5 % (3) respectivamente. La proporción de los cromosomas sexuales, determinada en 68 complementos, no muestra diferencias de la relación 1:1 esperada (35 portadores del cromosoma X y 33 conteniendo el cromosoma Y)

Tabla 4.6 Segregación meiótica de los cromosomas implicados en una t(9;17)(q12;p12)

Segregación	Tipo	Numero	Porcentaje
Alternante	normal	27	31,8
	equilibrado	17	20
Subtotal: equilibrado		44	51,8
Adyacente 1	9;der(17)	16	18,8
	17;der(9)	7	8,3
Adyacente 2	9;der(9)	9	10,6
	17;der(17)	6	7
3:1		3	3,5
Subtotal: desequilibrado		41	48,2
Total		85	100

Fig Complementos cromosómicos de pronúcleo masculino de cigoto heterólogo ha-hu con diferentes productos de segregación evidenciado con el pintado cromosómico (WCP): cromosomas 9 (verde) y 17 (rojo) y con además sondas centroméricas (CEP) para los cromosomas X (verde), Y (rojo) y 18 (aqua). a) Segregación Alternante, normal, CEP 18 e Y, b) Segregación Alternante, equilibrada, CEP 18 e Y, c) Segregación Adyacente 1. Cep 18 e Y, d) Segregación Adyacente 2, CEP 18 y X.



4.4.2.- Estudio de la aneuploidía

La aneuploidía para cromosomas no implicados en la translocación se ha analizado con éxito en un total de 20.176 espermatozoides del portador t(9;17)(q12;p12): 10.124 células en una primera ronda usando sondas para los cromosomas 6 y 21 y 10.052 en una segunda ronda usando sondas para los cromosomas X, Y y 18. Las frecuencias de hiperploidía de gonosomas y de autosomas detectadas para el portador de la translocación, así como para individuos control, se detallan en la Tabla 4.7. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los controles y el individuo portador de la translocación para la frecuencia de disomías de los cromosomas autosómicos estudiados. Para las disomías de los cromosomas sexuales, se han observado frecuencias significativamente más altas para el individuo portador de la translocación (0,62) *versus* los controles (0,37) Tabla 4.7. La frecuencia total de espermatozoides diploides para el individuo portador de la translocación (0,48%) también es mayor que en controles (0,26%) (Tabla 4.7). La proporción entre los cromosomas sexuales fue determinada en 9.932 células siendo significativamente diferente de la proporción 1:1 esperada (test χ^2 , p = 0.0005).

Tabla 4.7 Frecuencia de espermatozoides diploides e hiperploides para t(9;17)(q12;p12)

Constitución cromosómica	t(9;17) %	Controles %(\pm SD)	χ^2
Normal:			
23 X	51,85	49,98(\pm 0,91) ^(b)	
23 Y	46,95	48,70(\pm 1,18) ^(b)	0,0005***
Hiperploidia Gonosomas:			
X-X-18	0,00	0,10(\pm 0,04) ^(b)	
Y-Y-18	0,03	0,16(\pm 0,06) ^(b)	
X-Y-18	0,59	0,11(\pm 0,05) ^(b)	
Total	0,62	0,37	0,0004***
Hiperploidia autosomas:			
6-6-21	0,07	0,13(\pm 0,11) ^(a)	0,4390
18-18-X o 18-18-Y	0,13	0,10(\pm 0,03) ^(b)	0,4112
6-21-21	0,21	0,37(\pm 0,12) ^(a)	0,0785
Diploidia:			
X-X-18-18 o Y-Y-18-18 o X-Y-18-18	0,44	0,25(\pm 0,15) ^(b)	0,0016**
6-6-21-21	0,51	0,27(\pm 0,10) ^(a)	0,0006***

^a(Blanco et al. 1996)

^b(Blanco et al. 1997)

4.5.- SUJETO 5, individuo portador equilibrado de la translocación recíproca t(9;17)(p13;q21,3)

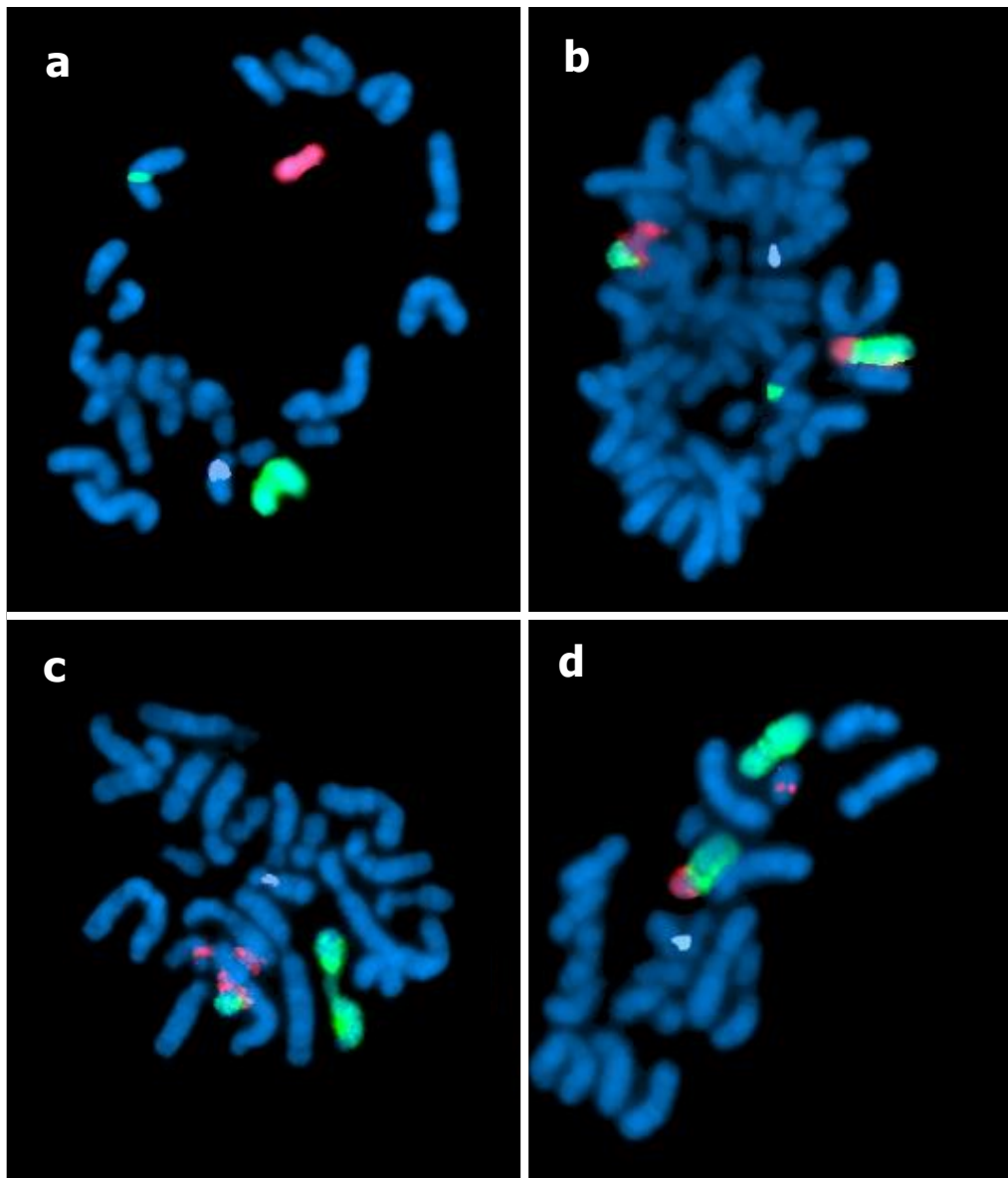
4.5.1.- Estudio de la segregación meiótica

Se ha determinado el patrón de segregación, con éxito, para un total de 200 complementos cromosómicos de pronúcleo masculino de cigoto heterólogo ha-hu. Todos los productos de segregación 2:2 posibles y algunos de los productos 3:1 han sido observados (Fig. 4.8). El 50% (100) de los complementos estudiados resultan de la segregación Alternante con una proporción de 54 (27 %) complementos con cromosomas 9 y 17 normales y 46 (23%) complementos equilibrados, según la proporción esperada 1:1 (Tabla 4.8). Sesenta (30%) complementos resultan de la segregación Adyacente 1, 29 (14.5 %) de la segregación Adyacente 2 y 11 (5.5 %) de la segregación 3:1. La proporción de los cromosomas sexuales determinada con éxito en 197 complementos de espermatozoide no evidencia diferencias del esperado 1:1 (85 complementos portadores del cromosoma X y 112 portadores del cromosoma Y)

Tabla 4.8 Segregación meiótica de los cromosomas implicados en una t(9;17)(p13,q21.3)

Segregación	Tipo	Numero	Porcentaje
Alternante	normal	74	27,4
	equilibrado	66	24,4
Subtotal: equilibrado		140	51,8
Adyacente 1	9;der(17)	34	12,6
	17;der(9)	48	17,8
Adyacente 2	9;der(9)	24	8,9
	17;der(17)	13	4,8
3:1		11	4,1
Subtotal: desequilibrado		130	48,1
Total		270	100

Figura 4.8 Complementos cromosómicos de pronúcleo masculino de cigoto ha-hu con diferentes productos de segregación. Pintado cromosómico (WCP) de los cromosomas 9 (verde) y 17 (rojo) además de sondas centroméricas (CEP) para los cromosomas X (verde), Y (rojo) y 18 (aqua). a) Segregación Alternante normal, CEP 18 y X, b) Segregación Alternante equilibrada, CEP 18 y X, c) Segregación Adyacente 1. CEP 18 e Y, d) Segregación Adyacente 2, CEP 18 e Y.



4.5.2.- Estudio de la aneuploidía

La aneuploidia para cromosomas no relacionados con la reorganización, se ha obtenido, con éxito, en un total de 20.303 cabezas hinchadas, núcleos, de espermatozoide del portador t(9;17)(p13;q21.3) hecho que posibilita determinar las frecuencias respectivas de hiperploidía de gonosomas y de autosomas. Se han analizado con éxito, en una primera ronda, 10.081 espermatozoides para los cromosomas 6 y 21 y en una segunda ronda, 10.222 núcleos para los cromosomas X, Y, 18. Las frecuencias encontradas para el portador de la translocación y para los controles se detallan en la Tabla 4.9, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los controles y el individuo portador de la translocación. La proporción entre cromosomas sexuales se ha determinado con éxito en un total de 10.147 espermatozoides y no se observa diferencias versus la proporción 1:1 esperada (test χ^2 , $p = 0.6839$).

Tabla 4.9 Frecuencia de espermatozoides diploides e hiperploides para t(9;17)(p13;q21.3)

Constitución cromosómica	t(9;17) %	Controles %(\pm SD)	χ^2
Normal:			
23 X	49,9	49,98(\pm 0.91) ^(b)	0,6839
23 Y	49,3	48,70(\pm 1.18) ^(b)	
Hiperploidia Gonosomas:			
X-X-18	0,02	0,10(\pm 0.04) ^(b)	0,0591
Y-Y-18	0,05	0,16(\pm 0.06) ^(b)	
X-Y-18	0,17	0,11(\pm 0.05) ^(b)	
Total	0,24	0,37	
Hiperploidia autosomas:			
6-6-21	0,07	0,13(\pm 0.11) ^(a)	0,1160
18-18-X o 18-18-Y	0,04	0,10(\pm 0.03) ^(b)	
6-21-21	0,14	0,37(\pm 0.12) ^(a)	
Diploidia:			
X-X-18-18 o Y-Y-18-18 o X-Y-18-18	0,34	0,25(\pm 0.15) ^(b)	0,1156
6-6-21-21	0,36	0,27(\pm 0.10) ^(a)	0,1672

^a Blanco et al. 1996

^b Blanco et al. 1997

5.- DISCUSIÓN

5. 1.- APORTACIONES METODOLOGICAS

Con frecuencia acceder a muestras humanas, de interés para realizar algún tipo de estudio médico-biológico, de cualquier tipo de tejido o células, suele ser complicado. Sobre todo si estos pacientes se encuentran inmersos en un procedimiento médico (diagnóstico de alguna enfermedad) o bien han sido identificados tras un hecho traumático como un aborto o el nacimiento de un hijo con algún problema de carácter médico. Esta circunstancia implica que muchas veces contemos con muy poca muestra y haya que optimizarla para obtener el máximo rendimiento al realizar los estudios pertinentes.

En nuestro estudio, las muestras utilizadas son muestras de semen de individuos portadores de reorganizaciones cromosómicas. Este es el caso de las preparaciones con extensiones de pronúcleo masculino, detenido en la primera división mitótica, obtenidas mediante la técnica de fecundación heteróloga (ovocitos de hámster- espermatozoide humano de eyaculado). Estas muestras de eyaculado son a veces únicas, o de las que ocasionalmente se dispone de alícuotas fraccionadas y convenientemente congeladas (Chernos et al. 1986) Estas extensiones de complementos cromosómicos serán posteriormente utilizados para en el análisis por ejemplo de la segregación meiótica de los cromosomas de espermatozoides aneuploidía o de alteraciones segmentales.

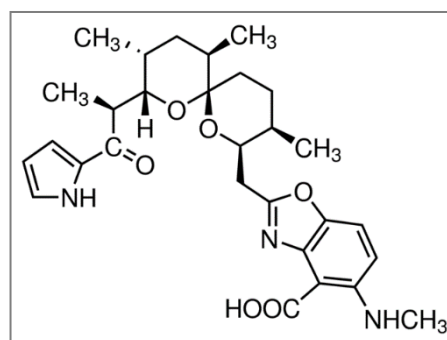


Figura 5.1 Ionóforo A23187

Dichas muestras de espermatozoides necesitan un buen nivel de capacitación, requiriendo, por lo tanto, un tiempo de capacitación extenso y variable.

Es por ello que al no contar con un gran volumen de muestras, ha sido necesario implementar dicho proceso, el de capacitación, con la utilización del Ionóforo A23187 (Fig. 6.1.). Este complejo lipolítico y agente movilizante de iones Ca^{2+} , induce la reacción acrosómica aumentando la capacidad penetrante del espermatozoide, de modo que se consigue un mayor rendimiento de las muestras además de acelerar y uniformizar los tiempos de capacitación (Brucker y Lipford 1995; De Jonge y Barratt 2013). El uso de Ionóforo A23187 no afecta a la frecuencias de espermatozoides con anomalías

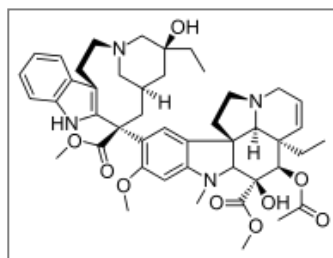
cromosómicas con respecto a los capacitados con albumina (Alvarez et al. 1996). Es por lo tanto muy recomendable el uso del Ionóforo A23187 como agente capacitador cuando se dispone únicamente de pequeñas fracciones de muestra de semen congeladas.

Como se ha dicho, para la obtención de los complementos cromosómicos de pronúcleo masculino en la primera división mitótica de cigoto heterólogo, es necesario realizar el cultivo de los ovocitos de hámster penetrados con espermatozoides humanos en un medio que contenga un agente antimitótico. Tradicionalmente el agente antimitótico utilizado ha sido el colcemid. En el presente trabajo se sustituyó por vinblastina. La vinblastina pertenece al grupo de los alcaloides de la Vinca, es un aneuploidógeno que se usa en la quimioterapia del cáncer. Esta molécula se une a la tubulina inhibiendo el establecimiento de los microtúbulos, afectando la formación del huso mitótico y del cinetocoro.

La vinblastina permite obtener cromosomas con una longitud mayor y mejor definida que los obtenidos con el uso de colcemid y una mayor separación entre los diferentes complementos cromosómicos contenidos en cada cigoto de hámster-humano, lo que facilita su



Figura 5.2 Vinca de Madagascar (Catharanthus roseus)



identificación y cariotipado tras la aplicación de las diferentes técnicas de identificación cromosómica, clásicas y moleculares, usadas en nuestro estudio (Cifuentes et al. 1998).

Metodología de análisis citogenético

Durante décadas las técnicas de bandeado cromosómico (C-, Q-, R-, G-) aplicadas sobre muestras de cultivos de células sanguíneas, han permitido la identificación individualizada de los cromosomas y así la caracterización de muchas patologías relacionadas con cambios estructurales de los cromosomas o por pérdida o duplicación de los mismos (pej. Trisomía 21; Síndrome de Dawn, 5p- Cri du chat, etc.....) (Emery y Raimond's 2002). Estas técnicas de citogenética clásica, en absoluto obsoletas, han tenido y tienen gran valor en los estudios realizados en núcleos de células somáticas durante más de 40 años (Sumner et al. 1971;

Yunis 1976; Rigola et al. 2001) y también en extensiones cromosómicas de pronúcleo masculino (Martin et al. 1983; Benet et al. 1986; Templado et al. 1988). Sin embargo en este último caso, en ocasiones se dispone de un número escaso de complementos cromosómicos de pronúcleo masculino, obtenidos de cigotos heterólogos, mediante fecundación de ovocitos de hámster sin zona pelúcida con espermatozoide humanos (cigotos hámster-humano) y por lo tanto con de gran valor, además de por su escasez por su procedencia, para el adecuado análisis citogenético. También, en ocasiones la extensión cromosómica no es adecuada para la identificación individual de cada cromosoma por presentar superposiciones o morfología premetafásica por lo que las técnicas de citogenética clásica de bandeo cromosómico no tienen aplicación.

El gran avance del conocimiento de los procesos moleculares genéticos ha supuesto para la citogenética un gran empuje, convirtiéndose, gracias al desarrollo de métodos para la manipulación del ADN en una poderosa herramienta diagnóstica de la citogenética humana (Mullis et al. 1986). Desde los años 50 el descubrimiento, caracterización y síntesis del ADN, la observación de la facilidad con la que se pueden separar (desnaturalizar) y volver a unir (renaturalizar) las dos cadenas que componen el ADN (proceso de hibridación) tanto en suspensión como sobre preparaciones citológicas de cromosomas o núcleos, sentaron las bases para lo que hoy se llama hibridación in situ fluorescente (FISH).

Autores como Cremer et al. (1988); Pinkel et al. (1986, 1988) desarrollaron el método de la hibridación in situ fluorescente sobre metafase e interfaces de células y tejidos tumorales, preparando sondas de cromosoma entero marcadas fluorescentemente para realizar un pintado cromosómico (Whole Chromosome Painting; WCP) con gran potencial para identificación cromosómica normal y también para la identificación de reorganizaciones cromosómicas.

La adecuación del procedimiento de WCP a extensiones de pronúcleo masculino ha requerido, debido a que, en su momento, no se disponían de forma comercial, de la elaboración de sondas para este objetivo. Se adquirieron sondas de DNA específicas de cromosomas, elaboradas y marcadas por nosotros de acuerdo al método desarrollado y descrito en el apartado de material y métodos. Una vez optimizado el procedimiento,

jugando con la cantidad de ADN competidor que se incluye en la elaboración de la sonda (apartado 3.5.1. de material y método), de modo que se consigue un cierto marcaje inespecífico en todos los cromosomas humanos, lo que posibilita distinguir a los cromosomas del complemento humano de entre aquellos cromosomas que pertenecen al complemento de pronúcleo femenino de hámster (Fig. 4.2). Esta evidencia de falta de compatibilidad del genoma humano con el de hámster, permitió elaborar una sonda genómica de hámster para su uso en otros estudios, donde la falta de inespecificidad de las sondas comerciales no permiten una fácil discriminación del complemento de hámster (Fig. 4.3) sobre el de pronúcleo masculino humano. Esta evidencia comporta que con el procedimiento desarrollado se pueden analizar complementos de baja calidad que con bandas citogenética clásica habrían sido descartados para el análisis. El procedimiento desarrollado en este trabajo ha evidenciado su gran utilidad en el análisis de la segregación de reorganizaciones cromosómicas estructurales. En este trabajo, se validó, por primera vez, un procedimiento de WCP a pronúcleo masculino de cigotos heterólogos hámster-humano con espermatozoides de un portador de inversión, $inv(7)(p13;q36)$ (Cifuentes P et al. 1995). La segregación meiótica de los cromosomas normal y derivativo de esta reorganización, fueron concordantes con los previamente obtenidos mediante bandas-G (Navarro et al. 1993). Este trabajo ha evidenciado los cuatro tipos de complementos cromosómicos (dos complementos con cromosoma 7 no recombinantes; con cromosoma 7 normal y cromosoma 7 con la inversión y dos complementos cromosómicos con 7 recombinante; cromosoma 7q+; 7q- y cromosoma 7p-;7q+) y con incidencias para cada uno de ellos similares a las previamente descritas. El uso del WCP permite un análisis más rápido de la segregación de los cromosomas envueltos en una reorganización. Incluso en las preparaciones con una extensión pobre de los cromosomas con solapamientos que hace difícil el estudio con las técnicas de bandeo, las técnicas de hibridación in situ fluorescente permite su análisis, lo cual implica un mayor rendimiento de la técnica de fusión heteróloga hámster-humano con la que se obtienen los complementos cromosómicos de pronúcleo masculino.

El método de fusión hámster-humano es el único que permite el análisis citogenético completo del complemento cromosómico de pronúcleos masculinos de cigotos heterólogos hámster-humano de espermatozoides humanos, pero el número total de complementos que

se consiguen analizar por individuo estudiado, es estadísticamente bajo (Guttenbach et al. 1997). Un método alternativo que se ha desarrollado es la aplicación de las técnicas de hibridación in situ fluorescente sobre cabezas de espermatozoides, previamente descondensadas, fijados sobre un portaobjetos. Las cabezas de espermatozoide o núcleos de espermatozoides son descondensadas mediante métodos químicos apropiados como por ejemplo el uso de DTT (*Dithiothreitol*), tripsina, salicilato de litio (LSI), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), ácido etilendiaminotriacetato (EDTA) y triton X-100, que rompe enlaces disulfuro entre protaminas. (Zirkin BR et al. 1985; West et al. 1989; Guttenbach y Schmid 1990; Wyrobek et al. 1990; Holmes y Martin 1993; Bischoff et al. 1994). El tratamiento de descondensación permite que el DNA, empaquetado principalmente con protaminas, sea después del tratamiento más accesible a las sondas de hibridación cromosómica complementarias habitualmente utilizadas: centroméricas, teloméricas o *locus-específica* adecuadamente marcadas con fluorocromos. La combinación estratégica de varias sondas seleccionadas para determinados cromosomas, previamente determinados según tipo de análisis, permite realizar estudios citogenéticos específicos: estudio de la segregación meiótica en reorganizaciones concretas, incidencia de aneuploidías, relación de X:Y, incluso incidencia del efecto intercromosómico. Aplicando sobre extensiones de cabezas de espermatozoide descondensadas de espermatozoides se consigue que el análisis citogenético cuente con una muestra analizada muy superior al del estudio de pronúcleo masculinos.

Este método, relativamente simple y rápido, en el que solo se pueden usar unas pocas sondas dada la limitación de fluorocromos disponibles por hibridación y el riesgo de superposición de marcas por cabeza no permite realizar un análisis cromosómico del complemento completo del núcleo de espermatozoide.

Este procedimiento aplicado en este trabajo a muestras de semen de individuos heterocigotos para distintas reordenaciones cromosómicas, ha sido también ampliamente usado, a lo largo de los últimos años, y ha producido diversos trabajos de casos individuales o de series amplias de un gran número de individuos de individuos fértiles o infértiles portadores de reorganizaciones cromosómicas así como de individuos control (Miharu 2005; Bernicot et al. 2010; Templado et al. 2011; Godo et al. 2013; Vozdova et al. 2013).

5. 2.- SEGREGACIÓN

5.2.1- Inversiones

Como ya se ha indicado en el apartado de desarrollo metodológico, en el presente trabajo, se aporta el análisis de un total de 240 complementos cromosómicos de pronúcleo masculino y 5782 cabezas de espermatozoide descondensadas de espermatozoide de un portador 46, XY, inv(7)(p13q36). Un total de 114 complementos fueron analizados con el método de pintado cromosómico y un total de 126 mediante FISH con sondas específicas. Además 5782 cabezas de espermatozoide descondensadas fueron estudiadas mediante FISH de sondas específicas. Se ha identificado, con éxito, todas las tipologías de segregación esperadas. Los resultados obtenidos en el análisis de complementos de pronúcleo masculino pueden ser considerados globalmente, dado que no mostraban diferencias significativas entre ellos (Test de Fisher con aproximación de Katz, $P=0,3967$). La suma de estos datos refleja una incidencia de tipologías de segregación sin recombinantes del 82,8% vs las formas recombinantes del 17,15%: 42% con el cromosoma 7 normal; 40,8% con el cromosoma 7 invertido; 8,3% con la forma recombinante q+ (rec(7)dup(p)del(q)), 8,75% con la forma recombinante p- (rec(7)dup(q)del(p)). Estos datos no son significativamente diferentes a los obtenidos por Navarro et al. (1993) (Test de Fisher con aproximación de Katz, $P=0,0834$).

En el caso del estudio en cabezas de espermatozoide descondensadas, las diferencias si son evidentes cuando se comparan con los estudios citogenéticos realizados en cromosomas de pronúcleo masculino analizados con bandas-G vs los analizados con el pintado cromosómico (Test χ^2 con corrección de Yates, $P=<0,0001$ y $P=0,0036$), no obstante las diferencias no son significativas cuando la comparación se realiza entre los datos obtenidos en complemento de pronúcleo masculino y los obtenidos en cabezas de espermatozoide descondensadas utilizando las sondas FISH específicas para la inversión (Test χ^2 con corrección de Yates, $p=0,1210$). En el caso de estudios citogenéticos con bandas G, así como con el uso del pintado cromosómico, el grado de condensación de los cromosomas es crucial para poder identificar, de forma correcta, los complementos cromosómicos con productos recombinantes; específicamente el producto 7q+. En estos casos el componente

morfológico es determinante para diferenciar el 7 normal del 7q+, ya que si en un complemento está muy condensado, podría equívocamente identificarse como un 7 normal. Sin embargo en el caso del uso de sondas específicas, con el marcaje de la región subcentromérica y centromérica del cromosoma 7, el patrón que se observa es fácilmente identificable para todas sus tipologías (Fig. 4.1)

En la literatura se presentan aquellos casos de varones portadores de inversiones pericéntricas cuya segregación ha sido determinada mediante el análisis citogenético en complementos cromosómicos de pronúcleo masculino, obtenidos por el sistema de fusión heteróloga hámster–humano y la técnica de bandeo cromosómico (Balkan y Martin 1983; Martin 1991; Jenderny et al. 1992; Martin 1993; Navarro et al. 1993; Martin et al. 1994; Templado et al. 1996; Colls et al. 1997). La segregación meiótica observada para cada una de las inversiones queda reflejada en la Tabla 5.1a. Estos resultados son concordantes con la predicción de Ashley (1988) según la cual los cromosomas recombinantes se producen en inversiones cuyos puntos de rotura se dan en banda G-clara, mientras que no se produce recombinación cromosómica si las roturas se ha producido en banda G-oscura. Considerando los datos publicados existentes, en tres de los siete estudios realizados en complementos cromosómicos de pronúcleo masculino no se identificaron formas recombinantes y los puntos de rotura se localizan en una banda heterocromática (centromérica o constricción secundaria) (Balkan y Martin 1983; Martin et al. 1994; Colls et al. 1997). En tres de las cuatro inversiones restantes, los puntos de rotura eran en banda G-clara (Martin 1991; Martin 1993; y el presente trabajo que incluye los resultados del estudio de Navarro et al. 1993) y en estos portadores se pueden observar espermatozoides con productos recombinantes.

En la única inversión con puntos de rotura en banda G-clara y en la que no se han descrito recombinantes (Jenderny et al. 1992) solo se estudiaron 26 complementos cromosómicos. Pero además de una muestra reducida podrían concurrir, además, otros elementos excluyentes como es el tamaño del fragmento invertido que es menor a 50Mpb y la prácticamente nula frecuencia esperada de quiasmas dentro del segmento invertido, según

la distribución de puntos de recombinación en bivalentes cromosómicos obtenidos mediante análisis inmunocitoquímico de complejos sinaptonémicos (Sun et al. 2004; Codina-Pascual et al. 2006).

Los más de 20 estudios de segregación, mediante FISH en cabezas de espermatozoide descondensadas, de portadores de inversión pericéntrica publicadas, han arrojado más luz sobre el comportamiento de estas reorganizaciones, pudiendo observar que la premisa de Ashley (1988) no se cumple estrictamente. Según se refleja en la Tabla 5.1, los estudios de FISH en cabezas de espermatozoide descondensadas aportan un número mucho mayor de células estudiadas llegando a observarse, en el caso del portador de la *inv(1)(p31q12)* (Jaarola et al. 1998), estudiada previamente en cromosomas de pronúcleo masculino (Martin et al. 1994), la aparición de espermatozoides con productos recombinantes, a pesar de que las roturas se produjeron en bandas G-oscuras. Lo mismo sucede en tres casos más, *inv(12)(p11q23)*, *inv(8)(p12q21)* (Morel et al. 2007) y *inv(1)(p21q31)* (Kirkpatrick et al. 2012). Los cuatro casos poseen un fragmento invertido lo suficientemente grande como para que, según lo descrito por Ashley (1988), tras un primer momento de heterohomología entre las bandas G-oscuras (no homólogas) se dé la falta insalvable de reconocimiento de homología entre bandas G-claras. Ello produciría un bloqueo en la sinapsis cuya resolución pasaría por la formación de un bucle favoreciendo, por lo tanto, que se pueda producir un quiasma. Además se ha descrito que estas regiones presentan una probabilidad muy baja de puntos de recombinación, (Codina-Pascual et al. 2006) lo cual concuerda con la baja frecuencia de productos recombinantes observada. Por otro lado encontramos casos donde las roturas se han dado de forma combinada: un punto en banda G-clara y otro en banda G-oscura. En esta circunstancia, según Ashley (1988), también se produciría heterohomología y por lo tanto no bloqueo de sinapsis hasta que concurrieran dos bandas claras no homólogas. Se resolvería el bloqueo sináptico que se produciría en ese momento con la formación del bucle (más pequeño) y así se favorecería la recombinación y formación de quiasmas dentro del segmento invertido. En cuatro de las seis inversiones se han observado una alta frecuencia de productos recombinantes *inv(21)(p12q22.3)* (Malan et al. 2006); *inv(20)(p12.3q13.33)*, *inv(1)(p36.3q43)*, *inv(8)(p12q14.1)* (Morel et al. 2007). En estos casos el segmento invertido es grande, y la probabilidad esperada de recombinación y

formación de al menos un quiasma dentro de este segmento es alta, de acuerdo con estudios de incidencia de recombinación en complejos sinaptonémicos (Codina-Pascual et al. 2006). Este hecho no ocurre en los dos casos de inv(2)(p11q13) (Morel et al. 2007; Ferfour et al. 2009) cuyo segmento invertido es muy pequeño. Sin embargo, Ferfour et al. (2009) llega a observar recombinantes, aunque en una frecuencia muy baja. La región invertida aunque es pequeña, es también rica en genes y existe la posibilidad de que se produzca un evento de recombinación y un quiasma en este segmento (Laurie y Hultén 1985 a,b; Codina-Pascual et al. 2006).

En la literatura se han publicado estudios con propuestas como las de Winsor et al. (1978), que postulaba que al menos el 30% del cromosoma debía estar involucrado en la reorganización para que se produzca el bucle de inversión. En 2007, Morel et al. dirimía que en inversiones que suponían menos de un 30% del cromosoma no se producían productos recombinantes, que entre el 30 y el 50% la incidencia de recombinantes sería moderada y que cuando el segmento invertido superaba el 50% la presencia de recombinantes sería altamente significativa. Antón et al. en su revisión del 2005, propone que para que se produzca una incidencia de gametos recombinantes el segmento invertido debía ser de al menos 100 Mpb e implicar, al menos, el 50% del cromosoma. Sin embargo, se deberá considerar, como ya proponía Kaiser en 1984, que el comportamiento de cada inversión puede depender tanto del tamaño del segmento invertido como de las características morfológicas del cromosoma implicado. También es cierto que la consideración del tamaño del segmento invertido ha de tenerse en cuenta, en proporción a la longitud total del cromosoma. Las características morfológicas del cromosoma y del segmento invertido darán la pauta de formación del bucle de apareamiento sináptico y la presencia o no de un número desigual de quiasmas en estas regiones invertidas, dará la referencia de la formación o no de productos recombinantes (Anton et al. 2005).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, así como los estudios encontrados en la literatura y que se recogen en la Tabla 5.1, confirman que las inversiones pericéntrica tienen asociado un riesgo de aneusomía para la descendencia. Este riesgo es más alto cuanto más alta es la proporción de gametos desequilibrados y estos desequilibrios son más

compatibles con la vida cuanto más distal sea el punto de rotura y más pequeños los fragmentos duplicados o perdidos en los productos recombinantes (Martin 1993; Malan et al. 2006; Caer et al. 2008).

Tabla 5.1. Segregación meiótica de individuos portadores de inversión pericéntrica

Portadores	Numero de compl. analizadas		No recombinantes				Recombinante				Medida Crom		Medida segm. invertida		Banda	Referencias	
	No.	%	Normal	invertido		recq +	No.	%	recp -	No.	%	Mpb	%				
				No.	(%)									No.			(%)
Estudio en pronucleos masculinos																	
inv(3)(p11q11)	111		64	(57.7)	47	(42.3)	-	-	-	-	-	198	3	1.5	Oh/Oh	Balkan W. et al. 1983	
inv(3)(p25q21)	133		50	(37.6)	52	(31.6)	23	(17.3)	18	(13.5)		198	107	54	C/C	Martin RH. 1991	
inv(20)(p13q11.2)	26		14	(53.8)	12	(46.2)	-	-	-	-		64	29	45	C/C	Jenderny J. et al. 1992	
inv(8)(p23q22) ^a	158		75	(47.5)	65	(41.1)	9	(5.7)	9	(5.7)		145	87	62	C/C	Martin RH. 1993	
inv(7)(p13q36) ^c	140		53	(37.9)	52	(37.1)	10	(7.1)	24	(17.1)		159	106	67	C/C	Navarro et al. 1993	
inv(1)(p31q12) ^b	157		72	(45.9)	85	(54.1)	-	-	-	-		250	40	16	O/Oh	Martin RH. et al. 1994	
inv(9)(p11q13)	282		137	(48.6)	145	(51.4)	-	-	-	-		138	32	23	Oh/C	Colls P. et al. 1996	
inv(7)(p13q36) ^c	114		51	(44.7)	41	(36.0)	10	(8.8)	12	(10.5)		159	106	67	C/C	este trabajo	
inv(7)(p13q36) ^c	126		50	(39.7)	57	(45.2)	10	(7.9)	9	(7.1)		159	106	67	C/C	este trabajo	
Estudio en cabezas descondensadas																	
inv(8)(p23q22) ^a	3168				(86.87)			(6.25)				(6.88)	145	87	62	C/C	Jaarola et al. 1998
inv(1)(p31q12) ^b	6006				(99.62)			(0.25)				(0.13)	250	40	16	O/Oh	Jaarola et al. 1998
inv(6)(p23q25)	10049				(45.7)			(19.18)				(18.67)	171	140	80	C/C	Anton et al. 2002
inv(1)(p36q32)	1636				(82.5)			(8.7)				(7.3)	250	184	74	C/C	Yakut et al. 2003
inv(2)(p23q33)	915				(60.98)			(20.22)				(17.49)	242	164	68	C/C	Mikhaail-Philips et al. 2004
inv(17)(p13.1q25.3)	2000				(73.0)			(0.8)				(0.6)	83	78	94	C/C	Mikhaail-Philips et al. 2005
inv(2)(p11.2q13)	5460				(100)			0					242	29	11	C/C	Anton et al. 2005
inv(4)(p16q21)	6406				(99.22)			(0.78)					190	64	33	C/C	Anton et al. 2005
inv(10)(p13q22.3)	10723				(96.59)			(3.41)					134	63	47	C/C	Anton et al. 2005
inv(21)(p12q22.3)	3400				2298	(67.58)	726	(21.4)	381	(11.2)			47	37	79	Oh/C	Malan et al. 2006
inv(20)(p12.3q13.33)	625				(80.00)			(9.92)					64	50	78	O/C	Morel et al. 2007
inv(12)(p11q23)	5051				(91.41)			(3.98)					133	61	46	Oh/O	Morel et al. 2007
inv(2)(p11q13)	702				(99.43)			0					242	23	10	Oh/C	Morel et al. 2007
inv(1)(p36.3q43)	69				(68.12)			(11.59)					250	240	95	C/O	Morel et al. 2007
inv(8)(p12q21)	3402				(97.00)			(1.00)					145	46	31	O/O	Morel et al. 2007
inv(8)(p12q24.1)	2601				(60.94)			(19.99)					145	87	61	O/C	Morel et al. 2007
inv(1)(p22q42)	2133				1709	(80.1)	162	(7.6)	153	(7.2)			250	130	52.2	C/C	Chantot-Bastarud et al. 2007
inv(8)(p23q24)	2045				(61.03)			(20.0)					145	110	76	C/C	Caer et al. 2008
inv(2)(p11q13) ^d	7056				(99.7)			(0.3)					242	23	10	Oh/C	Ferfouri et al. 2009
inv(5)(p15.3q11.2)	7006				6802	(97.1)	5	(0.07)	7	(0.1)			182	44	24	C/C	Bernicot et al. 2010
inv(1)(p21q31)	237				227	(95.7)	8	(3.4)					250	90	36	O/O	Krikpatrick et al. 2012
inv(8)(p11.2q21.2)	1033				1016	(98.3)	7	(0.7)	10	(1.0)			145	47	32	C/C	Ferfouri et al. 2012
inv(7)(p13q36) ^c	5782				5181	(89.8)	322	(5.6)	279	(4.8)			159	106	67	C/C	este trabajo

^{a, b, c} mismas inversiones estudiadas con dos técnicas diferentes (bandas en pronucleo masculino y FISH en cabezas descondensadas);

^d suma de 7 pacientes con la misma inversión; O= Banda G-oscuro; Oh= Banda heterocromatina C= Banda G-clara

Δ Valores obtenidos de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview> Septiembre 2015

La baja incidencia en la población de inversiones cromosómicas, hace que el número de estudios de segregación en portadores equilibrados de este tipo de reorganización cromosómica no haya aumentado sustancialmente en los últimos diez años. En la Tabla 5.1 se recogen todos los casos publicados. Los parámetros de longitud del segmento invertido y el porcentaje del cromosoma en cada trabajo publicado, no indicaba en base a que referente de dimensiones y tamaño cromosómico se había determinado, en el presente estudio para todos los casos publicados se ha realizado un cálculo previo de tamaños de segmentos cromosómicos invertidos y de porcentaje relativo del segmento invertido vs al tamaño cromosómico para cada reorganización usando como referencia para todos los casos la base de datos publicada por el NIH (Instituto Nacional de Salud de los EEUU) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>, Septiembre 2015). Posteriormente se ha valorado de nuevo la correlación entre formas recombinantes y tamaño del segmento invertido, y formas recombinantes y porcentaje relativo del segmento invertido para las distintas inversiones, obteniendo en esta nueva revisión correlaciones positivas equivalentes a las descritas por Anton et al. en el año 2005. En este estudio se evidencia una correlación positiva entre el tamaño del segmento invertido en Mpb y el porcentaje de gametos portadores de productos recombinantes y también entre la proporción de la región invertida respecto del tamaño del cromosoma y el porcentaje total de gametos portadores de productos recombinantes.

Las aportaciones de estudios de segregación en portadores equilibrados de inversión (Tabla 5.1) involucrando a distintos cromosomas, con dimensiones y proporciones de los correspondientes segmentos invertidos, o bien involucrando al mismo cromosoma pero con tamaños de segmentos invertidos distintos, han permitido ratificar la existencia de la correlación positiva entre estos parámetros. Sin embargo, estos se ajustan más para la proporción relativa del tamaño del segmento respecto del tamaño cromosómico (%) más que al valor absoluto del tamaño del segmento (Mpb) ($r^2=0,4537$ y $r^2=0,9756$, para una correlación polinómica de grado 2 respectivamente, Test χ^2 de correlación de Pearson) (Fig. 5.1.a y 5.1.b). En cualquier caso debe tenerse en cuenta que existen casos que se desvían completamente de esta función, por lo que al analizar estos casos con mayor detalle, se

puede observar que los segmentos invertidos corresponden a regiones con mayor número de lugares calientes de recombinación (Codina-Pascual et al. 2006), por lo que la probabilidad de que se produzca un número impar de eventos de recombinación meiótica y de quiasmas es mayor y por lo tanto que la frecuencia de productos recombinantes también puede estar aumentada.

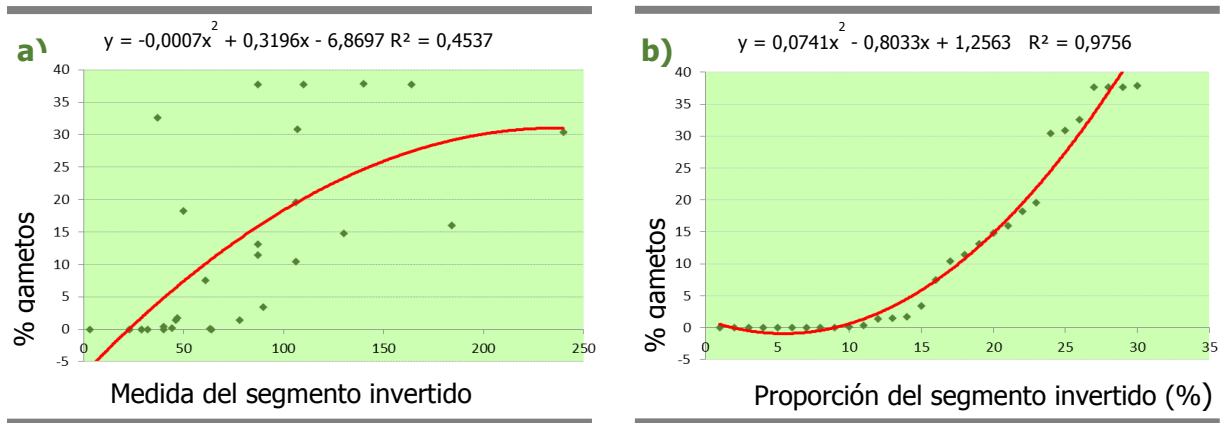


Figura 5.1 Relación entre el porcentaje de gametos recombinantes y a) medida del segmento invertido (Mpb) b) proporción del segmento invertido respecto del tamaño total del cromosoma (%)

El asesoramiento genético de los portadores de inversión, y la estimación del riesgo, es complejo, ya que el riesgo varía según la inversión y se han de tener en cuenta múltiples parámetros. Los estudios de la segregación cromosómica en cabezas de espermatozoides descondensadas de portadores equilibrados de una inversión ayudan a la comprensión de los mecanismos de segregación meiótica y permiten evaluar el riesgo personalizado de descendencia desequilibrada. Por lo tanto dichos estudios integrados como exploración genética en los estudios para hombres infértiles y parejas con abortos recurrentes o descendencia desequilibrada son de gran interés y aconsejables.

5.2.2- Reorganizaciones cromosómicas complejas

Este trabajo incluye el primer estudio de segregación realizado con éxito en un portador de reorganización cromosómica compleja (CCR) utilizando el sistema de fusión heteróloga hámster-humano y la técnica de pintado cromosómico fluorescente (WCP), que permite identificar tanto los cromosomas normales como de los derivados y caracterizar de forma fiable y rápida los productos de segregación cromosómica (Cifuentes et al. 1998).

Aunque las CCR se consideraban extremadamente poco frecuentes, la reevaluación de casos previos utilizando FISH dio como resultado un incremento del número de identificaciones de CCR (Smart et al. 1989; Hertz et al. 1993; Ohta et al. 1993; Fuster et al. 1997). La combinación de las técnicas clásicas de citogenética con las moleculares ha permitido mejorar la identificación de las anomalías cromosómicas.

Las reorganizaciones complejas son producto de la reparación anómala de más de tres roturas. Aunque la mayoría de CCR son de *novο*, en el caso de este estudio ($t(2;11;22)(q13;q23;q11.2)$) fue heredada a lo largo de al menos tres generaciones, y aunque no se ha podido determinar el origen si se ha podido seguir hasta la abuela paterna. Esta CCR puede tener su origen en la coincidencia de dos translocaciones recíprocas, ya que las roturas producidas en los cromosomas 11 y 22 coincide con los puntos de rotura de la translocación recíproca humana más frecuente, $t(11;22)(q23;q11.2)$ (Fraccaro et al. 1980). Si se produjeran estas dos roturas coincidiendo con la presencia de una tercera rotura en el cromosoma 2, la reparación podría haberse resuelto siguiendo dos caminos. Uno que daría la translocación $t(11;22)$ más común y la restitución del cromosoma 2 (además de otros dos tipos de translocaciones recíprocas simples) o bien dos translocaciones triples diferentes, una la observada en dicho trabajo [$t(2;11)der(2)$; $t(11;22)der(11)$ y $t(2;22)der(22)$] y la otra [$t(2;11)der(11)$; $t(11;22)der(22)$ y $t(2;22)der(2)$].

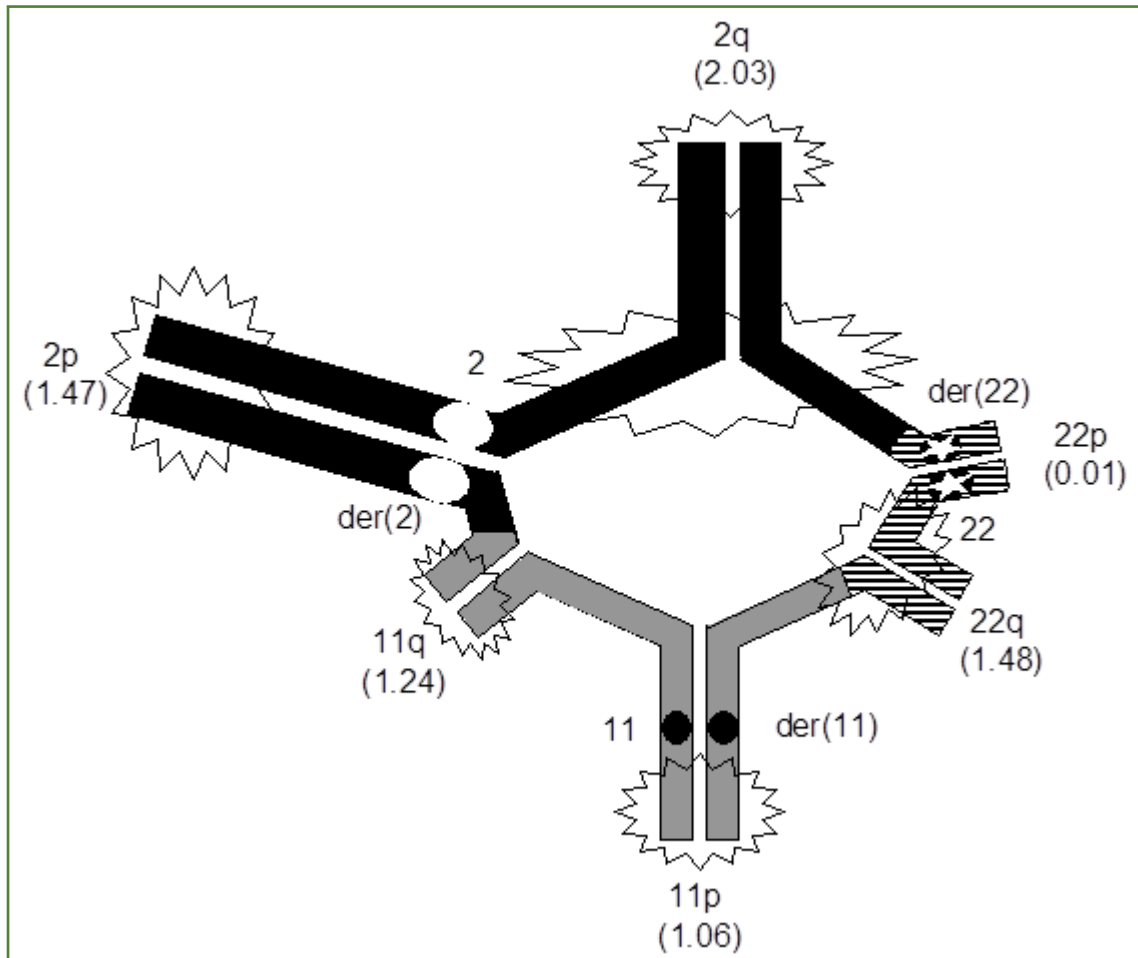
Los portadores de la translocación (11;22) con frecuencia tienen descendencia desequilibrada viable (Lockwood et al. 1989; Simi et al. 1992; Chandley 1992; Petković et al. 1996). Estos niños son trisómicos para los segmentos céntricos del cromosoma 22 (22pter-

q11) y para la porción distal del cromosoma 11(11q23-qter) que resulta de la segregación 3:1 de los dos cromosomas normales 11 y 22 y el der(22). En la familia de este estudio, la hija afecta también es trisómica para estos mismos segmentos y posee el fenotipo característico de los niños desequilibrados nacidos de portadores de la más común de las translocaciones t(11;22), pero en este caso resulta de la segregación 4:2 del hexavalente (Fuster et al. 1997).

En este estudio se encontró un gran número de productos de segregación (55 combinaciones incluyendo la normal, la equilibrada y las desequilibradas). Estos resultados tienen su mejor explicación en la formación de un hexavalente en el momento de la sinapsis en paquiteno (Fig. 6.2) aunque no se haya podido confirmar a través del estudio de los complejos sinaptonémicos ya que el paciente rechazó realizarse una biopsia testicular. Sin embargo, Saadallah y Hulten (1985) analizaron los complejos sinaptonémicos de un portador de CCR (2;4;9) y encontraron la formación de un complejo sinaptonémico hexavalente en 25 de los 26 espermatozoides estudiados.

Estudios previos de cromosomas meióticos y de espermatozoide en portadores de translocaciones recíprocas confirman la correlación que existe entre la formación de cadenas de tetravalentes y la tendencia de la segregación 3:1, así como la de la formación de un anillo tetravalente y la tendencia a la segregación 2:2 (Templado et al. 1990). En este caso la segregación 3:3 se ha observado en un 78,4% de los complementos analizados, mientras que el 21,6% resulta de la segregación 4:2 y 5:1. En realidad, la hija afecta del portador de la CCR de este estudio posee un cariotipo resultante de una segregación 4:2 con migración hacia el mismo polo del derivativo del cromosoma 2, cromosoma 11 normal, cromosoma 22 normal y derivativo del cromosoma 22, con los dos centrómeros homólogos del cromosoma 22 en el producto de segregación. Este, justamente, es el tipo de complemento más frecuente, correspondiente a la segregación 4:2, observado en el presente estudio (7 de 43; 16,3%).

Figura 5.2 Hexavalente de meiosis I. Regiones de alta recombinación y frecuencia media de quiasmas para cada brazo cromosómico según indicaron Laurie y Hulten (1985 a y b).



Supuestamente el hexavalente se abriría y probablemente, por 22p.

En este estudio también se han encontrado 18 complementos con disomía para los cromosomas implicados en la reorganización. Los diferentes tipos de disomía observadas pueden verse en la Tabla 4.2. En cinco casos incluían los dos centrómeros del cromosoma 2, en otros cinco casos los dos centrómeros del cromosoma 11 y en ocho casos los dos centrómeros del cromosoma 22. El origen de estos complementos puede ser explicado por una segregación 4:2 seguido de la no disyunción en metafase II, o mediante la presencia de un quiasma en el segmento intersticial del hexavalente seguido de una segregación 3:3. En tres complementos (aquellos derivados de una segregación 4:2 o 5:1) la disomía solo puede haberse originado a través de la no disyunción en meiosis II. En los otros casos tanto por la longitud del segmento intersticial, que es suficientemente largo como para permitir la formación de un quiasma, como por el hecho de que la segregación 4:2 es la más frecuente en este portador (20,7%) además de que la no disyunción en meiosis II es más frecuente en los gametos masculinos, no se pudo descartar nada de lo hipotetizado (Antonarakis et al. 1992).

Los resultados obtenidos tras los estudios de cromosomas de pronúcleo masculino en este portador de CCR indican que el riesgo teórico de descendencia desequilibrada es del 86,5%. Este riesgo es compatible con la formación de un hexavalente y es mayor que la frecuencia de productos desequilibrados observada en portadores de translocaciones recíprocas simples (Benet et al. 2005). Sin embargo, en portadores de dos translocaciones recíprocas independientes, Burns et al. (1986) y Ferfour et al. (2013) encuentran un 86,3% y un 85,9% de gametos desequilibrados respectivamente. Estos resultados indican que el riesgo de producir descendencia desequilibrada no depende solo de la longitud de los segmentos translocados, la localización de los puntos de rotura y las características de la recombinación que se pueda dar en los segmentos translocados, sino también del número de cromosomas implicados en la reorganización. Recientes estudios en portadores de CCR han encontrado frecuencias de espermatozoides con productos de segregación desequilibrada similares a los de este primer trabajo (88,3% Godo et al. 2013 y 69,4% Pellestor et al. 2011, entre otros).

5.2.3- Translocaciones Recíprocas

En el presente trabajo se aportan resultados concluyentes relativos a la segregación cromosómica meiótica en tres sujetos portadores de translocación recíproca: $t(9;17)(p13;q21.3)$, $t(9;17)(q12;p12)$ y $t(5;7)(q13;q32)$ analizando cromosomas de pronúcleo masculino y aplicando sondas fluorescentes de pintado cromosómico (WCP) (Tabla 3.2).

Los resultados obtenidos demuestran que la estrategia usada y las sondas aplicadas para la caracterización de los cromosomas normales y derivados es muy adecuada y eficiente permitiendo caracterizar la segregación en un número muy considerable de espermatozoides (651 complementos de tres portadores equilibrados) (Tabla 3.2). Excepto la segregación 4:0 todas las demás tipologías de segregación se han observado en las tres reorganizaciones estudiadas como se indica en la Tabla 5.2a como (Cifuentes, et al. 1999a; Cifuentes, et al. 1999b) aportadas en el presente trabajo.

Se aporta en este apartado (Fig. 5.3a y 5.3b) las figuras meióticas de apareamiento en paquiteno, es decir los tetravalentes correspondientes, que conforman los cromosomas respectivos involucrados (normales y derivados). Así mismo se incluye también en dicha figura la incidencia de recombinación previsible en base a estudios básicos previos, presencia y localización de quiasmas, realizados sobre extensiones cromosómicas de espermatozoides en MI (Laurie y Hulten 1985 a y b; Codina-Pascual et al. 2006).

En relación a si la producción de gametos normales, equilibrados o desequilibrados en portadores de translocaciones recíprocas depende de la localización de los puntos de rotura y las características de los cromosomas implicados (longitud, presencia o ausencia de heterocromatina, la formación de quiasmas) (Hultén et al. 1974; Burns et al. 1986; Jalbert y Sele 1979; Martin 1989) se analizan conjuntamente los resultados presentados en este trabajo y los distintos casos publicados, (Tabla 5.2.a). Existe un predominio del modo de segregación 2:2, correspondiendo principalmente a los tipos alternante y adyacente 1 como se observa en aquellas translocaciones que producen configuraciones en anillo (Templado et

al. 1990). La incidencia de la segregación 3:1 (Templado et al. 1990) está directamente relacionada con la formación de una configuración abierta, como una cadena. La segregación 4:0 rara vez ha sido descrita en los estudios realizados en cromosomas de pronúcleo masculino (Burns et al. 1986; Benkhalifa et al. 1994; Estop et al. 1995) y sus productos no han sido encontrados nunca en recién nacidos. Estudios de FISH en núcleos descondensados de espermatozoides no pueden en general, diferenciar entre los productos de segregación 4:0 y espermatozoides diploides porque el número de sondas utilizadas se limita a los cromosomas implicados en la translocación. Recientemente y mediante una adecuación que permite aplicar varias rondas de FISH de forma secuencial sobre el mismo núcleo descondensado de espermatozoide, se ha podido observar que espermatozoides, presuntamente diploides según análisis de aneuploidía, son en un elevado porcentaje diploides múltiples, sugiriendo así, que la incidencia de diploidía puede estar sobreestimada (Godo et al. 2015).

Hasta el momento, incluyendo los sujetos de este estudio, han sido estudiadas un total de 45 translocaciones recíprocas utilizando el sistema hámster-humano, y se ha confirmado los valores de frecuencias para los distintos tipos de segregación indicadas en el párrafo anterior. La mayoría de segregaciones son del tipo 2:2, con unas frecuencias medias de 46,1% para la segregación alternante y 36,1% para la adyacente 1 (Tabla 5.2a) Además, estudios epidemiológicos (Jalbert et al. 1988) indican que muchos casos de descendencia desequilibrada, esta resulta de segregación adyacente 1. Esto no es inesperado (Martin 1989; Pellestor et al. 1989) por que la segregación adyacente 2 y 3:1 combinan una segregación anormal y una no disyunción de centrómeros homólogos, y otros que pueden estar relacionados con problemas en la resolución de los quiasmas en la configuración del tetravalente (Van Hummelen et al. 1997). El riesgo promedio de producir descendencia desequilibrada se ha establecido en 54,4% (Pellestor et al. 1989) que es compatible con lo obtenido para los sujetos de este estudio (48,1-50,3%). Sin embargo, estas frecuencias son mucho más altas que las observadas en nacimientos (Boué y Gallano 1984) que en gran parte se deben a las dificultades de evaluación en el momento de la concepción comparado con el momento del nacimiento. Cada estimación tiene su valor y no se deben confundir.

Se ha descrito otro caso de translocación que, como uno de los portadores de este trabajo, afecta a los cromosomas 5 y 7 (Estop et al. 1995) con puntos de rotura diferentes entre ellas (Fig. 5.3). En su caso, la translocación $t(5;7)(q13;p15,1)$ muestra unos tipos de segregación diferentes a los obtenidos en el caso aportado en el presente trabajo (Tabla 5.2a). Considerando los puntos calientes para la formación de quiasmas (Laurie and Hulten, 1985 a y b) las diferencias observadas entre estos casos podrían ser explicadas por la probable formación de quiasmas intersticiales en el sujeto de este estudio ($t(5;7)(q21;q32)$) y la probable ausencia de ellos en el otro caso ($t(5;7)(q13;p15,1)$) (Fig 6.3).

Por otra parte en el presente trabajo se aportan datos de dos sujetos portadores de translocaciones $t(9;17)$ con distintos puntos de rotura, ($t(9;17)(q12;p12)$ y $t(9;17)(p13;q21,3)$), cuyas frecuencias de tipologías de segregación son muy similares (Tabla 4.6 y 4.8). Esta similitud podría explicarse analizando las figuras de los tetravalentes que forman en paquiteno. La posición y distribución de las regiones calientes para la formación de quiasmas en el tetravalente en ambos casos concuerda con la formación de una figura en anillo con un comportamiento meiótico y una estabilidad similar (Fig. 5.4).

También es relevante comentar, que en el caso del portador de la $t(9;17)(q12;p12)$, se observó una bajada en el rendimiento de la técnica de fusión heteróloga hámster-humano para la obtención de complementos de pronúcleo masculino. Esta bajada en el rendimiento se detectaba en el momento de la fijación de los cigotos con la observación de gran número de núcleos bloqueados en interfase. Esto impidió la obtención de un número mayor de complementos para el estudio de segregación. El cromosoma 9 implicado en esta reorganización tiene su punto de rotura en el bloque heterocromático del brazo q. En estudios de cromosomas de pronúcleo masculino se ha constatado una muy evidente descondensación de las regiones heterocromáticas de los cromosomas 1, 9, 16 e Y (Rudak et al. 1978; Martin 1983; Benet et al. 1986; Navarro et al. 1987). De forma similar también se ha observado en preparaciones cromosómicas de *corion villi* (Pérez et al. 1991). Hay diferentes hipótesis que pueden explicar el hecho de la alta descondensación de estos

bloques heterocromáticos y el nivel de hipometilación asociado, en ellas se propone que pueden existir en estas regiones

Figura 5.3 Figura del tetravalente en meiosis I a) para la $t(5;7)(q21;q32)$ y b) para la $t(5;7)(q13;p15,1)$. Se indican las regiones de alta recombinación y la frecuencia media de quiasmas según Laurie y Hulten (1985 a y b).

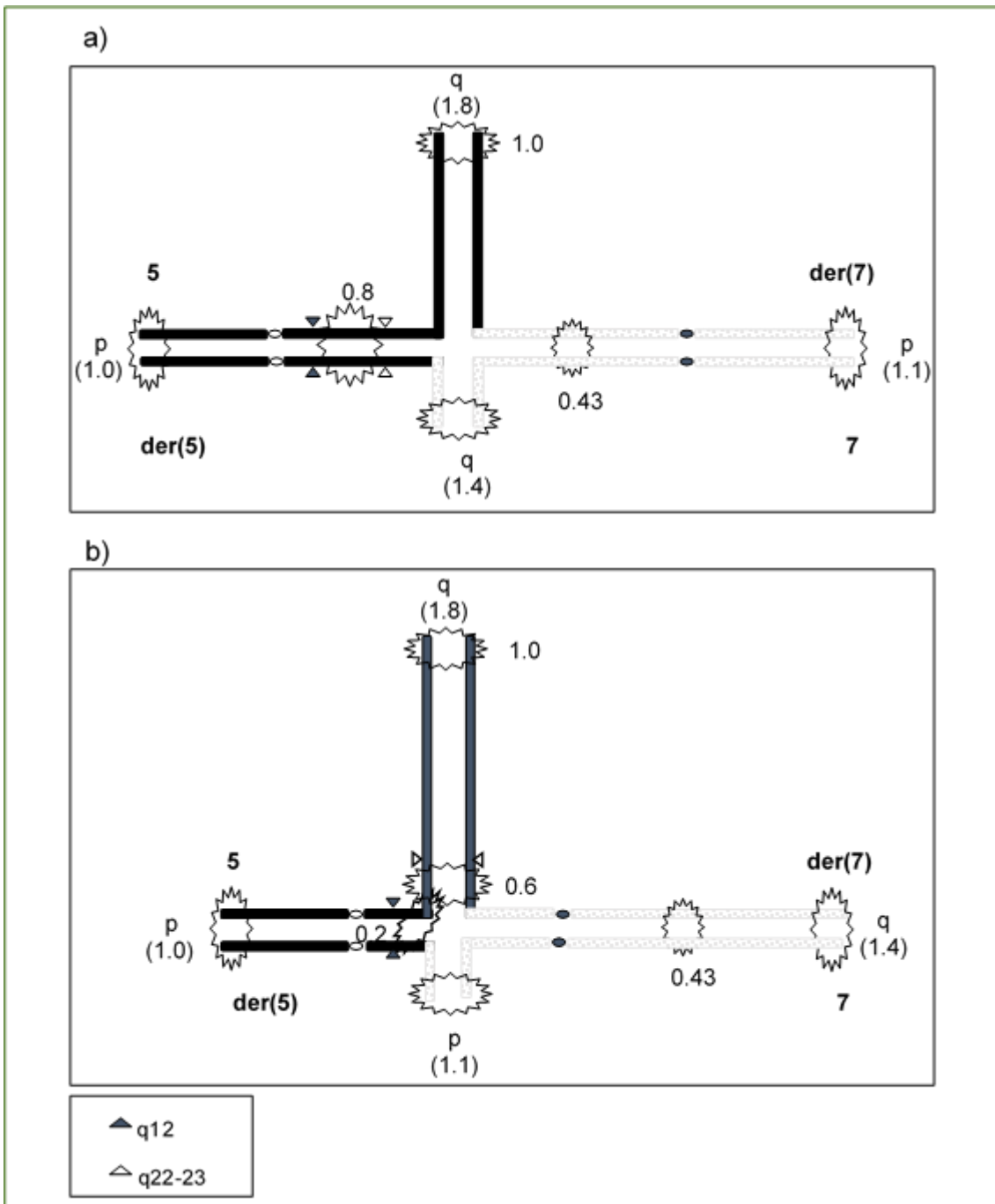


Tabla 5.2.a Resultado de segregación para portadores de diferentes translocaciones recíprocas estudiados en cromosomas de pronúcleo masculino

Translocación	BANDA		Quiasmas		Edad	Numero de celulas	Total Equi (%)	Patrón de segregación				Total desequi (%)	Técnica	References	
	ROT		fqiA (%)	fqiB (%)				Altermante N(%)	E(%)	Adj-1 (%)	Adj-2 (%)				3:1 (%)
t(1;2)(q32;q36)	C		89	100	32	105	40,9	23,8	17,1	41,9	5,7	11,4	59	G-Band	Templado et al.; 1990
t(1;4)(p36.2;q31.3)	C		100	81	40	90	39	20	19	50	7,7	3,3	61	G-Band	Estop et al., 1992
t(1;4)(p36.2;q31.3)	C		100	81	38	115	46	31,3	14,7	38,2	6,9	8,7	53,8	G-Band	Estop et al., 1992
t(1;9)(q22;q31)	B		57	37	31	173	45,6	27,7	17,9	37,6	13,3	3,5	54,4	Q-Band	Martin, 1992
t(1;11)(p36.3;q13.1)	A		100	0	29	548	33,2	15,9	17,3	42,9	15,9	8	66,8	Q-Band	Spriggs et al., 1992
t(1;13)(q41;q22)	C		100	86	n.a.	255	41,3	24,4	16,9	41,6	14,5	2,3	58,4	FISH	Oliver-Bonet et al., 2002
t(2;3)(q24;p26)	B		100	100	30	83	55,4	30,1	25,3	36,1	7,2	1,2	44,5	Q-Band	Martin, 1994
t(2;5)(p11;q15)	C		0	47	26	75	20 (42,7b)	9,3 (b)	10,7 (b)	9,3	5,3	21,3	35,9	G-Band	Templado et al.; 1988
t(2;9)(q21;p22)	A		53	0	36	208	43,3	25	18,3	28,4	24,1	4,3	56,8	Q-Band	Martin et al., 1990b
t(2;17)(q35;p13)	A		100	97	36	18	56	50	6	33	11		44	G-Band	Jenderny., 1992
t(2;18)(p21;q11.2)	A		47	9	33	165	41,9	16,4	25,5	35,2	14,4	8,4	58	G-Band	Estop et al., 1995
t(3;7)(q25;q36)	A		62	63	n.a.	68	27,9	16,2	11,7	45,6	19,1	7,4	72,1	R-Band	Benkhalfa et al., 1994
t(3;8)(q13;p21)	C		0	0	29	73	34,2	27,4	6,8	43,8	20,5	1,4	65,7	G-Band	Jenderny., 1992
t(3;11)(q25.3;q25)	A		63	100	24	262	47,7	24,4	23,3	45,8	5,7	0,8	52,3	Q-Band	Martin and Hulten ,1993
t(3;15)(q26.2;q26.1)	A		62	100	37	50	48	22	26	36	12	2	52	G-Band	Estop et al., 1995
t(3;16)(p23;q24)	A		37	95	25	201	37,3	19,9	17,4	41,3	16,4	5	62,7	Q-Band	Brandriff et al., 1986
t(3;19)(p21;p13.3)	A		37	45	n.a.	128	39,2	18	21,2	35,9	21,8	3,2	60,9	FISH	Oliver-Bonet et al., 2002
t(4;6)(q28;p23)	C		81	6	25	158	45,6	24,1	21,5	51,9	1,9	0,6	54,4	Q-Band	Martin et al., 1990b
t(4;8)(q28;p23)	C		45	100	31	352	35,4	19,3	16,1	33,2	19,3	11,3	63,8	FISH	Oliver-Bonet et al., 2001
t(4;12)(p11;p11)	A		0	0	n.a.	79	49,3	17,7	31,6	12,7	27,8	8,9	50,7	R-Band	Benkhalfa et al., 1994
t(4;17)(q21.3;q23.2)	A		20	8	35	60	56,7	25	31,7	35	6,6	1,7	43,3	R-Band	Pellestor et al., 1989
t(5;7)(q13;p15.1)	A		29	55	34	157	40,2	20,4	19,8	26,2	16,6	17	59,8	G-Band	Estop et al., 1995
t(5;7)(q21;q32)	C		80	40	n.a.	296	49,7	28	21,6	32,4	16,2	1,7	50,3	FISH	Cifuentes et al., 1999a
t(5;11)(p13;q23.2)	A		0	24	36	23	69,6	60,9	8,7	26,1	4,3		30,4	Q-Band	Burns et al., 1986
t(5;13)(q11;q33)	B		0	100	27	57	77,2	42,1	35,1	21,1	1,8		22,9	R-Band	Pellestor et al., 1989

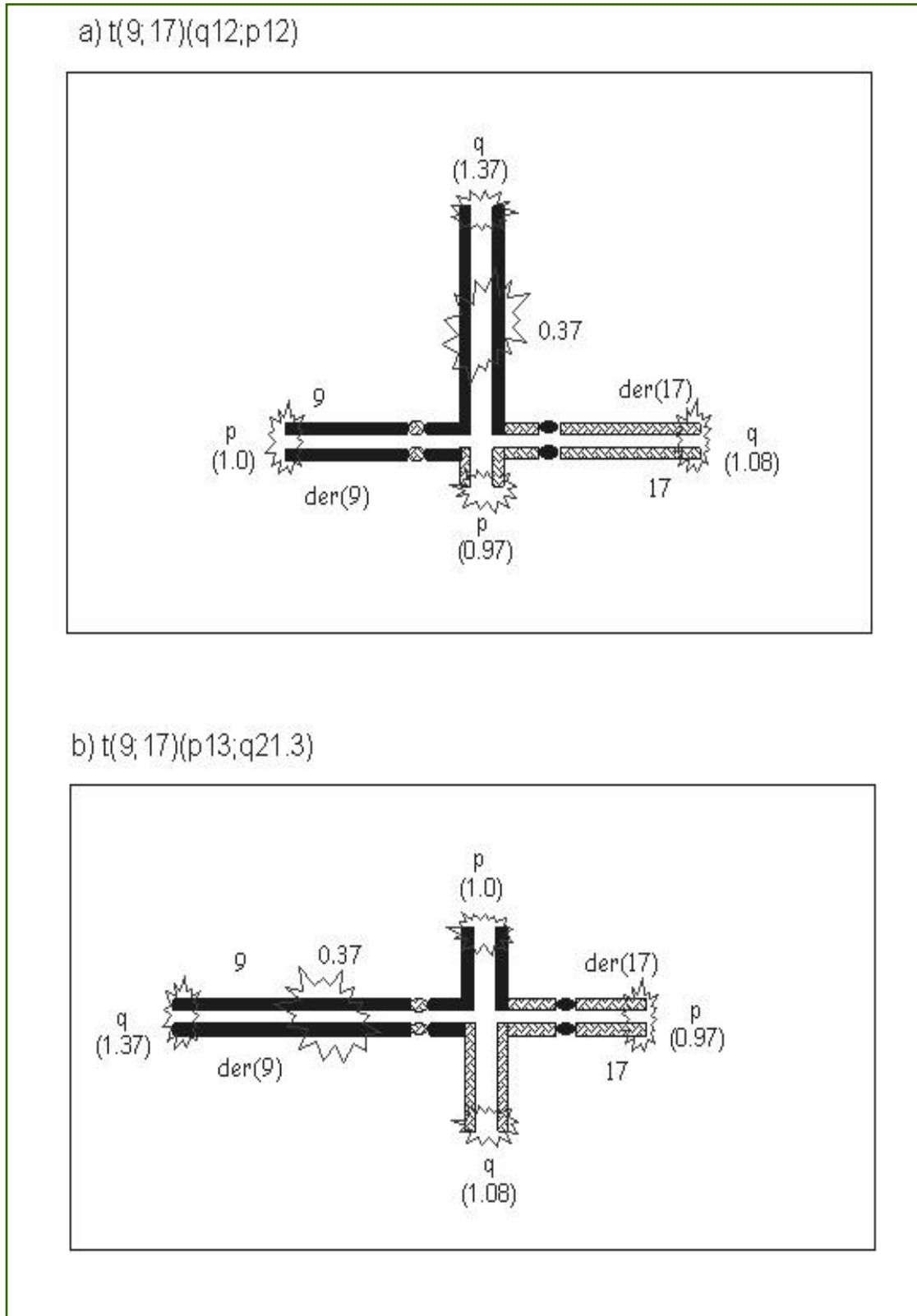
Tabla 5.2.a (continuación)

Translocación	BANDA ROT	Quiasmas		Edad	Numero de celulas	Total Equi (%)	Patrón de segregación			Total desequi (%)	Técnica	References
		fqiA (%)	fqiB (%)				Alternante E(%)	Adj-1 (%)	Adj-2 (%)			
t(5;18)(p15;q21)	A	0	0	29	31	80,7	45,2	35,5	16,1	3,2	19,3	Q-Band Balkan and Martin; 1983
t(6;7)(q27;q22.1)	A	100	43	35	84	51,2	21,4	29,8	48,8		48,8	R-Band Pellestor et al., 1989
t(6;14)(p24;q22)	C	60	91	34	19	68,4	42,1	26,3	31,6		31,6	Q-Band Balkan and Martin; 1983
t(7;9)(q32;p21)	C	43	38	34	54	44,4	22,2	22,2	37,04	12,96	55,56	R-Band Pellestor et al., 1997
t(7;14)(q21;q13)	C	25	50	36	19	55,7	31,6	24,1	31,6	15,8	47,4	Q-Band Burns et al., 1986
t(7;14)(q11;q24.1)	C	0	95	55	23	30,4	17,4	13	47,8	17,4	69,5	Q-Band Martin et al., 1990b
t(7;18)(q35;q11)	C	43	0	29	72	33,3	15,3	18	43,05	19,45	66,67	R-Band Pellestor et al., 1997
t(7;20)(q33.2;p13)	C	43	45	37	263	38,4	20,5	17,9	39,9	16,3	61,5	Q-Band Martin, 1992
t(8;15)(p22;q21)	B	0	73	31	226	37,1	19	18,1	38,1	21,2	62,8	Q-Band Brandriff et al., 1986
t(9;10)(q34;q11)	C	100	0	30	171	40,4	20,8	19,6	48,2	5,4	59,4	Q-Band Martin, 1988
t(9;13)(q21.1;q21.1)	B	0	86	33	81	46,9	25,9	21	35,8	17,3	53,1	Q-Band Martin and Spriggs 1995
t(9;17)(q12;p12)	B	0	0	n.a.	85	51,8	31,8	20	27,1	17,6	48,2	FISH Cifuentes et al., 1999b
t(9;17)(p13;q21.3)	A	37	0	n.a.	270	51,8	27,4	24,4	30,4	13,7	48,2	FISH Cifuentes et al., 1999b
t(9;18)(p12;q12.1)	B	0	4	26	82	34,1	20,7	13,4	63,4	2,4	65,8	R-Band Pellestor et al., 1989
t(10;12)(q26.1;p13.3)	A	100	45	40	72	61,1	33,3	27,8	26,3	6,9	38,8	G-Band Estop et al., 1995
t(11;17)(p11.2;q21.3)	A	0	0	24	184	38,6	21,8	16,8	32,1	26,6	61,4	Q-Band Spriggs et al., 1992
t(11;22)(q23;q11)	A	24	13	30	13	23,1	7,7	15,4	38,5	23,1	77	Q-Band Martin, 1984
t(12;20)(q24.3;q11)	C	100	0	40	113	46,8	22,1	24,7	41,6	9,7	53,1	Q-Band Martin et al., 1990a
t(15;22)(q26.1;q11.2)	A	100	0	31	147	34	21,1	12,9	39,5	22,4	66	Q-Band Martin and Hulten, 1993
t(16;19)(q11.1;q13.3)	C	0	35	39	183	39,6	18,6	21	27,9	31,4	60,5	Q-Band Martin, 1992

genes de expresión temprana que intervendrían en los estadios iniciales del desarrollo embrionario (Mitchell 1992; Martorell et al. 1997; Pendina et al. 2001). En el caso de este portador de translocación, el hecho de que el punto de rotura interrumpa el bloque heterocromático podría provocar un cambio en la actividad funcional del bloque heterocromático modificando la actividad de algún gen de expresión temprana (Ooga et al. 2013) afectando, en este caso, al desarrollo de estos cigotos heterólogos.

Existe un estudio de Denegri et al. (2002) en el que señala la importancia de la región heterocromática del cromosoma 9, banda q12, en los procesos de respuesta celular al estrés. En concreto es capaz de proveer de los mecanismos de respuesta a los procesos de estrés a las células de hámster (en híbridos hámster-humano) que están desprovistas de ellos. Además, también se ha propuesto en la literatura que tal vez estos bloques heterocromáticos, que presentan categoría de polimorfismo en la población humana, son regiones que contienen elementos o genes importantes, y que alteraciones en esta región heterocromática del cromosoma 9 intervienen en procesos asociados a infertilidad, abortos de repetición, aumento de la no disyunción de otros cromosomas o detención temprana del desarrollo embrionario en los primeros estadios del cigoto (Ford et al. 1982; Serra et al. 1990; Amiel et al. 2001)

Figura 5.4 Figura de los tetravalente en meiosis I. Se indican las regiones de alta recombinación y la frecuencia media de quiasmas según Laurie y Hulten (1985 a y b).



A lo largo de los años de estudio de individuos portadores de translocación, se ha intentado proponer un patrón predictivo del comportamiento meiótico de los cromosomas implicados en la reorganización. Hoy día se han publicado un número importante de estudios de segregación meiótica de individuos portadores de translocaciones recíprocas. Estas translocaciones han sido estudiadas con las técnicas disponibles en cada momento, siendo es el número de células analizadas en cada caso variable según el método de análisis utilizado. Los datos de segregación publicados se recogen en este trabajo en las Tablas 5.2.a y 5.2.b. En los datos publicados se constata que los eventos de menor probabilidad (segregación adyacente 2 y 3:1), presentan una variabilidad menor en los estudios de pronúcleo masculino frente a su incidencia en los estudiados en cabezas descondensadas de espermatozoide. Los estudios de FISH en cabezas descondensadas evidencian también que el incremento de la incidencia de estos eventos aumenta básicamente debido al incremento de productos que implican un número menor de señales de hibridación. Esto puede atribuirse a las limitaciones de la técnica de FISH en la que no es posible el uso de más de tres sondas ya que las señales podrían solaparse. También hay que considerar, la dificultad para discriminar los errores de hibridación, por eficiencias de hibridación distintas en cada sonda utilizada, y la imposibilidad de usar sondas control debido a impedimentos estéricos, debido a que el núcleo no descondensa suficientemente como para que las señales no se solapen.

Para abordar un posible modelo predictivo, dada la heterogeneidad de datos y previamente a su análisis, se comprobó, mediante métodos estadísticos, si la diferencia entre los grupos de casos estudiados mediante pronúcleos masculinos de espermatozoide y núcleos descondensados de espermatozoide (Tabla 5.2.a y 5.2.b), permitiría un análisis conjunto; pero las muestras resultaron ser significativamente distintas ($p=0,024$; prueba U de Mann-Whitney). Ante la imposibilidad de reunir ambos datos, se convino acotar el estudio predictivo a trabajos con un tamaño de muestra mínima. Que con una precisión de un 3% y un nivel de confianza del 95%, utilizando la fórmula del modelo estadístico para la determinación de la medida de la muestra, quedó establecida en mayor o igual a 1000 células y que incluye los trabajos de la Tabla 5.2.b.

A continuación se procedió a examinar si el comportamiento meiótico en estos individuos portadores de translocación reflejaba algún tipo de patrón consistente con la frecuencia de los procesos de no-disyunción de centrómeros homólogos (es decir si presentaba complementos del tipo adyacente 2, cualquiera de las 3:1 i a las 4:0). Se ha hipotizado, desde hace tiempo, de la existencia de diferentes factores que intervendrían en el aumento de las disfunciones meióticas en tales casos.

En el presente trabajo para este análisis, se han teniendo en cuenta dos de los factores que parecían ser los que aportarían una mayor contribución a estos fenómenos de segregación anómala (no-disyunción de centrómeros homólogos) como es de una parte la implicación o no de cromosomas acrocéntricos y la frecuencia y distribución de quiasmas en las regiones intersticiales de los tetravalentes. Para ello se ha tenido en cuenta los datos disponibles de la incidencia de quiasmas según el estudio de Laurie y Hultén (1985 a,b) y valorados también de acuerdo con los trabajos más recientes sobre complejos sinaptonémicos con métodos de inmunodetección en base a la incidencia de recombinación de Codina-Pascual et al (2006). Los datos se agruparon en cuatro grupos. La primera agrupación sería de cromosomas acrocéntricos implicados en la reorganización frente a no acrocéntricos implicados. Y cada uno de estos grupos se subdividió según la figura meiótica tuviera una incidencia equivalente de recombinación meiótica en ambas regiones intersticiales del tetravalente o no. La figura del tetravalente sería equilibrada, según la distribución y tasa de quiasmas en cada segmento céntrico o no: una figura más equilibrada sería aquella que tuviera un valor igual o muy similar de frecuencia de quiasma en ambos regiones intersticiales del tetravalente, segmentos céntricos, y no equilibrada, aquella que tuvieran frecuencias de quiasma muy diferentes en cada región intersticial del tetravalente (columnas fq A y fq B de las Tablas 5.2.a y 5.2.b; siendo fq A la frecuencia esperada de quiasma en la región intersticial del tetravalente del cromosoma A y fq B la frecuencia esperada de quiasma en la región intersticial del tetravalente del cromosoma B)

La no-disyunción de homólogos, en las translocaciones recogidas en la literatura, oscila entre valores del 2,3% y 62%, con un promedio del 32,15%. Los análisis estadísticos de la

incidencia de no disyunción entre homólogos realizada en los grupos en los que uno de los cromosomas translocado es un cromosoma acrocéntrico, y en los que ninguno de los cromosomas era acrocéntricos, no mostró diferencias significativas ($p=0,504$ y $p=0,587$ respectivamente, test χ^2); de modo que, ni la frecuencia de quiasmas ni la de recombinación en la región intersticial, se podría decir, que no son los factores de mayor peso para condicionar los eventos de no-disyunción. En este sentido estos resultados difieren de los obtenidos en ovocitos de mujeres portadoras de translocaciones recíprocas equilibradas, valorando la incidencia de no-disyunción y la presencia de lugares calientes de recombinación (MLH1) por Durban et al. (2001). En dicho estudio se obtuvo una alta correlación positiva ($r=0.8698$, aplicando correlación de Pearson) entre los lugares calientes de recombinación y la no-disyunción entre dichos cromosomas homólogos. Tal vez el número de células analizadas (9-17) en un total de 5 casos recopilados de la literatura, sea una muestra tan distinta, que justificaría esta disparidad de resultados, sin descartar la posible diferencia de comportamiento meiótico ente géneros.

En relación a si la presencia de un cromosoma acrocéntrico en una reorganización recíproca es un factor determinante para generar no disyunción de cromosomas homólogos, la comprobación estadística evidencia que este hecho no es determinante ya que no se observan diferencia significativas en la incidencia de no disyunción de cromosomas homólogos comparado dicha incidencia en casos de reorganizaciones con cromosomas acrocéntricos versus las que ninguno de los cromosomas es acrocéntrico ($p=0.9542$, test χ^2). De hecho la no-disyunción de cromosomas homólogos, en las traslaciones recogidas en la literatura para los cuatro grupos analizados oscila entre valores extremos en cualquiera de ellos. Por lo tanto, con los datos que hasta el momento se recogen en la literatura, no es posible establecer claramente un patrón de comportamiento en la segregación de los translocaciones recíprocas, ya que son múltiples los factores a tener en cuenta. Incluso factores epigenéticos que de algún modo intervienen en la selección de aquellos gametos con cargas más compatibles con la vida, ya que los estudios realizados en preembriones y nacimientos inciden en la importancia de los eventos de no-disyunción.

En definitiva, cada individuo portador de translocación tendría un riesgo particular, que dependería de cómo los distintos y múltiples factores estructurales de la reorganización intervienen en la segregación meiótica, sin olvidar posibles factores epigenéticos (Feinberg y Fallin 2015). Por este motivo es de gran importancia y altamente aconsejable realizar en dichos casos, estudios de diagnóstico prenatal y preimplantacional para así evitar descendencia afectada.

Tabla 5.2.b Resultado de segregación para portadores de diferentes translocaciones recíprocas estudiados en núcleos

Translocación	Quiasmas		Banda ROT	Edad	Número de células	Total	Patrón de segregación					Total Desequi	Técnica	Referencias
	fqIA (%)	fqIB (%)					Adj-1 (%)	Adj-2 (%)	3:1 (%)	4:0 (%)	otros (%)			
t(1;2)(q32.1;q11.2)	89	0	A	30	± 1000	31,6	24,6	13,5	27,4	0,1	2,8	68,4	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(1;2)(q25;q23)	89	30	A	n.a.	996	56	38,8	0,2	4,6	0		43,6	Cep/Tel/Tel	Brugnon et al., 2006
t(1;2)(q42;q21)	45	34	A	n.a.	1008	45,7	40,5	4,6	9	0,2		54,3	Cep/Tel/Tel	Brugnon et al., 2006
t(1;3)(p32.1;q29)	98	100	A	30	± 1000	47,1	34,1	8,7	9,7	0,1	0,4	52,9	Cep/Tel/Cep	Vozdova et al., 2013
t(1;6)(q44;p11)	100	0	C	46	± 1000	42,5	32,6	10,1	13,2	0	1,6	57,5	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(1;6)(p22;p21.3)	32	0	A	n.a.	1006	37,4	43,1	7,7	10,7	0	1,1	62,6	Cep/Cep/Tel	Escudero et al., 2003
t(1;7)(p32;q22)	98	22	A	28	± 1000	48,5	27,9	6	14,4	0,2	3	51,5	Cep/Tel/Cep	Vozdova et al., 2013
t(1;8)(q33.2;q24.1)	89	32	A	n.a.	9956	84,9		7,1	7,1	1,7	0,1		Cep/Cep	Prigent and Viguié 1996
t(1;10)(p22.1;q22.3)	37	48	A	40	4036	48,1	42,5	4,9	3,9	0,3	0,4	52	Cep/Cep/Tel	Van Hummelen et al., 1997
t(1;11)(p36.3;q13.1)	98	0	A	29	13071	82,5		8,3	9,2	0,06	0		Cep/Cep	Spriggs and Martin 1994
t(1;11)(q12;q13)	0	0	C	37	648	51,2	21,8	16,7	8	0	2,4	48,9	Cep/Tel/Tel	Anton et al., 2008
t(1;11)(p36.3;q12.2)	98	0	C	34	3151	40,4	37,5	5,4	11,3		5,4	59,6	LSI/LSI/BACs	Midro et al., 2014
t(1;13)(q24;q10)	60	0	B	n.a.	124	37,1	34,7	11,2	15,2	0,8		61,9	Cep/Tel/Tel	Yakut et al., 2006
t(1;13)(q42;q14)	89	22	A	33	± 1000	47,5	33,9	6,3	10,7	1,1	0,5	52,5	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(1;13)(q42.12;q32.2)	89	86	A	n.a.	1005	37	29	8,2	23,3	0	2,6	63,1	Cep/Tel/LSI	Escudero et al., 2003
t(1;14)(q44;q22)	100	45	A	29	± 1000	41,3	36,8	13,6	7,3	0,2	0,7	58,6	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(1;16)(q21;p11.2)	0	0	A	34	1027	38,4	20,8	19,9	20	1		61,7	Cep/Tel/LSI	Ferfourri et al., 2013
t(1;17)(q31;p12)	89	0	B	n.a.	2036	49,1	34,4	8,5	7,3	0,3	0,4	50,9	Tel/Tel/Cep	Perrin et al., 2010
t(1;17)(p11;q11)	0	0	B	41	1575	53,7	38	7	0	0	1,3	46,3	Cep/Tel	Kekesi et al., 2007
t(1;18)(p36;q21)	98	9	A	n.a.	1000	29,2	9,2	16,6	43,2	0	1,8	70,8	Cep/Tel/Tel	Escudero et al., 2003
t(2;6)(q35;q24)	100	55	C	38	5039	41,1	38,54	9,3	10,7	0,12	0,3	58,91	LSI/Tel/BACs	Perrin et al., 2010b
t(2;6)(q37;p21)	100	3	A	37	1005	39,5	33,8	12,2	13,6	0	0,8	60,4	Cep/Tel/Tel	Anton et al., 2008
t(2;6)(p12;q11.2)	0	0	B	n.a.	7000	49,9	42,4	2,5	4,2	0	0	49,1	Cep/Tel/Tel	Lim et al., 2003
t(2;7)(p13;q32)	12	43	A	30	± 1000	36,1	26,2	9,3	21	3,5	3,8	63,8	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(2;7)(p13;q34)	12	43	A	30	± 1000	42	34	9,5	12,4	0,5	1,4	57,8	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(2;7)(q31;q34)	100	43	A	33	± 1000	30,8	25	12,3	28,5	0,1	3,3	69,2	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013

Tabla 5.2.b (continuación)

Translocación	Quiasmas		Banda ROT	Edad	Número de células	Total Equi (%)	Patrón de segregación				Total Desequi	Técnica	Referencias	
	fqiA (%)	fqiB (%)					Adj-1 (%)	Adj-2 (%)	3:1 (%)	4:0 (%)				otros (%)
t(2;7)(p11.2;q22)	28	43	A	43	??	34,2	33,2	14,9	12,7	0	5	65,8	Cep/Tel/Tel	Wiland et al., 2008
t(2;8)(q21;q22)	43	32	A	30	± 3000	45,7	18,6	4,6	27,1	0	4	54,3	Cep/Tel/Tel	Olszewska et al., 2013
t(2;10)(q13;q24.3)	15	48	A	27	± 3000	49,3	28	2,9	18,4	0	1,4	50,7	Cep/Tel/Tel	Olszewska et al., 2013
t(2;11)(q35;q14)	100	0	C	34	3300	48,8	16,9	7,6	25,6	1,1		51,2	Tel/Cep/Tel	Nshikawa et al., 2007
t(2;14)(p23.1;q31)	47	91	C	32	4610	80		5,2	5,8	0	9		Cep/LSI	Rousseaux et al., 1995
t(2;18)(p21;q11.2)	47	9	A	33	3139	43,6	29,8	10,5	12,8	0,5	2,8	56,4	Cep/Cep/LSI	Estop et al., 1998
t(2;18)(q11.2;q21.1)	0	0	A	n.a.	1079	31,1	28,8	16	24,2	0	0	69	Cep/Tel/Tel	Escudero et al., 2003
t(2;20)(q24.1;q13.1)	0	0	C	37	815	90,7		5,2	4	0	0		Cep/Cep	Trappe et al., 2002
t(2;20)(q24.1;q13.1)	0	0	C	37	801	51,7 ^b	48,2	a	3,8	0	0		Tel/Tel	Trappe et al., 2002
t(2;22)(q33;p11)	100	0	C	n.a.	1026	53,9	43,8	0,3	2	0		46,1	Cep/Tel/Tel	Brugnon et al., 2006
t(3;4)(q12;p15.2)	31	0	A	n.a.	1000	23,9	14,7	24,5	34,2	0	2,7	76,1	Cep/Tel/Tel	Escudero et al., 2003
t(3;4)(p25.2;q25)	37	27	A	30	± 1000	45,8	33,2	14,5	6,2	0,2	0,1	54,2	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(3;5)(q27;p15)	62	0	A	30	± 1000	50,8	26,9	12,9	7,8	0,4	1,2	49,2	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(3;6)(p24;p21.2)	37	0	B	27	1054	38,8	28	12,3	19,3		1,6	61,2	Cep/Cep/Tel	Ferfour et al., 2012
t(3;6)(q21;q23)	20	55	A	30	2002	46,8	26,07	13,63	8,5	0,45	4,5	53,19	Cep/Cep/Tel	Mokanski et al., 2012
t(3;8)(q22;q23)	25	32	B	n.a.	1788	34,4	35,8	15	13,9	0,2	0,7	65,6	LSI/Cep/Tel	Perrin et al., 2010
t(3;9)(q27;q22.3)	63	37	A	28	± 3000	57	29,7	1	11,9	0	0,3	42,94	Cep/Tel/Tel	Olszewska et al., 2013
t(3;9)(p25;q32)	37	37	A	34	10278	47,2	42	14,7	4,5	0,2	0,3	61,7	Cep/Cep/Tel	Honda et al., 1999
t(3;9)(q26.2;q32)	62	37	A	32	10022	52,5	35,9	5,4	5,9	0,14	0	47,38	Cep/Cep/Tel	Honda et al., 1999
t(3;10)(q23;q24.1)	30	48	A	25	3255	54	17,1	11,5	17,5	0,4		46,5	Tel/Cep/Tel	Nishikawa et al., 2008
t(3;11)(q27.3;q24.3)	63	24	C	33	4029	44,3	15,8	6,6	28,9	0,8	3,6	55,7	Cep/LSI/LSI	Martini et al., 1998
t(3;12)(p14;q24.3)	15	52	C	n.a.	1000	41,3	3,7	18,4	34,8	0	1,8	58,7	Cep/Tel/Tel	Escudero et al., 2003
t(3;13)(q27;q11)	63	0	C	n.a.	546	34,4	22,7	22,3	16,3	0,4	3,9	65,6	LSI/Tel/LSI	Perrin et al., 2010
t(3;14)(q25;q32)	63	91	A	n.a.	500	30,2	31,8	25,2	12,2	0	0,6	69,8	Tel/Tel/Tel	Godó et al., 2013
t(4;5)(p15.1;p12)	2	0	B	35	>3500	34,4	24,6	15,5	20,1	0	5,4	65,6	Cep/Tel/Tel	Wiland et al., 2007
t(4;5)(p15.1;p12)	2	0	B	65	>3500	34,8	23,1	17,1	19,7	0	5,3	65,2	Cep/Tel/Tel	Wiland et al., 2007
t(4;5)(p15;q12)	30	0	B	n.a.	1062	45,6	25,7	19,2	8,1	0,5	0,9	54,4	Cep/LSI/LSI	Perrin et al., 2010

Tabla 5.2.b (continuación)

Translocación	Quiasmas		Banda Edad	Numero de celulas	Total Equi (%)	Patrón de segregación					Total Desequi (%)	Técnica	References	
	fqiA (%)	fqiB (%)				ROT	Adj-1 (%)	Adj-2 (%)	3:1 (%)	4:0 (%)				otros (%)
t(4;6)(q34;q16.1)	81	18	B	n.a.	583	39,6	40,2	7,5	12,2	0,5	0	60,4	Tei/Tel/Cep	Perrin et al., 2010
t(4;6)(q33;q27)	81	100	A	30	± 1000	51,9	29,6	6,2	8,9	0,3	3,1	48,1	Cep/Tel/Cep	Vozdova et al., 2013
t(4;6)(q31.1;p25)	81	100	A	25	1050	54	33,6	0	12,2	0	0,2	46	Tel/Tel	Kekesi et al., 2007
t(4;7)(q27;p14)	81	0	C	38	1004	40,4	39,7	10,1	9,2	0	0,6	59,6	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2012
t(4;7)(q27;p14)	81	0	C	36	± 1000	42,1	40,3	8,6	8,8	0,1	0,2	58	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(4;7)(q31.1;q32)	81	43	A	40	1046	45,3	38	9,8	6,1	0	0,5	54,7	Cep/Tel/Tel	Anton et al., 2008
t(4;8)(q35;p11.2)	100	0	A	36	± 1000	50,3	28,9	9,7	8,5	0	2,6	49,7	Cep/Tel/Cep	Vozdova et al., 2013
t(4;8)(q28;p23)	45	100	C	31	6590	30,5	28,5	20,5	19,5	0	0	68,5	Cep/Tel/Tel	Oliver-Bonet et al., 2001
t(4;10)(p16.1;p11.1)	99	0	C	30	1010	40,1	28,9	15,2	12,8	0,4	2,6	59,9	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2012
t(4;10)(q35;q23.2)	100	48	A	27	± 3000	60,6	17,6	4	16,3	0	1,5	39,4	Cep/Tel/Tel	Olszewska et al., 2013
t(4;11)(q35;q13)	100	0	A	n.a.	1000	33	30	4	32	1		67	Cep/Tel/Tel	Brugnon et al., 2006
t(4;11)(q33;p11.2)	81	0	A	23	± 1000	45,5	30,8	6	13,8	0,2	3,7	54,5	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(4;16)(p13;q21)	0	0	B	33	± 1000	51	34	12,1	2,5	0,1	0,3	49	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(4;18)(q31.1;p11.2)	81	0	A	n.a.	1049	46,4	41,3	2	10,3	0		53,6	Cep/Tel/Tel	Brugnon et al., 2006
t(4;18)(q33;q22.3)	81	9	C	35	± 3000	57,7	34,5	1,3	5,3	0	1,2	42,3	Cep/Tel/Tel	Olszewska et al., 2013
t(5;8)(q35.1;p11.2)	100	0	A	54	2531	47,7	34,5	9,6	7	0,1	1,2	52,4	Cep/LSI/LSI	Anton et al., 2008
t(5;8)(p14;q22)	0	32	C	n.a.	799	42,1	32,2	11,6	10,8	1,6	1,8	58	Cep/LSI/LSI	Godó et al., 2013
t(5;8)(q33;q13)	81	0	A	n.a.	508	40,2	39	3,3	14,6	2	1	59,9	LSI/LSI/CEP	Godó et al., 2013
t(5;8)(q33;q13)	81	0	A	42	9994	45,1	38,3	7	6,6	1,2	1,8	54,9	Cep/LSI/LSI	Anton et al., 2008
t(5;8)(q33;q13)	81	0	A	42	10344	45,1	38,3	7	6,6	1,2	1,8	54,9	Cep/LSI/LSI	Blanco et al., 1998
t(5;9)(p15.1;q22.1)	0	37	A	33	± 1000	52,5	34,8	8	4,4	0,3	0,2	47,7	Tei/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(5;15)(q35;q26.2)	100	100	A	34	± 1000	48,4	46,7	2,3	1,6	0,7	0,4	51,7	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(5;15)(q35;q22)	100	46	A	n.a.	1032	45,9	44,1	0,7	8,3	0	1	54,1	Cep/Tel/Tel	Escudero et al., 2003
t(5;17)(q31;p13)	81	97	A	34	1453	45,1	37	14,6	3,2	0,1	0	54,9	Cep/Tel/Tel	Anton et al., 2008
t(5;19)(q15;p12)	27	0	C	33	± 1000	50	13,7	14,6	19,4	0	2	49,7	Tei/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(6;7)(q25;q34)	55	43	A	34	1003	50	40,2	5,9	3,3	0,3	0,4	50,1	Cep/Tel/Cep	Vozdova et al., 2012
t(6;8)(q26;p12)	55	0	B	n.a.	502	45,8	37,8	10,4	4,4	0,8		54,2	Cep/Tel/LSI	Godó et al., 2013

Tabla 5.2.b (continuación)

Translocación	Quiasmas		Banda ROT	Edad	Número de células	Total Equi (%)	Patrón de segregación				Total Desequi (%)	Técnica	Referencias	
	fqjA (%)	fqjB (%)					Adj-1 (%)	Adj-2 (%)	3:1 (%)	4:0 (%)				otros (%)
t(6;9)(p12;q13)	0	0	C	n.a.	1015	23,6	14,1	40,1	21,9	0	0,4	76,5	Cep/Tel/Tel	Escudero et al., 2003
t(6;10)(p21;q26)	0	100	A	n.a.	2150	38,6	35,4	15,5	9,3	0,6	0,6	61,4	Tel/Tel/Cep	Perrin et al., 2010
t(6;11)(q14;p14)	0	0	B	34	13968	73	78	9	3	0,1	15		Cep/Cep	Rousseaux et al., 1995
t(6;11)(q14;p14)	0	0	B	44	13876	78	78	8	2,8	0,4	11		Cep/Cep	Rousseaux et al., 1995
t(6;13)(p21.1;q32)	0	86	C	n.a.	1120	39,5	31	10,3	17	0,9		59,2	ep/Tel/Tel/Te	Yakut et al., 2006
t(6;14)(q21;q13.3)	55	60	A	26	± 3000	54,9	34	3,2	5,3		2,6	45,1	Cep/Tel/Tel	Olszewska et al., 2013
t(6;14)(q24.2;q24.2)	55	91	C	30	± 1000	31,1	19,8	27,6	14,4	0,3	6,8	68,9	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(6;17)(p25;q23)	100	8	A	28	3500	40,7	24,7	11,3	22,1	1,2		59,3	Cep/Cep/Tel	Nshikawa et al., 2007
t(6;17)(p12.3;q21)	0	0	A	39	± 2000	30	16,8	8,4	44,7			69,9	Cep/Tel/Tel	Rouen et al., 2013
t(6;22)(q13;q13)	0	13	C	34	1163	46,7	33,5	16	3,4	0	0,4	53,3	Cep/Tel/LSI	Anton et al., 2008
t(7;8)(q11.21;cen)	0	0	C	30	34527	56,7	25,1	11,1	7,1	0,04	0	43,34	Cep/Cep	Mercier et al., 1998
t(7;8)(q11.21;cen)	0	0	C	n.a.	10023	63	17,6	12,8	6,5	0,3	0	37,2	Cep/Cep	Morel et al., 2004c
t(7;8)(p12;p22)	0	0	B	n.a.	2507	45,4	28,2	16,4	8,1	0,4	1,5	54,6	Tei/Cep/Cep	Perrin et al., 2010
t(7;9)(q33;p21)	43	0	B	34	10658	86	86	10,4	3	0,5	0,1		Cepb/Cepb	Pellestore et al., 1997
t(7;9)(p13;q21)	5	10	C	40	± 2000	44,8	9,3	8,2	37,7			55,2	Cep/Tel/Tel	Rouen et al., 2013
t(7;9)(p15.2;q34.1)	11	37	A	27	± 1000	46,5	39,4	7,4	5,6	0,7	0,4	53,5	Cep/Tel/Cep	Vozdova et al., 2013
t(7;10)(q21;q22)	22	48	C	n.a.	1286	51,3	27,3	12,1	7,5	1,1		48	Cep/Cep/Tel	Yakut et al., 2006
t(7;10)(p21.2;q26.13)	11	48	C	53	± 3000	62,4	19,1	2,6	14,6		1,3	37,6	Cep/Tel/Tel	Olszewska et al., 2013
t(7;10)(p21.2;q26.13)	11	48	C	24	± 3000	55,6	21,1	3,5	18,1		1,7	44,4	Cep/Tel/Tel	Olszewska et al., 2013
t(7;10)(p15.1;q23.2)	11	28	C	31	± 1000	53,6	21,9	9,5	12,5	0	2,5	46,4	Cep/Tel/Cep	Vozdova et al., 2013
t(7;10)(q34;q24)	43	32	A	28	1013	50,6	31,4	6,5	7,1	0,3	4	49,3	Cep/Tel/Cep	Vozdova et al., 2011
t(7;10)(q36;q24.3)	100	32	A	25	1014	48,1	36	10	5,4	0,2	0,3	51,9	Cep/Tel/Cep	Vozdova et al., 2011
t(7;12)(q22;q24.1)	21	52	A	30	3200	42,9	17,6	11,5	28,6	0,3		58	Cep/Cep/Tel	Nshikawa et al., 2007
t(7;12)(p13;q15)	0	25	A	28	± 1000	40,7	12,3	14,3	31,8	0,1	0,8	59,3	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(7;13)(q11.2;q21.3)	0	43	C	29	1007	32	20,2	17,2	28,8	0,5	1,3	68	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2012
t(7;13)(q34;q13)	43	0	C	36	5000	34	23,5	7,2	29,4		5,9	66	Cep/Tel/Tel	Midro et al., 2006
t(7;15)(p15.3;q26)	5	100	A	n.a.	500	37,6	4,6	5,8	51,8	0,2		62,4	Cep/Tel/Tel	Brugnon et al., 2006

Tabla 5.2.b (continuación)

Translocación	Quiasmas		Banda ROT	Edad	Número de células	Total Equi (%)	Patrón de segregación				Total Desequi	Técnica	Referencias
	fqIA (%)	fqIB (%)					Adj-1 (%)	Adj-2 (%)	3:1 (%)	4:0 (%)			
t(7;18)(q35;q11)	43	0	B	29	10462	77,2	15,9	6,6	0,4	0		Cepb/Cepb	Pellestor et al.,1997
t(7;18)(q11.23;q12.2)	0	0	A	29	± 3000	34,3	30,7	17,9	12,8	4,3	65,7	Cep/Tel/Tel	Olszewska et al., 2013
t(7;22)(q32;q12)	32	0	C	n.a.	2619	41,7	35,7	13	7,9	0,2	58,3	Cep/Tel/LSI	Perrin et al., 2010
t(8;9)(q24.2;q32)	80	37	C	39	3118	44,4	41	3,1	9,4	0,6	55,5	Cep/Cep/LSI	Estop et al.,1998
t(8;9)(q24.3;p24)	100	100	A	34	1024	36,7	22,6	20,2	19	1,5	63,3	Cep/Cep/Tel	Ferfour et al., 2013
t(8;9)(q24.3;p24)	100	100	A	32	1053	48,1	27,4	15,3	8,7	0,6	52	Cep/Cep/Tel	Ferfour et al., 2013
t(8;9)(q24.3;p24)	100	100	A	n.a.	1104	49,6	29,6	16,2	4,3	0,3	50,4	Cep/Cep/Tel	Ferfour et al., 2013
t(8;11)(q24.1;q13.1)	32	0	A	n.a.	503	50,7	40,6	3	2,6	2,8	49,4	Cep/Tel/Cep	Godo et al., 2013
t(8;13)(q22;q22)	16	57	A	29	± 1000	45,5	35	8,6	10,1	0,1	54,5	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(8;14)(q22;q32)	32	91	A	39	641	41,5	35,3	4,4	12,3	1,7	48,5	Cep/Tel/Tel	Anton et al., 2008
t(8;14)(q22;q32)	32	91	A	n.a.	500	45,6	25,6	9,2	14	2	54,4	Cep/Tel/Tel	Godo et al., 2013
t(8;18)(p22;q21)	0	0	C	n.a.	1141	48,4	29,5	16,3	5,3	0,1	51,6	Cep/Tel/Cep	Perrin et al., 2010
t(8;22)(q24.22;q11.21)	32	0	A	n.a.	1003	23	15	19	41,7	0	76,4	Cep/Tel/LSI	Escudero et al.,2003
t(9;10)(q11;p11.1)	0	0	B	25	5157	56,3	12,9	9,4	21,4	0	43,7	Cep/Cep/LSI	Rives et al., 2003
t(9;19)(q10;p10)	0	0	B	34	1054	43,5	32,4	17,8	4,7	0	56,5	LSI/Tel/Tel	Anton et al., 2008
t(9;19)(q10;p10)	0	0	B	n.a.	501	46,3	26,5	17,6	7,2	2	53,7	LSI/Tel/Tel	Godo et al., 2013
t(9;20)(p24;q13.1)	100	0	A	22	1006	37,1	29,5	25,4	7,1	0,2	62,9	LSI/Tel/Tel	Anton et al., 2008
t(9;22)(q21;q11.2)c	10	0	C	32	4124	55,9	26,14	8,9	6,2	0,6	42,14	Cep/Tel/LSI	Morel et al., 2004b
t(10;12)(q26.1;p13.3)	100	45	A	40	10049	84,3	11	4,4	0,2	0,2		Cep/Cep	Estop et al.,1997
t(10;13)(p13;p13)	0	3	C	36	1054	61,8	34,4	0,2	2,5	0,5	38,4	Cep/LSI/Tel	Anton et al., 2008
t(10;14)(q24;p11.2)	0	0	C	40	1051	56,7	38,3	1,4	2,3	0,6	43,3	Cep/Tel/Tel	Anton et al., 2008
t(10;14)(q24.2;11.2)	36	0	C	n.a.	500	50,6	38,4	2	8,6	0,2	49,8	Cep/Tel/Tel	Godo et al., 2013
t(10;14)(q24;q32)	48	100	A	n.a.	3111	44,6	38,6	11,9	4,9	0	55,4	Cep/Tel/Tel	Oliver-Bonet et al., 2004
t(10;15)(q25.2;q12)	48	0	C	30	1029	40,8	28,1	16,3	9,9	1,1	59,3	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al.,2009
t(10;15)(q26;q12)	100	0	C	32	2602	93,4	2,9	2,4	0	5,6		Cep/Cep	Baccetti et al., 2003
t(10;15)(q26;q12)	100	0	C	n.a.	n.a.	32,8	n.a	n.a.	n.a.	n.a.		Tel/Tel	Baccetti et al., 2003
t(10;15)(p14;q26)	0	100	C	n.a.	2733	43,4	37,3	10,6	8,3	0,1	56,6	Cep/Tel/Cep	Perrin et al., 2010

Tabla 5.2.b (continuación)

Translocación	Quiasmas		Banda	Edad	Número de células	Total Equi (%)	Patrón de segregación				Total Desequi (%)	Técnica	References
	fqiA (%)	fqiB (%)					ROT	Adj-1 (%)	Adj-2 (%)	3:1 (%)			
t(10;16)(q25;p12)	48	0	B	28	± 2000	47,7	25,9	9	17,4			Cep/Tel/Tel	Rouen et al., 2013
t(10;17)(q22.1;q21.3)	30	0	A	n.a.	1002	58,8	30,2	0,8	10,2	0		Cep/Tel/Tel	Brugnon et al., 2006
t(11;13)(p15.5;q22)	6	86	A	41	± 3000	55	28,9	3,8	10,3		2	Cep/Tel/Tel	Olszewska et al., 2013
t(11;17)(q13.1;p11.2)	0	0	A	n.a.	5371	40,8	26,1	25,7	7,4	0	0	Cep/Tel/Tel	Oliver-Bonet et al., 2004
t(11;18)(q23;q23)	24	100	A	27	1000	59,9	19,3	14	4,9	0	1,9	Cep/Tel/Cep	Vozdova et al., 2008
t(11;18)(q22;q21.3)	24	29	C	27	1007	44,5	28,4	10,5	10,2	0	6,8	Cep/Tel/Cep	Vozdova et al., 2008
t(11;18)(q22;q21.3)	24	29	C	53	1010	44,6	30,1	15,3	8,3	0	1,8	Cep/Tel/Cep	Vozdova et al., 2008
t(11;22)(q23;q11)	24	0	C	n.a.	1044	21,8	14,4	31,5	30,3	0	2	Cep/Tel/LSI	Escudero et al., 2003
t(11;22)(q23;q11)	24	0	C	44	1925	27,4	17,6	6,28	40,1	0,5	1,9	Cep/LSI/LSI	Estop et al., 1999
t(11;22)(q23;q11)	24	0	C	34	4058	45	29,8	15,9	8,6	0,2	0,5	Cep/Tel/LSI	Anton et al., 2008
t(11;22)(q23;q11)	24	0	C	35	3596	42,9	33,3	13,2	9,8	0,1	0,6	Cep/Tel/LSI	Anton et al., 2008
t(11;22)(q25;q12)	100	48	C	29	1012	29,1	21,2	15,1	34,6	0	0	Cep/LSI/LSI	Van Assche et al., 1999
t(11;22)(q25;q13.1)	100	100	A	28	± 1000	37,7	26,6	24,6	8,8	0,8	1,4	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(13;15)(q14.1;q26.3)	21	100	A	38	1003	50,7	41,9	4,1	3,1	0,2	0	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2012
t(13;15)(q32;p11.2)	86	0	A	35	1014	55,4	41,8	0,6	1,9	0,2	0,1	Cep/Tel/LSI	Kasikova et al., 2012
t(13;15)(q32;q26)	86	100	A	29	1000	49,5	33,9	9,1	6,5	0,6	0,4	Cep/Tel/LSI	Kasikova et al., 2012
t(13;17)(q22;q23)	86	8	A	n.a.	3082	47,3	40	7,2	4,9	0,4	0,2	Cep/LSI/LSI	Perrin et al., 2010
t(14;20)(p11.2;p11.1)	0	0	B	29	1003	51	19	21	4	0	5	LSI/Cep	Mennicke et al., 1997
t(15;17)(q21;q25)	49	100	C	32	8790d	51,2	35,3	8,9	2,8	0	1,8	LSI/Tel/Cep	Cora et al., 2002
t(15;17)(q21;q25)	49	100	C	27	d	40,4	37,7	7,9	3	0	2	LSI/Tel/Cep	Cora et al., 2002
t(15;17)(q21;q25)	49	100	C	24	d	48,1	40,3	8,5	2,4	0	0,8	LSI/Tel/Cep	Cora et al., 2002
t(15;17)(q21;q25)	49	100	C	55	d	52,7	34,4	10,7	1,5	9	0,7	LSI/Tel/Cep	Cora et al., 2002
t(15;17)(q11;p12)	0	0	B	n.a.	1201	40,5	36,3	16,7	6	0,3		Tel/Tel/LSI	Yakut et al., 2006
t(15;22)(q22;q13)	49	90	A	n.a.	1000	18,6	15,9	16	43,3	0	5,8	Cep/Tel/LSI	Escudero et al., 2003
t(16;17)(p13.1;q11.2)	80	0	A	35	± 1000	54,5	25,6	16,7	2,5	0	0,7	Cep/Tel/Tel	Vozdova et al., 2013
t(17;19)(q21;p13.3)	0	90	A	n.a.	2504	40,9	25,3	15,8	17,4	0,2	0,4	Tel/Cep/BACs	Perrin et al., 2010
t(17;22)(q11;q12)	0	13	B	35	700	19	12,9	5,8	46,8	0	16	Cep/LSI/LSI	Geneix et al., 2002

En cuanto a la posible existencia de una segregación preferente de productos en la espermatogénesis, Van Hummelen et al. (1997), en un estudio mediante FISH sobre núcleos descondensados de espermatozoides de un portador de translocación recíproca, observó un mayor número de células conteniendo el segmento translocado corto después de la segregación adyacente 1 y su equivalente después de la segregación adyacente 2. Esta distorsión fue explicada por los autores mediante la no resolución de los quiasmas tras la meiosis I, siendo este hecho proporcional a la longitud del segmento translocado. Sin embargo, el análisis de los productos de segregación de portadores de translocación (Tabla 5.3., que recoge un número de estudios de portadores de translocación mucho mayor que el aportado en su momento por dicho trabajo (Van Hummelen et al. 1997) no respalda la tesis de la distorsión a favor de las células que contienen el segmento translocado corto (asumiendo la proporción entre productos = 1). En realidad, tras el análisis de los resultados de la Tabla 5.3, no se observa una tendencia general hacia la inclusión de uno u otro tipo de productos de translocación en el esperma viable, se observa que la distribución es aleatoria o varía con cada caso individual.

Tabla 5.3 Relación de distorsión de productos de segregación tras la segregación adyacente 1 en portadores de diferentes translocaciones recíprocas

Translocación	No. de células analizadas	Genotipo translocado Corto/largo	Ratio distorsión	Referencias
Estudio en: Cromosomas de pronúcleo masculino				
t(1;2)(q32;q36)	105	-1, +der(1)/-2, +der(2)	1,2	Templado et al., 1990
t(1;4)(p36.2;q31.3)	90	-4, +der(4)/-1, +der(1)	0,73	Estop et al., 1992
t(1;4)(p36.2;q31.3)	115	-4, +der(4)/-1, +der(1)	0,57	Estop et al., 1992
t(1;9)(q22;q31)	173	-1, +der(1)/-9, +der(9)	1,24	Martin, 1992
t(1;11)(p36.3;q13.1)	548	-11, +der(11)/-1, +der(1)	0,97	Spriggs et al., 1992
t(1;13)(q41;q22)	255	-13, +der(13)/-1, +der(1)	0,96	Oliver-Bonet et al., 2002
t(2;9)(q21;p22)	208	-2, +der(2)/-9, +der(9)	0,64	Martin et al., 1990b
t(2;18)(p21;q11.2)	165	-18, +der(18)/-2, +der(2)	0,81	Estop et al., 1995
t(3;11)(q25.3;q25)	262	-3, +der(3)/-11, +der(11)	0,97	Martin and Hulten, 1993
t(3;16)(p23;q24)	201	-3, +der(3)/-16, +der(16)	1,07	Brandriff et al., 1986
t(3;19)(p21;p13.3)	128	-3, +der(3)/-19, +der(19)	1,08	Oliver-Bonet et al., 2002
t(4;6)(q28;p23)	158	-4, +der(4)/-6, +der(6)	1	Martin et al., 1990b
t(4;8)(q28;p23)	353	-4, +der(4)/-8, +der(8)	0,98	Oliver-Bonet et al., 2001
t(5;7)(q13;p15.1)	157	-5, +der(5)/-7, +der(7)	0,78	Estop et al., 1995
t(5;7)(q21;q32)	296	-5, +der(5)/-7, +der(7)	0,96	Cifuentes et al., 1999a
t(7;20)(q33.2;p13)	263	-7, +der(7)/-20, +der(20)	0,72	Martin, 1992
t(8;15)(p22;q21)	226	-15, +der(15)/-8, +der(8)	0,59	Brandriff et al., 1986
t(9;10)(q34;q11)	168	-10, +der(10)/-9, +der(9)	1,7	Martin, 1988
t(9;17)(p13;q21.3)	270	-17, +der(17)/-9, +der(9)	0,7	Cifuentes et al., 1999b
t(11;17)(p11.2;q21.3)	184	-11, +der(11)/-17, +der(17)	1,1	Spriggs et al., 1992
t(12;20)(q24.3;q11)	113	-20, +der(20)/-12, +der(12)	1,24	Martin et al., 1990a
t(15;22)(q26.1;q11.2)	147	-22, +der(22)/-15, +der(15)	1,07	Martin and Hulten, 1993
t(16;19)(q11.1;q13.3)	172	-16, +der(16)/-19, +der(19)	1	Martin, 1992

Tabla 5.3. (continuación)

Translocación	No. de células	Genotipo translocado	Ratio	Referencias
	analizadas	Corto/largo	distorsión	
Estudio en: Nucleos descondensados de espermatozoides				
t(1;10)(p22,1;q22.3)	4,036	-1, +der(1)/-10, +der(10)	1,28	/an Hummelen et al., 1997
t(1;13)(q24;q10)	124	-13, +der(13)/-1, +der(1)	2,07	Yakut et al., 2006
t(1;16)(q21;p11,2)	1027	-1, +der(1)/-16, +der(16)	1,07	Ferfour et al., 2013
t(2;6)(q35;q24)	5039	-6, +der(6)/-2, +der(2)	1,04	Perrin et al., 2010b
t(2;6)(p12;q11.2)	7000	-6, +der(6)/-2, +der(2)	1,08	Lim et al., 2003
t(2;7)(p11,2;q22)	?	-2, +der(2)/-7, +der(7)	0,95	Wiland et al., 2008
t(2;18)(p21;q11,2)	3130	-18, +der(18)/-2, +der(2)	0,65	Estop et al., 1998
t(3;6)(p24;p21,2)	1054	-6, +der(6)/-3, +der(3)	1,13	Ferfour et al., 2012
t(3;6)(q21;q23)	2002	-3, +der(3)/-6, +der(6)	1,43	Mokanski et al., 2012
t(3;9)(p25;q32)	10278	-9, der(9)/-3, +der(3)	0,77	Honda et al., 1999
t(3;9)(q26,2;q32)	10022	-9, der(9)/-3, +der(3)	0,87	Honda et al., 1999
t(3;11)(q27,3;q24,3)	4029	-3, +der(3)/-11, +der(11)	0,77	Martini et al., 1998
t(4;5)(p15,1;p12)	>3500	-5, +der(5)/-4, +der(4)	1,22	Wiland et al., 2007
t(4;5)(p15,1;p12)	>3500	-5, +der(5)/-4, +der(4)	1,22	Wiland et al., 2007
t(4;8)(q28;p23)	6590	-4, +der(4)/-8, +der(8)	0,84	Oliver-Bonet et al., 2001
t(5;8)(q33;q13)	10344	-8, +K66der(8)/-5, +der(5)	1,19	Blanco et al., 1998
t(6;13)(p21,1;q32)	1120	-6, +der(6)/-13, +der(13)	1,68	Yakut et al., 2006
t(7;8)(q11.21;cen)	34527	-7, +der(7)/-8, +der(8)	1,69	Mercier et al., 1998
t(7;10)(q21;q22)	1286	-7, +der(7)/-10, +der(10)	0,86	Yakut et al., 2006
t(7;13)(q34;q13)	5000	-13, +der(13)/-7, +der(7)	1,09	Midro et al., 2006
t(8;9)(q24.2;q32)	3118	-9, +der(9)/-8, +der(8)	1,72	Estop et al., 1998
t(8;9)(q24,3;p24)	1024	-9, +der(9)/-8, +der(8)	0,79	Ferfour et al., 2013
t(8;9)(q24,3;p24)	1053	-9, +der(9)/-8, +der(8)	1,05	Ferfour et al., 2013
t(8;9)(q24,3;p24)	1104	-9, +der(9)/-8, +der(8)	0,94	Ferfour et al., 2013
t(9;10)(q11;p11.1)	3157	-9, +der(9)/-10, +der(10)	1,14	Rives et al., 2003
t(9;22)(q21;q11.2)c	4124	-9, +der(9)/-22, +der(22)	0,99	Morel et al., 2004b
t(10;14)(q24;q32)	3111	-10, +der(10)/-14, +der(14)	1,2	Oliver-Bonet et al., 2004
t(10;15)(q25,2;q12)	1029	-15, +der(15)/-10, +der(10)	0,86	Vozdova et al., 2009
t(11;17)(q13,1;p11,2)	5371	-11, +der(11)/-17, +der(17)	0,79	Oliver-Bonet et al., 2004
t(11;18)(q23;q23)	1000	-11, +der(11)/-18, +der(18)	0,58	Vozdova et al., 2008
t(11;18)(q22;q21,3)	1007	-11, +der(11)/-18, +der(18)	1,15	Vozdova et al., 2008
t(11;18)(q22;q21,3)	1010	-11, +der(11)/-18, +der(18)	1,17	Vozdova et al., 2008
t(11;22)(q23;q11)	1925	-22, +der(22)/-11, +der(11)	1,28	Estop et al., 1999
t(11;22)(q25;q12)	1012	-22, +der(22)/-11, +der(11)	0,53	Van Assche et al., 1999
t(13;15)(q32;p11,2)	1014	-13, +der(13)/-15, +der(15)	0,96	Kaskova et al., 2012
t(13;15)(q32;q26)	1000	-13, +der(13)/-15, +der(15)	1,53	Kaskova et al., 2012
t(15;17)(q21;q25)	8490 ^a	-15, +der(15)/-17, +der(17)	0,81	Cora et al., 2002
t(15;17)(q21;q25)	a	-15, +der(15)/-17, +der(17)	1,16	Cora et al., 2002
t(15;17)(q21;q25)	a	-15, +der(15)/-17, +der(17)	0,78	Cora et al., 2002
t(15;17)(q21;q25)	a	-15, +der(15)/-17, +der(17)	1,13	Cora et al., 2002
t(15;17)(q11;p12)	1201	-15, +der(15)/-17, +der(17)	0,46	Yakut et al., 2006
t(17;22)(q11;q12)	700	-17+der(17)/-22+der(22)	3,03	Geneix et al., 2002

5. 3.- EFECTO INTERCROMOSOMICO

El efecto intercromosómico fue definido por Lejeune (1964) como no disyunción de cromosomas no implicados en translocaciones durante la meiosis. La interferencia de la figura meiótica de la reorganización sería responsable de generar aneuploidías de cromosomas distintos de los que participan de la reorganización.

Tal y como apuntaba Martin (1989), en caso de estudiar el EIC en complementos cromosómicos de pronúcleo masculino, se requiere analizar un mínimo de 150-400 complementos para poder observar un incremento del doble de las disomías. Por lo tanto, para la valoración de la incidencia del efecto intercromosómico en los portadores de translocación recíproca estudiados en el presente trabajo ($t(5;7)(q21;q31)$, $t(9;17)(p13;q21.3)$, y $t(9;17)(q12;p12)$) se ha realizado, sobre cabezas descondensadas de espermatozoide aplicando la técnica de FISH usando sondas fluorescentes autosómicas (6, 18, 21) y gonosómicas (X, Y) (Tabla 3.2). En una primera aproximación, aplicando la combinación de sondas para los cromosomas 6 y 21 y en una segunda aproximación, aplicando, en otra FISH, la combinación de las sondas para los cromosomas 18, X e Y. En el presente trabajo se han podido analizar 60.592 cabezas de espermatozoide descondensadas (unas 10.000 por estudio en cada portador).

Tan solo en el portador de la $t(9;17)(q12;p12)$ mostró un incremento significativo ($p=0,0004$, Test χ^2) en el porcentaje de espermatozoides con disomías para los gonosomas (X, Y) aunque no para los autosomas estudiados (6, 18, 21) así como también mostró un incremento significativo ($p=0,0016$, Test χ^2) de espermatozoides con diploidías. Efectos intercromosómicos tales como los que producen bloqueo meiótico o bien interrupción meiótica resultando en diploidía, puede estar relacionada con reorganizaciones con figuras asimétricas, o bien con otros problemas, como anomalías sinápticas resultando en un mayor grado de desequilibrio, ya sea viable (diploidía) o inviable (apoptosis y bloqueo meiótico) (Egozcue et al. 1997) . Esta explicación concuerda con lo observado en este caso, $t(9;17)(q12;p12)$, cuyo tetravalente en paquiteno corresponde a una figura asimétrica (Fig. 5.4.a). Cabe recordar también que en este caso el proceso de obtención de complementos

cromosómicos de pronúcleos masculino fue muy poco rentable en relación al número de cigotos heterólogos producidos. Dicho comportamiento pone de manifiesto, la existencia de un bloqueo postcigótico importante. La rotura del bloque heterocromático en el cromosoma 9, que se produjo necesariamente en dicha reorganización $t(9;17)(q12;p12)$, y su final ubicación en el cromosoma 17 comportaría un cambio funcional de este importante bloque heterocromático, favoreciendo no solo el efecto intercromosómico para los cromosomas gonosómicos, sino también la existencia de interacciones heterólogas con otros bloques heterocromáticos. Además, el hecho de que el bloque heterocromático del cromosoma 9 esté repartido en los cromosomas 9, der(9), der(17), y que el tetravalente formado en paquitenio conformara un anillo más o menos abierto, podría favorecer la heterosinápsis con otros cromosomas interfiriendo en su normal segregación, y explicando la incidencia de diploidías acumuladas.

Los resultados obtenidos en este trabajo en relación a EIC, concuerdan en líneas generales con lo publicado (Benet et al. 2005; Anton et al. 2011). En estas revisiones se describe que efecto intercromosómico tiene una menor incidencia en las translocaciones recíprocas que en las translocaciones Robertsonianas. Por las características citogenéticas de los cromosomas implicados, en estas últimas la presencia de satélites en los brazos p, regiones heterocromáticas no centroméricas, situación de los acrocéntricos en el núcleo ligada a la formación del nucléolo estaría también relacionada con la formación del cuerpo sexual (Tres 2005), hecho que justificaría la mayor incidencia de disomías de los cromosomas sexuales.

Más recientemente, ha sido publicado un estudio por Godo et al. (2015), en el que fueron analizados núcleos descondensados de espermatozoides de portadores de translocación, para determinar el efecto intercromosómico y secuencialmente, la segregación que presentaban las células con efecto intercromosómico positivo,. En este estudio se observa que era significativamente superior la incidencia de aneuploidías en aquellas células que presentaba segregaciones que implicaban no-disyunción de homólogos. Además, y sorprendentemente, aquellas células que se consideraron en el estudio de ICE células diploides para los cromosomas estudiados, en el análisis de segregación no siempre

presentaban una doble dotación de cromosomas implicados en la reorganización. Por ello se propone el concepto de diploides/múltiples-disómicos, que indicaría que la interferencia provocada por la figura del tetravalente puede afectar, simultáneamente, a la segregación de varios cromosomas no implicados en la reorganización.

6.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un sistema mejorado de capacitación de espermatozoides, que junto con el uso del antimitótico vinblastina que facilita la diferenciación entre complementos de hámster y humanos a la vez que se preserva mejor la morfología cromosómica.
2. Se ha desarrollado un sistema de pintado de cromosomas enteros que identifica individualmente, cromosomas preseleccionados, diferenciando, en cada caso de portadores de translocaciones, los cromosomas normales, derivados y recombinantes. Para las inversiones en determinados casos, puede identificar, por morfología cromosómica, los cromosomas normales, cromosomas con la inversión y productos recombinantes.
3. El estudio de la segregación meiótica en portadores de reorganizaciones cromosómicas equilibradas ha evidenciado que:
 - 3.1. En las translocaciones recíprocas estudiadas, la segregación 2:2 alternante es la más frecuente, coincidiendo con los datos publicados utilizando otras técnicas de identificación.
 - 3.2. En la translocación triple analizada, la segregación 3:3 es la más frecuente, 78,4%, pero sólo un 13,5% es equilibrada, comportando un 86,5% de segregaciones desequilibradas. Se han observado 55 tipos de segregación de los 64 posibles (incluyendo la normal/equilibrada). La hija afectada del portador estudiado, era portadora desequilibrada del tipo más frecuente observado.
 - 3.3. En la inversión pericéntrica estudiada, la segregación más frecuente ha sido la de complementos sin recombinantes, con una incidencia superior al 80%.
4. En los portadores de las translocaciones recíprocas estudiadas, el análisis, del efecto intercromosómico para los cromosomas (6, 18, 21, X, Y), tan solo el portador de la translocación $t(9;17)(q12;p12)$ muestra efecto intercromosómico para los cromosomas sexuales (X, Y).
5. En la revisión de análisis de portadores de las translocaciones recíprocas:
 - 5.1. No se observa correlación entre la incidencia de recombinación meiótica en las regiones intersticiales del tetravalente y la incidencia de no disyunción de homólogos.
 - 5.2. No se observa correlación entre la participación en la reorganización de cromosomas acrocéntricos y la incidencia de no disyunción de homólogos.
6. En inversiones cromosómicas se observa una correlación positiva entre la proporción del segmento invertido y la incidencia de productos cromosómicos recombinantes. En cambio, no se observa correlación positiva entre el tamaño del fragmento en Mpb y la incidencia de productos cromosómicos recombinantes.

7.- BIBLIOGRAFIA

A

- Alberts, B. et al. 2008. *Molecular Biology of the Cell* 5th ed., New York: Garland Sciences.
- Alvarez, R. et al. 1996. Chromosome aberrations in human spermatozoa treated with Ca²⁺ ionophore A23187. *Molecular human reproduction*, 2(7), pp.481–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9239656> [Accessed November 26, 2015].
- Alvarez, R. et al. 1997. Dose-response relationship for the induction of chromosomal abnormalities in gamma-irradiated human spermatozoa. *Environmental and molecular mutagenesis*, 29(4), pp.357–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9212786> [Accessed November 26, 2015].
- Amiel, A. et al. 2001. Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv 9) and C-heterochromatin. *Journal of human genetics*, 46(5), pp.245–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11355013> [Accessed November 26, 2015].
- Angell, R.R., Xian, J. y Keith, J., 1993. Chromosome anomalies in human oocytes in relation to age. *Human reproduction (Oxford, England)*, 8(7), pp.1047–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8408485> [Accessed November 19, 2015].
- Anton, E. et al. 2002. Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion inv6p23q25 carrier using FISH on decondensed sperm nuclei. *Cytogenetic and genome research*, 97(3-4), pp.149–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438704> [Accessed November 28, 2015].
- Anton, E. et al. 2005. Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenetic and genome research*, 111(3-4), pp.297–304. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16192708> [Accessed November 23, 2015].
- Anton, E., Blanco, J. y Vidal, F., 2010. Meiotic behavior of three D;G Robertsonian translocations: segregation and interchromosomal effect. *Journal of human genetics*, 55(8), pp.541–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20555339> [Accessed November 19, 2015].
- Anton, E., Vidal, F. y Blanco, J., 2011. Interchromosomal effect analyses by sperm FISH: incidence and distribution among reorganization carriers. *Systems biology in reproductive medicine*, 57(6), pp.268–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22092077> [Accessed November 24, 2015].
- Antonarakis, S.E. et al. 1992. The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *American journal of human genetics*, 50(3), pp.544–50. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1684265ytool=pmcentrezynrendertype=abstract> [Accessed November 9, 2015].
- Armstrong, S.J. y Hultén, M.A., Meiotic segregation analysis by FISH investigations in sperm and spermatocytes of translocation heterozygotes. *European journal of human genetics: EJHG*, 6(5), pp.430–1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9801866> [Accessed November 19, 2015].
- Ashley, T., 1988. G-band position effects on meiotic synapsis and crossing over. *Genetics*, 118(2), pp.307–17. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1203283ytool=pmcentrezynrendertype=abstract> [Accessed November 23, 2015].

B

- Baccetti, B. et al. 2003. 10, 15 reciprocal translocation in an infertile man: ultrastructural and fluorescence in-situ hybridization sperm study: case report. *Human reproduction (Oxford, England)*, 18(11), pp.2302–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585878> [Accessed November 28, 2015].
- Balkan, W., Burns, K. y Martin, R.H., 1983. Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 3. *Cytogenetics and cell genetics*, 35(4),

- pp.295–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6617267> [Accessed November 28, 2015].
- Balkan, W. y Martin, R.H., 1983. Chromosome segregation into the spermatozoa of two men heterozygous for different reciprocal translocations. *Human genetics*, 63(4), pp.345–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6862439> [Accessed November 23, 2015].
- Barlow, A.L. y Hultén, M.A., Crossing over analysis at pachytene in man. *European journal of human genetics: EJHG*, 6(4), pp.350–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9781043> [Accessed November 27, 2015].
- Benet, J. et al. 1992. Cytogenetic studies in motile sperm from normal men. *Human genetics*, 89(2), pp.176–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1587528> [Accessed November 26, 2015].
- Benet, J. et al. 1986. G-banding of human sperm chromosomes. *Human genetics*, 73(2), pp.181–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3721504> [Accessed November 23, 2015].
- Benet, J. et al. 2005. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenetic and genome research*, 111(3-4), pp.281–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16192706> [Accessed November 23, 2015].
- Benkhalifa M, Malet P, Qumisiyeh MB, Boucher D, Batec V, M.Y., 1994. Chromosome aberrations in normal and translocated human sperm; role in reproduction pathology. *Ref Gynecol Obstet*, 2, pp.288–296.
- Bernicot, I. et al. 2010. Predictive value of sperm-FISH analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis (PGD) for a pericentric inversion inv5(p15.3q11.2) carrier. *Human reproduction (Oxford, England)*, 25(7), pp.1818–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20406738> [Accessed November 23, 2015].
- Bischoff, F.Z. et al. 1994. Estimates of aneuploidy using multicolor fluorescence in situ hybridization on human sperm. *Cytogenetics and cell genetics*, 66(4), pp.237–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7718031> [Accessed November 26, 2015].
- Blanco, J. et al. 1998. FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and interchromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenetics and cell genetics*, 83(3-4), pp.275–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10072603> [Accessed November 28, 2015].
- Blanco, J. et al. 1997. Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XYY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Human genetics*, 99(3), pp.413–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9050932> [Accessed November 28, 2015].
- Blanco, J., Egozcue, J. y Vidal, F., 1996. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Human reproduction (Oxford, England)*, 11(4), pp.722–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8671315> [Accessed November 28, 2015].
- Boué, A. y Gallano, P., 1984. A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses. *Prenatal diagnosis*, 4 Spec No, pp.45–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6463033> [Accessed November 24, 2015].
- Brandriff, B. et al. 1986. Cytogenetics of human sperm: meiotic segregation in two translocation carriers. *American journal of human genetics*, 38(2), pp.197–208. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1684758ytool=pmcentrezrendertype=abstract> [Accessed November 28, 2015].
- Brucker, C. y Lipford, G.B., 1995. The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Human reproduction update*, 1(1), pp.51–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9080206> [Accessed November 23, 2015].
- Brugnon, F. et al. 2006. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Human reproduction (Oxford, England)*, 21(3), pp.685–93. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339168> [Accessed November 28, 2015].
- Buckton, K.E. et al. 1980. A G-band study of chromosomes in liveborn infants. *Annals of human genetics*, 43(3), pp.227–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7362200> [Accessed November 19, 2015].
- Burns, J.P. et al. 1986. Analysis of meiotic segregation in a man heterozygous for two reciprocal translocations using the hamster in vitro penetration system. *American journal of human genetics*, 38(6), pp.954–64. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1684860&tool=pmcentrez&rentype=abstract> [Accessed November 24, 2015].

C

- Caer, E. et al. 2008. Differing mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8. *Fertility and sterility*, 89(6), pp.1637–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17603050> [Accessed November 23, 2015].
- Chandley, A.C., 1992. Involvement of 3:1 disjunction in the common reciprocal translocation t(11;22)(q23.3;q11.2). *Human genetics*, 90(1-2), pp.191–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1427783> [Accessed November 24, 2015].
- Chantot-Bastaraud, S. et al. 2007. Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility. *Molecular human reproduction*, 13(1), pp.55–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077110> [Accessed November 28, 2015].
- Chernos, J.E., Rattner, J.B. y Martin, R.H., 1986. An investigation of human sperm pronuclear chromosome “gaps” using scanning electron microscopy. *Cytogenetics and cell genetics*, 42(1-2), pp.57–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3720359> [Accessed November 23, 2015].
- Cifuentes P, Benet J, Navarro J, E.J., 1995. Whole chromosome painting in human sperm complements from a 46XY inv(7). *Chromosome Research*, p.Vol 3 suppl:21.
- Cifuentes, P., Navarro, J., Blanco, J., et al. 1999. Cytogenetic analysis of sperm chromosomes and sperm nuclei in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) by in situ hybridisation. *European journal of human genetics: EJHG*, 7(2), pp.231–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10196708> [Accessed November 23, 2015].
- Cifuentes, P., Navarro, J., Egozcue, J., et al. 1999. Segregation analysis on sperm chromosomes in two carriers of a t(9;17) reciprocal translocation: whole chromosome painting. *Hum Reprod*, 14(s1), p.239.
- Cifuentes, P. et al. 1998. Sperm segregation analysis of a complex chromosome rearrangement, 2;22;11, by whole chromosome painting. *Cytogenetics and cell genetics*, 82(3-4), pp.204–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858818> [Accessed November 23, 2015].
- Codina-Pascual, M. et al. 2004. Characterization of all human male synaptonemal complexes by subtelomere multiplex-FISH. *Cytogenetic and genome research*, 107(1-2), pp.18–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15305051> [Accessed November 27, 2015].
- Codina-Pascual, M. et al. 2006. Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and effects on human male meiosis. *Molecular human reproduction*, 12(2), pp.123–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16449239> [Accessed November 23, 2015].
- Colls, P. et al. 1997. Chromosome segregation in a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(9)(p11q13), analyzed by using sperm karyotyping and two-color fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Human genetics*, 99(6), pp.761–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9187669> [Accessed November 23, 2015].
- Cora, T., Acar, H. y Kaynak, M., 2002. Molecular cytogenetic detection of meiotic segregation

patterns in sperm nuclei of carriers of 46,XY,t(15;17)(q21; q25). *Journal of andrology*, 23(6), pp.793–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12399524> [Accessed November 28, 2015].

Cremer, T. et al. 1988. Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Human genetics*, 80(3), pp.235–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3192213> [Accessed November 23, 2015].

D

De Braekeleer, M. y Dao, T.N., 1990. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Human reproduction (Oxford, England)*, 5(5), pp.519–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2203803> [Accessed November 19, 2015].

De Braekeleer, M. y Dao, T.N., 1991. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Human reproduction (Oxford, England)*, 6(2), pp.245–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2056021> [Accessed November 9, 2015].

De Jonge, C.J. y Barratt, C.L.R., 2013. Methods for the assessment of sperm capacitation and acrosome reaction excluding the sperm penetration assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 927, pp.113–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22992908> [Accessed November 23, 2015].

de la Chapelle, A. et al. 1974. Pericentric inversions of human chromosomes 9 and 10. *American journal of human genetics*, 26(6), pp.746–66. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1762846ytool=pmcentrezren dertype=abstract> [Accessed November 19, 2015].

Denegri, M. et al. 2002. Human chromosomes 9, 12, and 15 contain the nucleation sites of stress-induced nuclear bodies. *Molecular biology of the cell*, 13(6), pp.2069–79. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=117625ytool=pmcentrezren dertype=abstract> [Accessed November 24, 2015].

Divya, V. et al. 2014. Dynamics of spermatogenesis. *Annual Research and Review in Biology*, 4(1), pp.38–50.

Durban, M. et al. 2001. PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis. *Human reproduction update*, 7(6), pp.591–602. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11727868> [Accessed November 24, 2015].

E

Eaker, S. et al. 2001. Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *Journal of cell science*, 114(Pt 16), pp.2953–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11686299> [Accessed November 22, 2015].

Egozcue, J., Blanco, J. y Vidal, F., 1997. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Human reproduction update*, 3(5), pp.441–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9528909> [Accessed November 24, 2015].

Egozcue, S. et al. 2000. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Human reproduction update*, 6(1), pp.93–105. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10711834> [Accessed November 19, 2015].

Eiben, B. et al. 1990. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *American journal of human genetics*, 47(4), pp.656–63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1683793ytool=pmcentrezren dertype=abstract> [Accessed November 19, 2015].

- Emery y Raimond's, 2002. *Principles and practice of medical genetics* 4th ed. D. Rimoin et al. eds., London, Edinburgh, New York, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto: Churchill Livingstone.
- Escudero, T. et al. 2003. Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertility and sterility*, 79 Suppl 3, pp.1528–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12801555> [Accessed November 28, 2015].
- Estop, A.M. et al. 1998. Meiotic products of two reciprocal translocations studied by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetics and cell genetics*, 83(3-4), pp.193–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10072576> [Accessed November 28, 2015].
- Estop, A.M. et al. 1999. Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of the spermatozoa of a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Human genetics*, 104(5), pp.412–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10394934> [Accessed November 28, 2015].
- Estop, A.M. et al. 1992. The segregation of a translocation t(1;4) in two male carriers heterozygous for the translocation. *Human genetics*, 89(4), pp.425–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1618491> [Accessed November 28, 2015].
- Estop, A.M., Cieply, K.M. y Aston, C.E., 1997. The meiotic segregation pattern of a reciprocal translocation t(10;12)(q26.1;p13.3) by fluorescence in situ hybridization sperm analysis. *European journal of human genetics: EJHG*, 5(2), pp.78–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9195156> [Accessed November 28, 2015].
- Estop, A.M., Van Kirk, V. y Cieply, K., 1995. Segregation analysis of four translocations, t(2;18), t(3;15), t(5;7), and t(10;12), by sperm chromosome studies and a review of the literature. *Cytogenetics and cell genetics*, 70(1-2), pp.80–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7736796> [Accessed November 24, 2015].

F

- Feinberg, A.P. y Fallin, M.D., 2015. Epigenetics at the Crossroads of Genes and the Environment. *JAMA*, 314(11), pp.1129–1130. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26372577> [Accessed September 16, 2015].
- Ferfourri, F. et al. 2013. Can one translocation impact the meiotic segregation of another translocation? A sperm-FISH analysis of a 46,XY,t(1;16)(q21;p11.2),t(8;9)(q24.3;p24) patient and his 46,XY,t(8;9)(q24.3;p24) brother and cousin. *Molecular human reproduction*, 19(2), pp.109–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23100463> [Accessed November 24, 2015].
- Ferfourri, F. et al. 2009. Is classic pericentric inversion of chromosome 2 inv(2)(p11q13) associated with an increased risk of unbalanced chromosomes? *Fertility and sterility*, 92(4), pp.1497.e1–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19665704> [Accessed November 5, 2015].
- Ferfourri, F. et al. 2012. Sperm FISH analysis of a 46,XY,t(3;6)(p24;p21.2),inv(8)(p11;2q21.2) double chromosomal rearrangement. *Reproductive biomedicine online*, 24(2), pp.219–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22196892> [Accessed November 28, 2015].
- Ferguson-Smith, M.A. y Yates, J.R., 1984. Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative european study on 52 965 amniocenteses. *Prenatal diagnosis*, 4 Spec No, pp.5–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6235485> [Accessed November 19, 2015].
- Ferlin, A. et al. 2007. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(3), pp.762–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17213277> [Accessed November 18, 2015].
- Ford, J.H. et al. 1982. Within pair differences of human chromosome 9 C-bands associated with reproductive loss. *Human genetics*, 61(4), pp.360–3. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7152520> [Accessed November 24, 2015].
- Fraccaro, M. et al. 1980. The 11q;22q translocation: a European collaborative analysis of 43 cases. *Human genetics*, 56(1), pp.21–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7203479> [Accessed November 24, 2015].
- Fryns, J.P., Kleczkowska, A. y Van den Berghe, H., 1986. Paracentric inversions in man. *Human genetics*, 73(3), pp.205–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3733076> [Accessed November 19, 2015].
- Fuster, C. et al. 1997. Familial complex chromosome rearrangement ascertained by in situ hybridisation. *Journal of medical genetics*, 34(2), pp.164–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1050874ytool=pmcentrezren dertype=abstract> [Accessed November 24, 2015].

G

- Gardner, R., Shuterland, G. y Shaffer, L., 2011. *Chromosomal abnormalities and genetic counseling*. 4th ed., Oxford: Oxford University Press.
- Geneix, A. et al. 2002. Sperm analysis by FISH in a case of t(17; 22) (q11; q12) balanced translocation: case report. *Human reproduction (Oxford, England)*, 17(2), pp.325–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11821272> [Accessed November 28, 2015].
- Godo, A. et al. 2013. Accumulation of numerical and structural chromosome imbalances in spermatozoa from reciprocal translocation carriers. *Human reproduction (Oxford, England)*, 28(3), pp.840–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23250926> [Accessed November 23, 2015].
- Godo, A. et al. 2015. Altered segregation pattern and numerical chromosome abnormalities interrelate in spermatozoa from Robertsonian translocation carriers. *Reproductive biomedicine online*, 31(1), pp.79–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25985997> [Accessed November 24, 2015].
- Guttenbach, M., Engel, W. y Schmid, M., 1997. Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations. A review. *Human genetics*, 100(1), pp.1–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9225963> [Accessed November 23, 2015].
- Guttenbach, M. y Schmid, M., 1990. Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization. *American journal of human genetics*, 46(3), pp.553–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1683642ytool=pmcentrezren dertype=abstract> [Accessed November 23, 2015].

H

- Hamer, G. et al. 2008. Disruption of pairing and synapsis of chromosomes causes stage-specific apoptosis of male meiotic cells. *Theriogenology*, 69(3), pp.333–9. Available at: <http://www.theriojournal.com/article/S0093691X07005973/fulltext> [Accessed November 22, 2015].
- Hamerton, J.L. et al. 1975. A cytogenetic survey of 14,069 newborn infants. I. Incidence of chromosome abnormalities. *Clinical genetics*, 8(4), pp.223–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1183067> [Accessed November 19, 2015].
- Hansteen, I.L. et al. 1982. Cytogenetic screening of a new-born population. *Clinical genetics*, 21(5), pp.309–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7116675> [Accessed November 19, 2015].
- Hertz, B. et al. 1993. Application of molecular and cytogenetic techniques to the detection of a de novo unbalanced t(11q;21q) in a patient previously diagnosed as having monosomy 21. *Clinical genetics*, 44(2), pp.89–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7506129> [Accessed November 24, 2015].

- Hill, A.S. et al. 2000. The most frequent constitutional translocation in humans, the t(11;22)(q23;q11) is due to a highly specific alu-mediated recombination. *Human molecular genetics*, 9(10), pp.1525–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888603> [Accessed November 27, 2015].
- Holmes, J.M. y Martin, R.H., 1993. Aneuploidy detection in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization. *Human genetics*, 91(1), pp.20–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8454283> [Accessed November 26, 2015].
- Honda, H. et al. 1999. Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers, t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triple-color fluorescence in situ hybridization. *Human genetics*, 105(5), pp.428–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10598808> [Accessed November 28, 2015].
- Hultén, M., Solari, A.J. y Skakkebaek, N.E., 1974. Abnormal synaptonemal complex in an oligochiasmatic man with spermatogenic arrest. *Hereditas*, 78(1), pp.105–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4448692> [Accessed November 24, 2015].

I

ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M (eds), (S Karger, Basel 2013).

J

- Jaarola, M., Martin, R.H. y Ashley, T., 1998. Direct evidence for suppression of recombination within two pericentric inversions in humans: a new sperm-FISH technique. *American journal of human genetics*, 63(1), pp.218–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1377224&tool=pmcentrez&rentype=abstract> [Accessed November 23, 2015].
- Jacobs, P.A. et al. 1974. A cytogenetic survey of 11,680 newborn infants. *Annals of human genetics*, 37(4), pp.359–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4277977> [Accessed November 27, 2015].
- Jacobs, P.A., 1992. The chromosome complement of human gametes. *Oxford reviews of reproductive biology*, 14, pp.47–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1437215> [Accessed November 19, 2015].
- Jacobs, P.A. y Hassold, T.J., 1995. The origin of numerical chromosome abnormalities. *Advances in genetics*, 33, pp.101–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7484451> [Accessed November 19, 2015].
- Jalbert P, Jalbert H, S.B., 1988. Types of imbalances in human reciprocal translocation: risk at birth. In A. R. Liss, ed. New York, pp. 267–291.
- Jalbert, P. y Sele, B., 1979. Factors predisposing to adjacent 2 and 3:1 disjunctions: study of 161 human reciprocal translocations. *Journal of medical genetics*, 16(6), pp.467–78. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1012595&tool=pmcentrez&rentype=abstract> [Accessed November 26, 2015].
- Jenderny, J. et al. 1992. Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 20. *Human genetics*, 89(1), pp.117–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1577458> [Accessed November 23, 2015].
- Jenderny, J., 1992. Sperm chromosome analysis of two males heterozygous for a t(2;17)(q35;p13) and t(3;8)(p13;p21) reciprocal translocation. *Human genetics*, 90(1-2), pp.171–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1427772> [Accessed November 28, 2015].

- Kaiser, P., 1984. Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics. *Human genetics*, 68(1), pp.1–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6389316> [Accessed November 19, 2015].
- Kamiguchi, Y. y Mikamo, K., 1986. An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. *American journal of human genetics*, 38(5), pp.724–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1684829ytool=pmcentrezyn dertype=abstract> [Accessed November 27, 2015].
- Kasikova, K. et al. 2012. Sperm meiotic segregation, aneuploidy and high risk of delivering an affected offspring in carriers of non-Robertsonian translocation t(13;15). *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29(7), pp.693–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3401264ytool=pmcentrezyn dertype=abstract> [Accessed November 28, 2015].
- Kato, T., Kurahashi, H. y Emanuel, B.S., 2012. Chromosomal translocations and palindromic AT-rich repeats. *Current opinion in genetics y development*, 22(3), pp.221–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3378763ytool=pmcentrezyn dertype=abstract> [Accessed November 19, 2015].
- Kékesi, A. et al. 2007. Segregation of chromosomes in spermatozoa of four Hungarian translocation carriers. *Fertility and sterility*, 88(1), pp.212.e5–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274993> [Accessed November 28, 2015].
- Kent-First, M. et al. 1999. Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Molecular Reproduction and Development*, 53(1), pp.27–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10230814> [Accessed November 19, 2015].
- Kirkpatrick, G., Chow, V. y Ma, S., 2012. Meiotic recombination, synapsis, meiotic inactivation and sperm aneuploidy in a chromosome 1 inversion carrier. *Reproductive biomedicine online*, 24(1), pp.91–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22116071> [Accessed November 23, 2015].
- Kleckner, N., 1996. Meiosis: how could it work? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(16), pp.8167–74. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38641ytool=pmcentrezyn dertype=abstract> [Accessed November 27, 2015].

L

- Lacadena J, 1996. *Citogenética* Editorial ., Madrid Spain.
- Laurie, D.A. y Hultén, M.A., 1985a. Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Annals of human genetics*, 49(Pt 3), pp.189–201. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4073833> [Accessed November 23, 2015].
- Laurie, D.A. y Hultén, M.A., 1985b. Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Annals of human genetics*, 49(Pt 3), pp.203–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4073834> [Accessed November 23, 2015].
- Lim, A.S.T. et al. 2003. Sperm segregation patterns by fluorescence in situ hybridization studies of a 46,XY,t(2;6) heterozygote giving rise to a rare triploid product of conception with a 69,XXY,t(2;6)(p12;q24)der(6)t(2;6)(p12;q24)pat karyotype. *American journal of medical genetics. Part A*, 117A(2), pp.172–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12567417> [Accessed November 28, 2015].
- Lockwood, D.H. et al. 1989. Not all chromosome imbalance resulting from the 11q;22q translocation is due to 3:1 segregation in first meiosis. *Human genetics*, 83(3), pp.287–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2793173> [Accessed November 24, 2015].

- Machin, G.A. y Crolla, J.A., 1974. Chromosome constitution of 500 infants dying during the perinatal period. With an appendix concerning other genetic disorders among these infants. *Humangenetik*, 23(3), pp.183–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4844640> [Accessed November 19, 2015].
- Maeda, T. et al. 1991. A cytogenetic survey of 14,835 consecutive liveborns. *Jinrui idengaku zasshi. The Japanese journal of human genetics*, 36(1), pp.117–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2062008> [Accessed November 19, 2015].
- Malan, V. et al. 2006. Chromosome segregation in an infertile man carrying a unique pericentric inversion, inv(21)(p12q22.3), analysed using fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei: significance for clinical genetics. A case report. *Human reproduction (Oxford, England)*, 21(8), pp.2052–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16585123> [Accessed November 23, 2015].
- Martin, R.H., 1983. A detailed method for obtaining preparations of human sperm chromosomes. *Cytogenetics and cell genetics*, 35(4), pp.252–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6684539> [Accessed November 24, 2015].
- Martin, R.H., 1984. Analysis of human sperm chromosome complements from a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Clinical genetics*, 25(4), pp.357–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6713713> [Accessed November 28, 2015].
- Martin, R.H. et al. 1994. Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 1. *Human genetics*, 93(2), pp.135–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8112736> [Accessed November 23, 2015].
- Martin, R.H., 1993. Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(8)(p23q22). *Cytogenetics and cell genetics*, 62(4), pp.199–202. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8440137> [Accessed November 23, 2015].
- Martin, R.H., Barclay, L., et al. 1990. Cytogenetic analysis of 400 sperm from three translocation heterozygotes. *Human genetics*, 86(1), pp.33–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2253936> [Accessed November 28, 2015].
- Martin, R.H., 1991. Cytogenetic analysis of sperm from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(3)(p25q21). *American journal of human genetics*, 48(5), pp.856–61. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1683062&tool=pmcentrez&rentype=abstract> [Accessed November 23, 2015].
- Martin, R.H. et al. 1982. Direct chromosomal analysis of human spermatozoa: preliminary results from 18 normal men. *American journal of human genetics*, 34(3), pp.459–68. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1685332&tool=pmcentrez&rentype=abstract> [Accessed November 26, 2015].
- Martin, R.H., 1988. Meiotic segregation of human sperm chromosomes in translocation heterozygotes: report of a t(9;10)(q34;q11) and a review of the literature. *Cytogenetics and cell genetics*, 47(1-2), pp.48–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3281800> [Accessed November 28, 2015].
- Martin, R.H., 1989. Segregation analysis of translocations by the study of human sperm chromosome complements. *American journal of human genetics*, 44(4), pp.461–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2929592> [Accessed November 24, 2015].
- Martin, R.H., McGillivray, B., et al. 1990. Sperm chromosome analysis in a man heterozygous for a reciprocal translocation 46,XY t(12;20)(q24.3;q11). *Human reproduction (Oxford, England)*, 5(5), pp.606–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2394792> [Accessed November 28, 2015].
- Martin, R.H., 1992. Sperm chromosome analysis of two men heterozygous for reciprocal translocations: t(1;9)(q22;q31) and t(16;19)(q11.1;q13.3). *Cytogenetics and cell genetics*,

- 60(1), pp.18–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1582252> [Accessed November 28, 2015].
- Martin, R.H., 1994. Sperm chromosome complements in a man heterozygous for a reciprocal translocation t(2;3)(q24;p26). *Human reproduction (Oxford, England)*, 9(8), pp.1512–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7989514> [Accessed November 23, 2015].
- Martin, R.H., Balkan, W. y Burns, K., 1983. Cytogenetic analysis of Q-banded pronuclear chromosomes in fertilized Syrian hamster eggs. *Cytogenetics and cell genetics*, 35(1), pp.41–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6825470> [Accessed November 23, 2015].
- Martin, R.H. y Hultén, M., 1993. Chromosome complements in 695 sperm from three men heterozygous for reciprocal translocations, and a review of the literature. *Hereditas*, 118(2), pp.165–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8335473> [Accessed November 28, 2015].
- Martin, R.H. y Spriggs, E.L., 1995. Sperm chromosome complements in a man heterozygous for a reciprocal translocation 46,XY,t(9;13)(q21.1;q21.2) and a review of the literature. *Clinical genetics*, 47(1), pp.42–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7774043> [Accessed November 28, 2015].
- Martini, E. et al. 1998. Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3;11)(q27.3;q24.3) by triple FISH. *Human genetics*, 102(2), pp.157–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9521583> [Accessed November 28, 2015].
- Martorell, M.R. et al. 1997. Hypomethylation of human sperm pronuclear chromosomes. *Cytogenetics and cell genetics*, 76(3–4), pp.123–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9186504> [Accessed November 24, 2015].
- Mau-Holzmann, U.A., 2005. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenetic and genome research*, 111(3–4), pp.317–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16192711> [Accessed November 19, 2015].
- Mennicke, K. et al. 1997. Molecular cytogenetic diagnostics in sperm. *International journal of andrology*, 20 Suppl 3, pp.11–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466181> [Accessed November 28, 2015].
- Mercier, S. et al. 1998. Molecular analysis of the chromosomal equipment in spermatozoa of a 46, XY, t(7;8) (q11.21;cen) carrier by using fluorescence in situ hybridization. *Human genetics*, 102(4), pp.446–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9600242> [Accessed November 28, 2015].
- Midro, A.T. et al. 2014. Recurrence risks for different pregnancy outcomes and meiotic segregation analysis of spermatozoa in carriers of t(1;11)(p36.22;q12.2). *Journal of human genetics*, 59(12), pp.667–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25319850> [Accessed November 28, 2015].
- Midro, A.T. et al. 2006. Risk evaluation of carriers with chromosome reciprocal translocation t(7;13)(q34;q13) and concomitant meiotic segregation analyzed by FISH on ejaculated spermatozoa. *American journal of medical genetics. Part A*, 140(3), pp.245–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16411217> [Accessed November 28, 2015].
- Miharu, N., 2005. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia. *Cytogenetic and genome research*, 111(3–4), pp.347–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16192714> [Accessed November 23, 2015].
- Mikhaail-Philips, M.M. et al. 2005. Unusual segregation products in sperm from a pericentric inversion 17 heterozygote. *Human genetics*, 117(4), pp.357–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15924233> [Accessed November 28, 2015].
- Mitchell, A.R., 1992. Hypomethylation of human heterochromatin detected by restriction enzyme nick translation. *Experimental cell research*, 202(1), pp.203–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1380920> [Accessed November 24, 2015].
- Mokánszki, A. et al. 2012. Meiotic segregation study of a novel t(3;6)(q21;q23) in an infertile man using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Systems biology in reproductive medicine*, 58(3), pp.160–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22540876> [Accessed November 28, 2015].

- Morel, F. et al. 2004. Lack of intraindividual variation of unbalanced spermatozoa frequencies from a 46,XY,t(9;22)(q21;q11.2) carrier: case report. *Human reproduction (Oxford, England)*, 19(10), pp.2227–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15298974> [Accessed November 28, 2015].
- Morel, F. et al. 2007. Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Human reproduction (Oxford, England)*, 22(1), pp.136–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16917123> [Accessed November 19, 2015].
- Morel, F. et al. 2004. Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *International journal of andrology*, 27(4), pp.200–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271199> [Accessed November 27, 2015].
- Morton, N.E., 1991. Parameters of the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(17), pp.7474–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=52322ytool=pmcentrezrendertype=abstract> [Accessed November 27, 2015].
- Mullis, K. et al. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1, pp.263–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3472723> [Accessed March 27, 2015].

N

- Navarro, J. et al. 1993. Segregation analysis in a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 7 (p13;q36) by sperm chromosome studies. *American journal of human genetics*, 53(1), pp.214–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1682220ytool=pmcentrezrendertype=abstract> [Accessed November 23, 2015].
- Navarro, J. et al. 1987. Study of human sperm chromosomes by sequential transmission and scanning electron microscopy. *Human reproduction (Oxford, England)*, 2(7), pp.583–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3680487> [Accessed November 24, 2015].
- Nielsen, J., 1975. Chromosome examination of newborn children: purpose and ethical aspects. *Humangenetik*, 26(3), pp.215–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1055709> [Accessed November 19, 2015].
- Nielsen, J. y Wohlert, M., 1991. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Aarhus, Denmark. *Human genetics*, 87(1), pp.81–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2037286> [Accessed November 19, 2015].
- Nishikawa, N. et al. 2008. Meiotic segregation analysis in male translocation carriers by using fluorescent in situ hybridization. *International journal of andrology*, 31(1), pp.60–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17459123> [Accessed November 28, 2015].

O

- O'Flynn O'Brien, K.L., Varghese, A.C. y Agarwal, A., 2010. The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertility and Sterility*, 93(1), pp.1–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20103481> [Accessed July 23, 2015].
- Ohta, T. et al. 1993. The origin of cytologically unidentifiable chromosome abnormalities: six cases ascertained by targeted chromosome-band painting. *Human genetics*, 92(1), pp.1–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8365720> [Accessed November 24, 2015].
- Oliver-Bonet, M. et al. 2002. Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Molecular human reproduction*, 8(10), pp.958–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12356948> [Accessed November 28, 2015].
- Oliver-Bonet, M. et al. 2004. From spermatocytes to sperm: meiotic behaviour of human male

- reciprocal translocations. *Human reproduction (Oxford, England)*, 19(11), pp.2515–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15333594> [Accessed November 28, 2015].
- Oliver-Bonet, M. et al. 2001. Meiotic segregation analysis in a t(4;8) carrier: comparison of FISH methods on sperm chromosome metaphases and interphase sperm nuclei. *European journal of human genetics: EJHG*, 9(6), pp.395–403. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11436119> [Accessed November 28, 2015].
- Oliver-Bonet, M. et al. 2005. Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Human reproduction (Oxford, England)*, 20(3), pp.683–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15689348> [Accessed November 27, 2015].
- Oliver-Bonet, M., Benet, J. y Martin, R.H., 2006. Studying meiosis: a review of FISH and M-FISH techniques used in the analysis of meiotic processes in humans. *Cytogenetic and genome research*, 114(3-4), pp.312–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16954672> [Accessed November 26, 2015].
- Olszewska, M. et al. 2013. Chromatin structure analysis of spermatozoa from reciprocal chromosome translocation (RCT) carriers with known meiotic segregation patterns. *Reproductive biology*, 13(3), pp.209–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24011192> [Accessed November 28, 2015].
- Ooga, M., Suzuki, M.G. y Aoki, F., 2013. Involvement of DOT1L in the remodeling of heterochromatin configuration during early preimplantation development in mice. *Biology of reproduction*, 89(6), p.145. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24132959> [Accessed November 24, 2015].

P

- Pellestor, F. et al. 1997. Cytogenetic analysis of meiotic segregation in sperm from two males heterozygous for reciprocal translocations using PRINS and humster techniques. *Cytogenetics and cell genetics*, 78(3-4), pp.202–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9465888> [Accessed November 26, 2015].
- Pellestor, F. et al. 1989. Direct segregation analysis of reciprocal translocations: a study of 283 sperm karyotypes from four carriers. *American journal of human genetics*, 44(4), pp.464–73. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1715574&tool=pmcentrez&rentype=abstract> [Accessed November 24, 2015].
- Pellestor, F. et al. 2011. Meiotic segregation of complex reciprocal translocations: direct analysis of the spermatozoa of a t(5;13;14) carrier. *Fertility and sterility*, 95(7), pp.2433.e17–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21367411> [Accessed November 26, 2015].
- Pendina, A.A. et al. 2001. [The methylation peculiarities of pericentromeric heterochromatin of chromosomes 1,9 and 16 in human embryo]. *Tsitologija*, 43(8), pp.772–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11601393> [Accessed November 24, 2015].
- Pérez, M.M. et al. 1991. Heterochromatin decondensation in chromosomes from chorionic villus samples. *Prenatal diagnosis*, 11(9), pp.697–704. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1788176> [Accessed November 24, 2015].
- Perreault, S.D. y Zirkin, B.R., 1982. Sperm nuclear decondensation in mammal: role of sperm-associated proteinase in vivo. *J Exp Zool*, 224(2), pp.253–257.
- Perrin, A. et al. 2010. A study of meiotic segregation of chromosomes in spermatozoa of translocation carriers using fluorescent in situ hybridisation. *Andrologia*, 42(1), pp.27–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20078513> [Accessed November 28, 2015].
- Perrin, A. et al. 2010. Molecular cytogenetic analysis by genomic hybridization to determine the cause of recurrent miscarriage. *Fertility and sterility*, 93(6), pp.2075.e3–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20056212> [Accessed November 28, 2015].
- Petković, I. et al. 1996. Unusual segregation of t(11;22) resulting from crossing-over followed by 3:1 disjunction at meiosis I. *Clinical genetics*, 50(6), pp.515–9. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9147886> [Accessed November 24, 2015].
- Pinkel, D. et al. 1988. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(23), pp.9138–42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=282679&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 23, 2015].
- Pinkel, D., Straume, T. y Gray, J.W., 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(9), pp.2934–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=323421&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 17, 2015].
- Prigent Y, Viguié F: Ségrégations germinales chez un homme 46,XY,t(1;8) (q33.2;q24.1) par hybridation in situ fluorescente (FISH). Ninth French Cytogeneticists Congress, Paris.(1996).

R

- Ravel, C. et al. 2006. Prevalence of chromosomal abnormalities in phenotypically normal and fertile adult males: large-scale survey of over 10,000 sperm donor karyotypes. *Human reproduction (Oxford, England)*, 21(6), pp.1484–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16484311> [Accessed November 19, 2015].
- Rigola, M.A. et al. 2001. Characterization of a heritable partial monosomy 18p by molecular and cytogenetic analysis. *American journal of medical genetics*, 104(1), pp.37–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11746025> [Accessed November 23, 2015].
- Rives, N. et al. 2003. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis of chromosome segregation and interchromosomal effect in spermatozoa of a reciprocal translocation t(9;10)(q11;p11.1) carrier. *Journal of human genetics*, 48(10), pp.535–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14523620> [Accessed November 28, 2015].
- Rouen, A. et al. 2013. Simultaneous cell by cell study of both DNA fragmentation and chromosomal segregation in spermatozoa from chromosomal rearrangement carriers. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(3), pp.383–90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3607690&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 28, 2015].
- Rousseaux, S. et al. 1995. Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocations: analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetics and cell genetics*, 71(3), pp.240–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7587385> [Accessed November 28, 2015].
- Rubio, C. et al. 2003. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Human reproduction (Oxford, England)*, 18(1), pp.182–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525464> [Accessed November 19, 2015].
- Rudak, E., Jacobs, P.A. y Yanagimachi, R., 1978. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature*, 274(5674), pp.911–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/683334> [Accessed November 26, 2015].

S

- Saadallah, N. y Hulten, M., 1985. A complex three breakpoint translocation involving chromosomes 2, 4, and 9 identified by meiotic investigations of a human male ascertained for subfertility. *Human genetics*, 71(4), pp.312–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4077048> [Accessed November 24, 2015].
- Serra, A. et al. 1990. Pericentric inversion of chromosome 9: prevalence in 300 Down syndrome families and molecular studies of nondisjunction. *American journal of medical genetics. Supplement*, 7, pp.162–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1981475> [Accessed November 24, 2015].

- Simi, P. et al. 1992. The unbalanced offspring of the male carriers of the 11q;22q translocation: nondisjunction at meiosis II in a balanced spermatocyte. *Human genetics*, 88(4), pp.482–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1740326> [Accessed November 24, 2015].
- Smart, R.D., Retief, A.E. y Overhauser, J., 1989. Confirmation of a balanced chromosomal translocation using molecular techniques. *Prenatal diagnosis*, 9(7), pp.505–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2771889> [Accessed November 24, 2015].
- Spriggs, E.L. y Martin, R.H., 1994. Analysis of segregation in a human male reciprocal translocation carrier, t(1;11) (p36.3;q13.1), by two-colour fluorescence in situ hybridization. *Molecular reproduction and development*, 38(3), pp.247–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7917274> [Accessed November 28, 2015].
- Spriggs, E.L., Martin, R.H. y Hulten, M., 1992. Sperm chromosome complements from two human reciprocal translocation heterozygotes. *Human genetics*, 88(4), pp.447–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1740322> [Accessed November 28, 2015].
- Stephenson, M.D., Awartani, K.A. y Robinson, W.P., 2002. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Human reproduction (Oxford, England)*, 17(2), pp.446–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11821293> [Accessed November 19, 2015].
- Sumner, A.T., Evans, H.J. y Buckland, R.A., 1971. New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature: New biology*, 232(27), pp.31–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4105244> [Accessed November 27, 2015].
- Sun, F. et al. 2004. Human male recombination maps for individual chromosomes. *American journal of human genetics*, 74(3), pp.521–31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1182265&tool=pmcentrez&rentype=abstract> [Accessed November 23, 2015].
- Sybenga, J., 1975. *Meiotic configurations*, Berlin: Springer-Verlag.

T

- Tarkowski, A., 1966. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenetics*, 5, pp.394–400.
- Templado, C. et al. 1996. An analysis of human sperm chromosome aneuploidy. *Cytogenetics and cell genetics*, 74(3), pp.194–200. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8941373> [Accessed November 23, 2015].
- Templado, C., Navarro, J., et al. 1988. Human sperm chromosome studies in a reciprocal translocation t(2;5). *Human genetics*, 79(1), pp.24–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3366459> [Accessed November 28, 2015].
- Templado, C., Benet, J., et al. 1988. Human sperm chromosomes. *Human reproduction (Oxford, England)*, 3(2), pp.133–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3356768> [Accessed November 26, 2015].
- Templado, C. et al. 1990. Meiotic and sperm chromosome studies in a reciprocal translocation t(1;2)(q32;q36). *Human genetics*, 84(2), pp.159–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2298451> [Accessed November 24, 2015].
- Templado, C., Vidal, F. y Estop, A., 2011. Aneuploidy in human spermatozoa. *Cytogenetic and genome research*, 133(2-4), pp.91–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21282942> [Accessed November 23, 2015].
- Trappe, R. et al. 2002. A novel family-specific translocation t(2;20)(p24.1;q13.1) associated with recurrent abortions: molecular characterization and segregation analysis in male meiosis. *Cytogenetic and genome research*, 98(1), pp.1–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12584434> [Accessed November 28, 2015].

V

- Van Assche, E. et al. 1996. Cytogenetics of infertile men. *Human reproduction (Oxford, England)*, 11 Suppl 4, pp.1–24; discussion 25–6. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9147109> [Accessed November 19, 2015].
- Van Assche, E. et al. 1999. Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in-situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Molecular human reproduction*, 5(7), pp.682–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10381825> [Accessed November 28, 2015].
- Van Dyke, D.L. et al. 1983. The frequency and mutation rate of balanced autosomal rearrangements in man estimated from prenatal genetic studies for advanced maternal age. *American journal of human genetics*, 35(2), pp.301–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1685549ytool=pmcentrez&rentype=abstract> [Accessed November 27, 2015].
- Van Hummelen, P. et al. 1997. Meiotic segregation, recombination, and gamete aneuploidy assessed in a t(1;10)(p22.1;q22.3) reciprocal translocation carrier by three- and four-probe multicolor FISH in sperm. *American journal of human genetics*, 61(3), pp.651–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1715953ytool=pmcentrez&rentype=abstract> [Accessed November 24, 2015].
- Vogt, P.H. et al. 2008. The AZF proteins. *International journal of andrology*, 31(4), pp.383–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18462373> [Accessed November 20, 2015].
- Vozdova, M. et al. 2013. Balanced chromosomal translocations in men: relationships among semen parameters, chromatin integrity, sperm meiotic segregation and aneuploidy. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(3), pp.391–405. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3607677ytool=pmcentrez&rentype=abstract> [Accessed November 24, 2015].
- Vozdova, M. et al. 2011. Sperm and embryo analysis of similar t(7;10) translocations transmitted in two families. *Fertility and sterility*, 96(1), pp.e66–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21561609> [Accessed November 28, 2015].
- Vozdova, M. et al. 2008. Sperm fluorescence in situ hybridization study of meiotic segregation and an interchromosomal effect in carriers of t(11;18). *Human reproduction (Oxford, England)*, 23(3), pp.581–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18182397> [Accessed November 28, 2015].
- Vozdova, M. et al. 2009. Sperm meiotic segregation and aneuploidy in a 46,X,inv(Y),t(10;15) carrier: case report. *Fertility and sterility*, 92(5), pp.1748.e9–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19733349> [Accessed November 28, 2015].
- Vozdova, M. et al. 2012. The effect of the swim-up and hyaluronan-binding methods on the frequency of abnormal spermatozoa detected by FISH and SCSA in carriers of balanced chromosomal translocations. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27(3), pp.930–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22238111> [Accessed November 28, 2015].

W

- Warburton, D., 1984. Outcome of cases of de novo structural rearrangements diagnosed at amniocentesis. *Prenatal diagnosis*, 4 Spec No, pp.69–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6463034> [Accessed November 19, 2015].
- West, J.D., West, K.M. y Aitken, R.J., 1989. Detection of Y-bearing spermatozoa by DNA-DNA in situ hybridisation. *Molecular reproduction and development*, 1(3), pp.201–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2627369> [Accessed November 26, 2015].
- Wiland, E. et al. 2008. Successful pregnancy after preimplantation genetic diagnosis for carrier of t(2;7)(p11.2;q22) with high rates of unbalanced sperm and embryos: a case report. *Prenatal diagnosis*, 28(1), pp.36–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18186141> [Accessed November 28, 2015].
- Wiland, E. et al. 2007. The analysis of meiotic segregation patterns and aneuploidy in the spermatozoa of father and son with translocation t(4;5)(p15.1;p12) and the prediction of the individual probability rate for unbalanced progeny at birth. *Journal of andrology*, 28(2), pp.262–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17021336>

[Accessed November 28, 2015].

Winsor, E.J. et al. 1978. Meiotic analysis of a pericentric inversion, inv(7) (p22q32), in the father of a child with a duplication-deletion of chromosome 7. *Cytogenetics and cell genetics*, 20(1-6), pp.169–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/648176> [Accessed November 23, 2015].

World Health Organization. Task Force on Methods for the Regulation of Male Fertility. Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertil Steril* 1996;65:821–829.*

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1999, 128 p. Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED

Wyrobek, A.J. et al. 1990. Fluorescence in situ hybridization to Y chromosomes in decondensed human sperm nuclei. *Molecular reproduction and development*, 27(3), pp.200–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2078335> [Accessed November 23, 2015].

Y

Yakut, T. et al. 2003. Frequency of recombinant and nonrecombinant products of pericentric inversion of chromosome 1 in sperm nuclei of carrier: by FISH technique. *Molecular reproduction and development*, 66(1), pp.67–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874801> [Accessed November 2, 2015].

Yakut, T. et al. 2006. Meiotic segregation analysis of reciprocal translocations both in sperms and blastomeres. *American journal of medical genetics. Part A*, 140(10), pp.1074–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16596678> [Accessed November 28, 2015].

Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. y Rogers, B.J., 1976. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biology of reproduction*, 15(4), pp.471–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/974200> [Accessed November 24, 2015].

Yunis, J.J., 1976. High resolution of human chromosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 191(4233), pp.1268–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1257746> [Accessed October 6, 2015].

Z

Zirkin BR, Soucek DA, Chang TSK, P.S., 1985. in vitro and in vivo studies of mammalian sperm nuclear decondensation. *Gamet Research*, 11, pp.349–365.

ANEXO

En este anexo se adjuntan dos publicaciones derivadas directamente de este trabajo y una publicación de una revisión en la que sea participado.

P Cifuentes, J Navarro, L Míguez, J Egozcue, J Benet
Sperm segregation analysis of a complex chromosome rearrangement, 2;22;11, by whole chromosome painting
Cytogenetics and Cell Genetics Vol 82 (3-4): 204-209 (1998)

P Cifuentes, J Navarro, J Blanco, F Vidal, L Míguez, J Egozcue, J Benet
Cytogenetic analysis of sperm chromosomes and sperm nuclei in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) by in situ hybridisation
European Journal of Human Genetics 7: 231-238 (1999)

J Benet, M Oliver-Bonet, P Cifuentes, C Templado, J Navarro
Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review
Cytogenetic and Genome Research 111(3-4): 281-290 (2005)

PUBLICACION I

Sperm segregation analysis of a complex chromosome rearrangement, 2;22;11, by whole chromosome painting

Cytogenetics and Cell Genetics Vol 82 (3-4): 204-209
(1998)

CIFUENTES Piedad, **NAVARRO** Joaquina, **MÍGUEZ** Luz, **EGOZCUE** Josep, **BENET** Jordi

Sperm segregation analysis of a complex chromosome rearrangement, 2;22;11, by whole chromosome painting

P. Cifuentes,^a J. Navarro,^a L. Míguez,^c J. Egozcue,^b and J. Benet^a

^aUnitat de Biologia, Facultat de Medicina, and

^bUnitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Departament de Biologia Cel·lular i Fisiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, and

^cDiagnòstic Prenatal, Anexo Clinica Quirón, Barcelona (Spain)

Abstract. Using the human sperm–hamster oocyte fusion technique and whole chromosome painting, we studied sperm chromosome segregation in a male heterozygous for a complex chromosome rearrangement, 46,XY,-2,+der(2)t(2;11)(q13;q23),-11,+der(11)t(11;22)(q23;q11.2),-22,+der(22)t(2;22)(q13;q11.2). A total of 208 sperm complements were analyzed. The frequency of sperm carrying a normal or a balanced complement was 13.5% (9.62% and 3.85%, respectively). The frequency of unbalanced sperm was 86.5% (64.9% from 3:3 segregation, including 30 different types; 20.7% from 4:2 segrega-

tion, including 21 different types; and 0.96% from 5:1 segregation, including 2 different types). The sex ratio, determined in 134 sperm complements, did not differ from the expected 1:1 ratio. The results obtained in this study are compatible with the formation, during the synaptic process, of a complex hexavalent figure involving chromosomes 2, 11, and 22. The behavior and segregation of this complex figure would explain the high frequency (86.5%) of unbalanced complements observed in this carrier.

It is well known that balanced carriers of chromosome rearrangements have an increased risk of unbalanced offspring and spontaneous abortions. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa after human sperm penetration of hamster oocytes (Martin, 1983) allows a more accurate determination of the risk of unbalanced gametes than a theoretical estimation based on unbalanced products, because this estimation could be influenced by gamete or embryo selection. Studies in several newborn series indicate that the frequency of chromosome rearrangements in the general population is 0.189% (De Braekeleer and Dao, 1991). Carriers of chromosome rearrangements often show some degree of reproductive failure. A consequence of this failure is male infertility. Sper-

matogenic arrest resulting from the complexity of the meiotic configurations has been described as a possible origin of male infertility (Chandley, 1981). However, the consecutive transmission of complex chromosome rearrangements (CCRs) through several generations is also known (Meer et al., 1981; Farrell et al., 1994), indicating that fertility could depend on the type of chromosome rearrangement that occurred and on the characteristics of the chromosomes involved. The origin of CCRs remains unclear, but possible explanations are: (1) an initial event that leads to an unstable provisional rearrangement, with subsequent breaks becoming necessary to stabilize the karyotype (Lurie et al., 1994), or (2) the simultaneous occurrence of three or more breaks, with the possibility of different combinations of repair, including exchanges and restitution.

A large series of males carrying chromosomal rearrangements has been studied using the human sperm–hamster oocyte fusion system. The chromosome complements have been analyzed using classic cytogenetic techniques, such as Q-, G-, and R-banding (Templado et al., 1990; Goldman et al., 1992; Martin et al., 1992, 1994; Syms et al., 1992; Navarro et al., 1993; Estop et al., 1995; Martin and Spriggs, 1995). Analysis of human sperm chromosomes has shown that the percentage of

Supported by the Ministerio de Sanidad of Spain (FIS, 95/1741) and the Generalitat de Catalunya (CIRIT, 1997SGR 00030).

Received 20 April 1998; revision accepted 10 July 1998.

Request reprints from Dr. Piedad Cifuentes, Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, Departament de Biologia Cel·lular i Fisiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra (Spain); telephone: 34-935-81-11-75; fax: 34-935-81-10-25; e-mail: biolmed@cc.uab.es.

unbalanced gametes may vary among cases, indicating that each rearrangement represents a unique situation, because the frequencies of the different types of unbalanced gametes depend on the chromosomes involved, the breakpoints, and the number and location of chiasmata. To date, no chromosome studies of the segregation of CCRs have been carried out on human sperm. Only a synaptonemal complex study of a male carrying a complex translocation involving three chromosomes has been published (Saadallah and Hultén, 1985). In this report we present the results of sperm segregation analysis in a triple translocation using a whole chromosome painting technique.

Materials and methods

A male heterozygous for a 46,XY,-2,+der(2)t(2;11)(q13;q23),-11,+der(11)t(11;22)(q23;q11.2),-22,+der(22)t(2;22)(q13;q11.2) (Fig. 1) was ascertained after the birth of a daughter with a 47,XX,-2,+der(2)t(2;11)(q13;q23),+der(22)t(2;22)(q13;q11.2) karyotype (Fuster et al., 1997). His wife had previously had three spontaneous abortions and a phenotypically and chromosomally normal son (Fig. 2). We have analyzed peripheral blood by whole chromosome painting to confirm the CCR in all relatives who were presumed carriers (Fig. 2). A semen sample was obtained from this man, and aliquots of the sample were cryopreserved in liquid nitrogen. Consent was obtained from all family members studied, and the protocol of the study had been approved by the institutional ethics committee.

Gamete processing and chromosome preparation

Sperm chromosomes were obtained after culture of zona-free hamster oocytes penetrated by human spermatozoa according to a procedure previously described (Benet et al., 1991), with some modifications: (1) We used frozen-thawed samples. After removal of the cryoprotectant, motile spermatozoa were selected by a "swim up" procedure. (2) Capacitation of spermatozoa was induced by treatment with 10 μ M calcium ionophore A23187 in BWW medium, supplemented with 0.3% human serum albumin, for 10 min at 37°C (Alvarez et al., 1996). The spermatozoa were then centrifuged and resuspended in BWW medium supplemented with 3.3% human serum albumin (final concentration, 1.5–2.5 \times 10⁵ sperm/ml) and incubated for 2.0–2.5 h at 37°C in 5% CO₂. (3) We used vinblastine as an antimetabolic agent instead of Colcemid. Culture of fertilized ova was carried out for 5–6 h in F-10 medium. Afterward, eggs were transferred to F-10 medium with 0.1 μ g/ml vinblastine for 11–12 h. (4) Slides containing human sperm pronuclear complements were cryopreserved at -20°C until hybridization.

Probes and chromosome painting

Whole chromosome painting was performed using chromosome-specific probes for chromosomes 2, 11, and 22 and a centromere probe for the X chromosome (Vysis, Biovation). Slides with human sperm chromosome spreads were refixed with 1% paraformaldehyde in PBS, 50 mM MgCl₂ for 10 min and dehydrated in an ethanol series (70%, 95%, and 100%). The probe mixture was dropped onto each slide, a cover slip was added, and the cover slip was sealed with rubber cement. Combined denaturation was performed at 75°C for 5 min. After incubation, the slides were washed three times (10 min each) in 50% formamide, 2 \times SSC (pH 7.0) at 45°C, once in 2 \times SSC for 10 min at 45°C, and once in 2 \times SSC, 0.1% Tween 20 for 5 min at 45°C. They were then dehydrated in an ethanol series (70%, 95%, and 100%) and counterstained and mounted in antifade solution (Vector Laboratories) containing DAPI (Sigma).

Scoring and digital imaging storing

The slides were observed with an Olympus AX70 photomicroscope equipped with epifluorescence optics. The objectives used were a 100 \times 0.60–1.30 UPlanFI oil iris, a 60 \times 1.40 Plan Apo with oil, and a 20 \times 0.70 UPlan Apo with oil. The Olympus filter set included three simple filters for visualizing DAPI, FITC, and Cy3 fluorescence and a fourth triple filter for visualizing DAPI, FITC, and PI signals. The images were analyzed with the Cytovision system made by Applied Imaging.

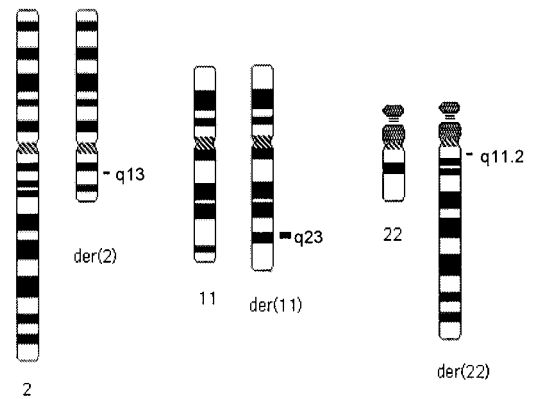


Fig. 1. Ideogram of the translocation.

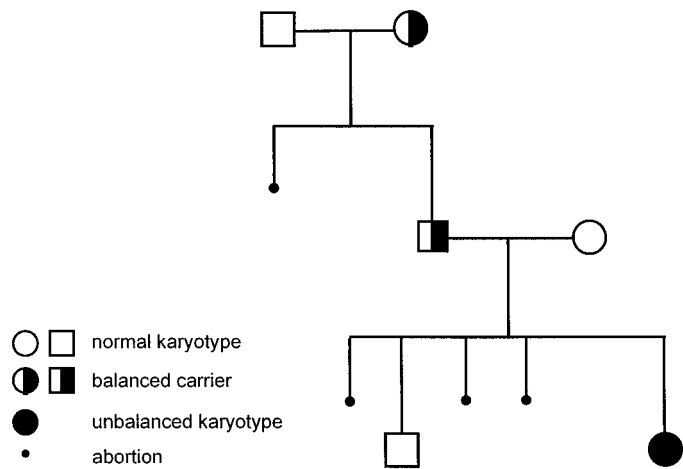


Fig. 2. Pedigree of the family.

Results

Segregation analysis was performed on a total of 208 sperm complements. We observed 32 types of 3:3 segregation (including normal, balanced, and unbalanced combinations), 21 types of 4:2 segregation (10 with two chromosomes, 9 with four chromosomes, and 2 with five chromosomes, resulting from a 4:2 segregation plus a nondisjunction in the second meiotic division of the normal chromosome 2 in one case and of the translocated chromosome 22;2 in another case), and two types of 5:1 segregation (one with one chromosome and one with six chromosomes, resulting from a 5:1 segregation plus a nondisjunction in the second meiotic division of the translocated 11;22 chromosome) (Table 1). The frequency of sperm carrying a normal or a balanced complement was 13.5% (9.62% and 3.85%, respectively). The frequency of unbalanced sperm was 86.5% (64.9% from 3:3 segregation, 20.7% from 4:2 segregation, and 0.96% from 5:1 segregation) (Table 2 and Fig. 3a–f). The sex ratio was determined in 134 sperm complements and did not differ from the expected 1:1 ratio.

Table 1. Different types of segregation observed^a

Segregation 3:3		
2, 11, 22	2, 2/11, 11	11, 22, 22 ^b
2/11, 11/22, 22/2	11/22, 22, 22/2	11, 22/2, 22/2 ^b
2, 2/11, 22/2	2, 2/11, 22	2/11, 11, 11 ^b
2, 11/22, 22	11, 11/22, 22/2	2, 2, 22 ^b
2/11, 11, 22/2	2, 11/22, 22/2	2/11, 22, 22 ^b
2, 11, 11/22	2/11, 11, 22	11/22, 22, 22 ^b
2/11, 22, 22/2	11, 22, 22/2	2, 22/2, 22/2 ^b
2, 2/11, 11/22	11, 11/22, 22	2/11, 2/11, 11/22 ^b
2, 22, 22/2	2, 11, 22/2	2, 2, 22/2 ^b
2/11, 11, 11/22	2/11, 11/22, 22	11/22, 11/22, 22/2
		2/11, 2/11, 22 ^b
		2/11, 11/22, 11/22 ^b
Segregation 4:2		
2, 2/11	2, 11/22, 22, 22/2	2/11, 11, 22, 22/2
2, 11	2/11, 11/22, 22, 22/2	2, 22/2
11/22, 22	2, 11/22	2, 2/11, 11, 22
2, 11, 22, 22/2	2, 2/11, 11, 22/2	11, 22
2/11, 22	2, 11, 11/22, 22/2	2, 2/11, 11/22, 22/2
2, 2/11, 11/22, 22	2/11, 22/2	2/11, 11/22
2, 2, 2/11, 11, 22/2 ^b	2/11, 11, 22, 22/2, 22/2 ^b	
Segregation 5:1		
2, 2/11, 11, 11/22, 11/22, 22 ^b		
11/22		

^a Segregants: 2/11 = der(2)t(2;11)(q13;q23); 11/22 = der(11)t(11;22)(q23;q11.2); 22/2 = der(22)t(2;22)(q13;q11.2).

^b Disomic complements.

Table 2. Meiotic segregation of sperm chromosomes in a triple translocation

Translocation carrier	Segregation	Type	Number	Percent	
t(2;22;11)(q13;q11.2;q23)	Alternate	Normal	20	9.62%	
		Balanced	8	3.85%	
	Subtotal: balanced			28	13.5%
	Adjacent ^a	3:3	135	64.9%	
		4:2	43	20.7%	
		5:1	2	0.96%	
		6:0	—	—	
	Subtotal: unbalanced			180	86.5%
	Total			208	100%

^a Different combinations of adjacent I and adjacent II segregation.

Discussion

This is the first chromosome segregation analysis in a carrier of CCR using the hamster system. Characterization of the sperm segregation products has been done by whole chromosome painting, thus allowing simple, reliable identification of the normal and the derivative chromosomes. Although CCR has been considered extremely infrequent, the re-evaluation of previous cases using FISH has resulted in the identification of an increasing number of CCRs (Smart et al., 1989, Hertz et al., 1993, Ohta et al., 1993, Fuster et al., 1997). Thus, a combination of classical and molecular cytogenetic techniques must be

used for the proper characterization of chromosome abnormalities (see Fuster et al., 1997).

CCRs originate from the abnormal repair of three or more breakpoints. Although most CCRs are de novo, in our case the rearrangement was inherited through at least three generations, and while its origin could not be determined, it was traced as far back as the paternal grandmother. This CCR may have originated from two coincidental reciprocal translocations, because the breakpoints in chromosomes 11 and 22 coincide with the breakpoints involved in the most common human reciprocal translocation, t(11;22)(q23;q11.2) (Fraccaro et al., 1980). If the production of these two breaks coincided with the presence of a third break in chromosome 2, the two possible repair pathways could have produced the common t(11;22) and the restitution of chromosome 2 (plus two other types of simple reciprocal translocations) or two different triple translocations, one observed by us—t(2;11)der(2), t(11;22)der(11), and t(2;22)der(22)—and the other t(2;11)der(11), t(11;22)der(22), and t(2;22)der(2).

Carriers of the t(11;22) frequently produce viable unbalanced offspring (Lockwood et al., 1989; Chandley, 1992; Simi et al., 1992; Petkovic et al., 1996). These children are trisomic for the centric segment of chromosome 22 (22pter→q11) and for the distal portion of chromosome 11 (11q23→qter) and result from the 3:1 segregation of the two normal chromosomes 11 and 22 and the der(22). In the family studied by us, the affected daughter was also trisomic for these same segments and had the characteristic phenotype of the unbalanced children born to carriers of the common t(11;22), but in our case the child resulted from a 4:2 segregation of the hexavalent (Fuster et al., 1997).

In our study, we found a large number of segregation products (55 combinations, including normal, balanced, and unbalanced). These results are best explained by the formation of a hexavalent (Fig. 4), although we have not been able to confirm it through synaptonemal complex studies because the patient refused a testicular biopsy. However, Saadallah and Hultén (1985) analyzed the synaptonemal complex of a CCR carrier (2;4;9) and found a hexavalent in 25 of the 26 cells studied.

Previous studies of meiotic chromosomes and sperm chromosomes in carriers of reciprocal translocation have confirmed the correlation existing between the formation of chain tetra- valents and a tendency toward 3:1 segregation, as well as between the formation of ring tetra- valents and a tendency toward 2:2 segregation (Templado et al., 1990). In our case, a 3:3 segregation was found in 78.4% of the sperm complements analyzed, while 21.6% resulted from 4:2 and 5:1 segregations. The hexavalent figure resulting from the chromosomes involved in this translocation could easily open at 22p to produce a chain hexavalent, because 22p is the only region involved with a reduced recombination rate (Fig. 4). The resulting chain hexavalent produces 4:2 and 5:1 segregations. In fact, the affected daughter of the carrier had a karyotype resulting from a 4:2 segregation with migration to the same pole of the derivative chromosome 2, the normal chromosome 11, the normal chromosome 22, and the derivative chromosome 22, with the two homologous centromeres of chromosome 22 included in

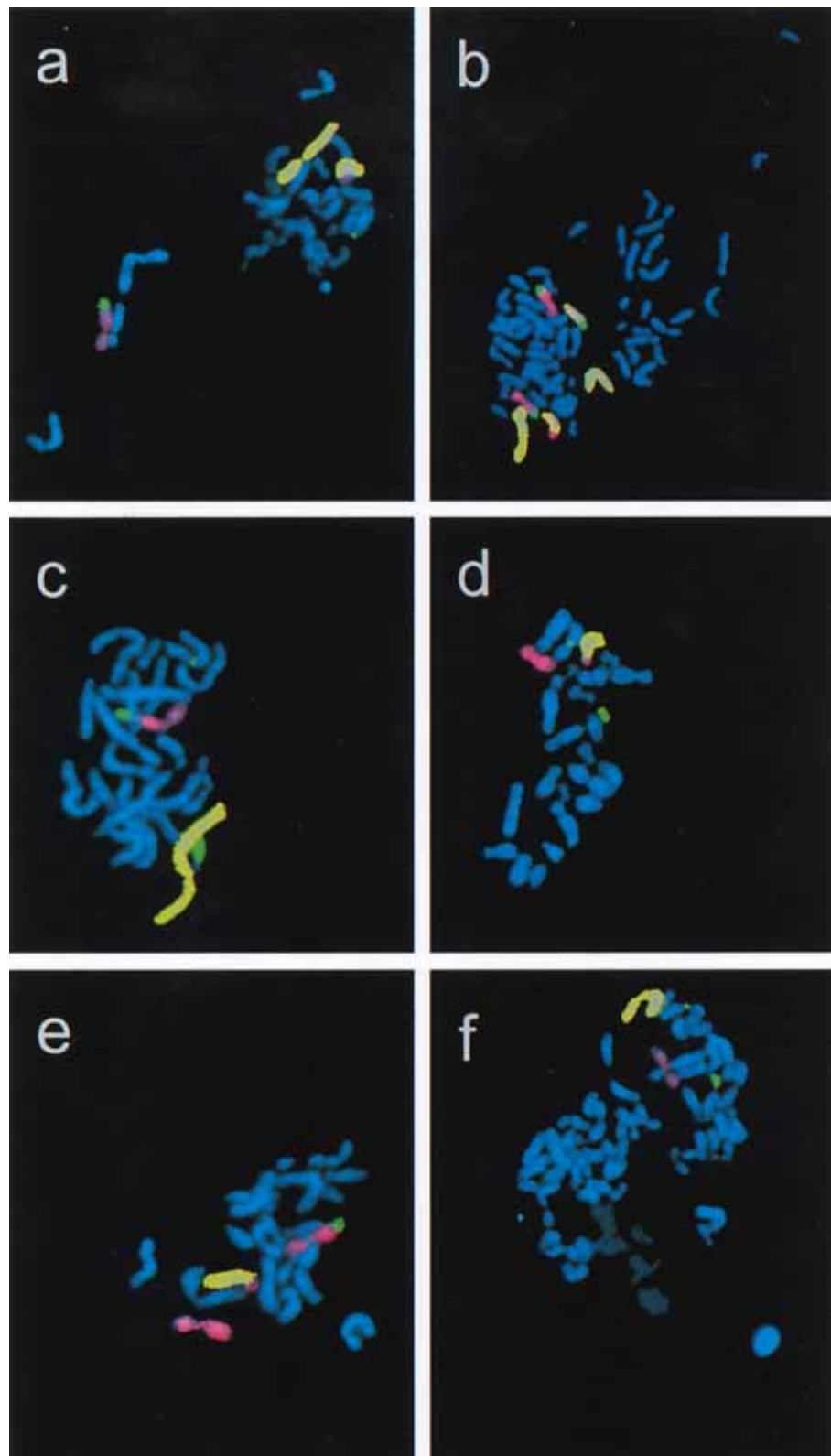


Fig. 3. Sperm chromosome complements containing different segregation products. Whole chromosome painting of chromosome 2 (yellow), 11 (red), and 22 (green) was performed on sperm complements. The centromere of the X chromosome is shown (green) when present. Chromosome complements containing: **(a)** chromosomes 2, der(2), der(11), and X; **(b)** two chromosome complements, one with chromosomes 2, der(11), and der(22), and the other with chromosomes 2, der(2), and der(11); **(c)** chromosomes 2, der(11), 22, and X; **(d)** chromosomes der(2), 11, 22, and X; **(e)** chromosomes der(2), 11, and der(11); and **(f)** chromosomes 2, 11, 22, and X.

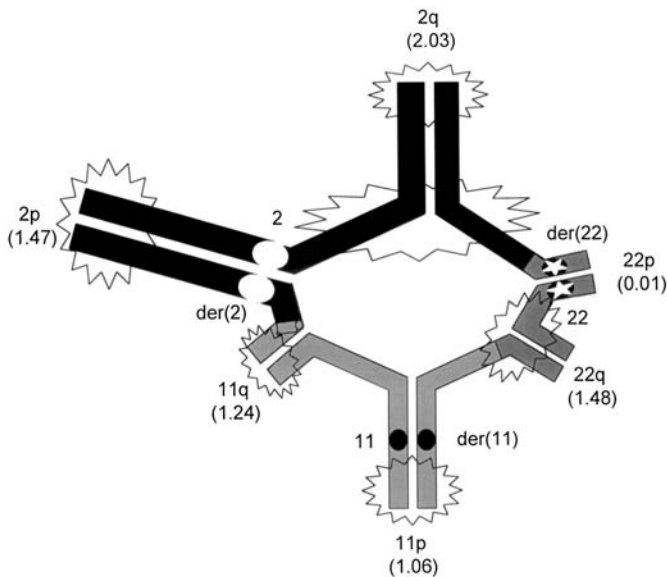


Fig. 4. Hexavalent figure at meiosis I. High recombination regions and mean chiasma frequency for each arm according to Laurie and Hultén (1985a, b) are indicated. The hexavalent could open at 22p.

the segregation product. This type of segregation was the most frequent type of 4:2 segregation observed (7/43, or 16.3%).

In our study we also found 18 complements with disomies for the chromosomes involved in the translocation. The different types of disomy observed are shown in Table 1, and in five cases included the two centromeres of chromosome 2, in another five cases the two centromeres of chromosome 11, and in

eight cases the two centromeres of chromosome 22. The origin of these complements can be explained by a 4:2 segregation followed by nondisjunction at meiosis II, or by the production of a chiasma in the interstitial segments of the hexavalent followed by a 3:3 segregation. In three complements (those deriving from a 4:2 or a 5:1 segregation) the disomy could only originate through nondisjunction at the second meiotic division. In the other cases, since the interstitial segments are long enough to allow the formation of chiasmata, but 4:2 segregations are also frequent in this patient (20.7%) and nondisjunction at meiosis II is more frequent in the male, none of the above hypotheses can be discarded (Antonarakis et al., 1992).

The results obtained from sperm chromosome studies in this patient indicate that the theoretical risk of producing unbalanced offspring is 86.5%. This high risk is compatible with the formation of a hexavalent and is higher than the frequency of unbalanced products detected in carriers of single reciprocal translocations (from 19% to 77%; reviewed by Estop et al., 1995, and Martin and Spriggs, 1995; see also Pellestor et al., 1997). However, in a carrier of two independent reciprocal translocations, Burns et al. (1986) found 87% unbalanced gametes. The results suggest that the risk of producing unbalanced offspring depends not only on the length of the translocated segments, the location of the breakpoints, and the recombination characteristics of the affected segments, but also on the number of chromosomes involved in the reorganization.

Acknowledgements

We thank Angels Niubó for technical assistance.

References

- Alvarez R, Tusell L, Genescà A, Miró R, Benet J, Caballín MR, Egozcue J: Chromosome aberrations in human spermatozoa treated with Ca^{2+} ionophore A23187. *Mol hum Reprod* 2:481–484 (1996).
- Antonarakis SE, Petersen MB, McInnis MG, Adelsberger PA, Schinzel AA, Binkert F, Pangalos C, Raoul O, Slaugenhaupt SA, Hafez M, Cohen MM, Roulson D, Schwartz S, Mikkelsen M, Tranebjaerg L, Greenberg F, Hoar DI, Rudd NL, Warren AC, Metaxotou C, Bartsocas C, Chakravarti A: The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am J hum Genet* 50:544–550 (1992).
- Benet J, Navarro J, Genescà A, Egozcue J, Templado C: Chromosome abnormalities in human spermatozoa after albumin or TEST-yolk capacitation. *Hum Reprod* 3:369–375 (1991).
- Burns JP, Kadoru PKR, Alonso ML, Chaganti RSK: Analysis of meiotic segregation in a man heterozygous for two reciprocal translocations using the hamster in vitro penetration system. *Am J hum Genet* 38:945–964 (1986).
- Chandley AC: Male infertility and meiosis in man, in Frajese G, Hafez ESE, Conti C, Fabbrini A (eds): *Oligozoospermia: Recent Progress in Andrology*, pp 31–82 (Raven Press, New York 1981).
- Chandley AC: Involvement of 3:1 disjunction in the common reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11.2). *Hum Genet* 90:191–192 (1992).
- De Braekeleer M, Dao T-N: Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 2:245–250 (1991).
- Estop AM, Van Kirk V, Ciepły K: Segregation analysis of four translocations, t(2;18), t(3;15), t(5;7), and t(10;12), by sperm chromosome studies and a review of the literature. *Cytogenet Cell Genet* 70:80–87 (1995).
- Farrell SA, Summers AM, Gardner HA, Uchida IA: Balanced complex chromosome rearrangement ascertained through prenatal diagnosis. *Am J med Genet* 52:360–361 (1994).
- Fuster C, Míguez L, Miró R, Rigola MA, Perez A, Egozcue J: Familial complex chromosome rearrangement ascertained by in situ hybridisation. *J med Genet* 34:164–166 (1997).
- Fracarro M, Lindsten J, Ford CE, Iselius I: The 11q;22q translocation: a European collaborative analysis of 43 cases. *Hum Genet* 56:21–51 (1980).
- Goldman ASH, Martin RH, Johannisson R, Gould CP, Davison EV, Emslie JE, Burn J, Hultén MA: Meiotic and sperm chromosome analysis in a male carrier of an inverted insertion (3;10)(q3.2;p14p13). *J med Genet* 29:460–464 (1992).
- Hertz B, Brandt CA, Petersen MB: Application of molecular and cytogenetic techniques to the detection of a de novo unbalanced t(11q;21q) in a patient previously diagnosed as having monosomy 21. *Clin Genet* 44:89–94 (1993).
- Laurie DA, Hultén MA: Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann hum Genet* 49:189–201 (1985a).
- Laurie DA, Hultén MA: Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Ann hum Genet* 49:203–214 (1985b).
- Lockwood DH, Farrier A, Hecht F, Allanson J: Not all chromosome imbalance resulting from the 11q;22q translocation is due to 3:1 segregation in first meiosis. *Hum Genet* 83:287–288 (1989).
- Lurie JW, Wulfsberg EA, Prabhakar G, Rosenblum-Vos LS, Supovitz KR, Cohen MM: Complex chromosome rearrangements: some breakpoints may have cellular adaptive significance. *Clin Genet* 46:244–247 (1994).
- Martin RH: A detailed method for obtaining preparations of human sperm chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 35:252–256 (1983).
- Martin RH, Chernos JE, Lowry RB, Pattinson HA, Barclay L, Ko E: Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 1. *Hum Genet* 93:135–138 (1994).

- Martin RH, Ko E, Hildebrand K: Analysis of sperm chromosome complements for a man heterozygous for a Robertsonian translocation, 45,XY,(q15;q22). *Am J hum Genet* 43:855–857 (1992).
- Martin RH, Spriggs EL: Sperm chromosome complements in a man heterozygous for a reciprocal translocation, 46,XY,t(9;13)(q21.1;q21.2). *Clin Genet* 47:42–46 (1995).
- Meer B, Wolff G, Back E: Segregation of a complex rearrangement of chromosomes 6, 7, 8, and 12 through three generations. *Hum Genet* 58:221–225 (1981).
- Navarro J, Benet J, Martorell MR, Templado C, Egozcue J: Segregation analysis in a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 7 (p13;q36) by sperm chromosome studies. *Am J hum Genet* 53:214–219 (1993).
- Ohta T, Tohma T, Soejima H: The origin of cytologically unidentifiable chromosome abnormalities: six cases ascertained by targeted chromosome-band painting. *Hum Genet* 92:1–5 (1993).
- Pellestor F, Girardet A, Caignet L, Andréo B, Lefort G, Charlier JP: Cytogenetic analysis of meiotic segregation in sperm from two males heterozygous for reciprocal translocations using PRINS and hamster technique. *Cytogenet Cell Genet* 78:202–208 (1997).
- Petkovic I, De Capoa A, Giancotti P, Barisic I: Unusual segregation of t(11;22) resulting from crossing-over followed by 3:1 disjunction at meiosis I. *Clin Genet* 50:515–519 (1996).
- Saadallah N, Hultén M: A complex three breakpoint translocation involving chromosomes 2, 4 and 9 identified by meiotic investigations of a human male ascertained for subfertility. *Hum Genet* 71:312–320 (1985).
- Simi P, Ceccarelli M, Barachini A, Florida G, Zuffardi O: The unbalanced offspring of the male carriers of the 11q;22q translocation: nondisjunction at meiosis II in a balanced spermatocyte. *Hum Genet* 88:482–483 (1992).
- Smart RD, Retief AE, Overhauser J: Confirmation of a balanced chromosomal translocation using molecular techniques. *Prenat Diagn* 9:505–13 (1989).
- Syms RM, Martin RH: Meiotic segregation of a 21;22 Robertsonian translocation. *Hum Reprod* 7:825–829 (1992).
- Templado C, Navarro J, Requena R, Benet J, Ballesta F, Egozcue J: Meiotic and sperm chromosome studies in a reciprocal translocation t(1;2)(q32;q36). *Hum Genet* 84:159–162 (1990).

PUBLICACION II

Cytogenetic analysis of sperm chromosomes and sperm nuclei in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) by in situ hybridisation

European Journal of Human Genetics 7: 231-238
(1999)

CIFUENTES Piedad, **NAVARRO** Joaquina, **BLANCO** Joan, **VIDAL** Francesca **MÍGUEZ** Luz,
EGOZCUE Josep, **BENET** Jordi



ARTICLE

Cytogenetic analysis of sperm chromosomes and sperm nuclei in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) by *in situ* hybridisation

P Cifuentes¹, J Navarro¹, J Blanco², F Vidal², L Míguez³, J Egozcue² and J Benet¹

¹Unitat de Biologia, Facultat de Medicina

²Unitat de Biologia Cellular, Facultat de Ciències, Departament de Biologia Cellular i Fisiologia, Universitat Autònoma de Barcelona

³Diagnòstic Prenatal, Anexe Clínica Quirón, Barcelona, Spain

We have studied the meiotic segregation of a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) in a male carrier, using the human sperm–hamster oocyte fusion technique and the whole chromosome painting. A total of 296 sperm complements were analysed by dual chromosome painting. The frequencies of alternate, adjacent-1, adjacent-2 and 3:1 segregation were 49.7%, 32.4%, 16.2% and 1.7% respectively. Aneuploidy frequencies for chromosomes not involved in the translocation were determined by FISH on decondensed sperm heads using probes from chromosomes X, Y, 6, 18 and 21. A total of 20118 spermatozoa was analysed, 10201 by two-colour FISH (probes for chromosomes 6 and 21) and 9917 by three-colour FISH (probes for chromosomes X, Y, and 18). There was no evidence of an interchromosomal effect, since disomy frequencies were within the range of normal controls.

Keywords: sperm chromosome; meiotic segregation; chromosome rearrangements; *in situ* hybridisation; whole chromosome painting; offspring risk

Introduction

Reciprocal translocations are the most frequent structural abnormalities reported in newborns (0.092%).¹ Balanced carriers of a reciprocal translocation have an increased risk of producing unbalanced offspring and spontaneous abortions. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa after penetration of hamster oocytes,² allows us to determine the

predominant segregation types and to establish better the risk for the offspring. To date 39 carriers of reciprocal translocations have been studied using this system and analysed by classical cytogenetic techniques, such as Q-banding, G-banding or R-banding (reviewed by Martin,³ Estop *et al.*,⁴ Martin and Spriggs⁵). The analysis of human sperm chromosomes has shown that the percentage of unbalanced gametes may vary between 19% and 87%, indicating that the frequencies of the different types of unbalanced gametes depend on the chromosomes involved, the break-points, and the number and location of chiasmata.

In recent years, some segregation studies of reciprocal translocation carriers have been accomplished by the use of fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) in

Correspondence: Piedad Cifuentes Moraleda, Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, Departament de Biologia Cellular i Fisiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain. Tel: 34 935 81 11 75; Fax: 34 935 81 10 25; E-mail: biolmed@cc.uab.es

Received 30 June 1998; revised 22 September 1998; accepted 30 September 1998

decondensed sperm nuclei.^{6,7} However, with this approach it is not possible to distinguish individually all segregation products. The reason is that even when locus-specific or painting probes are used, some segregation products produce identical signals. The use of a higher number of probes improves the results,^{8,9} but still some technical difficulties may be encountered.⁹ On the other hand, the relatively fast analysis of a higher number of cells makes this technique ideal for the study of aneuploidy and possible interchromosomal effect.¹⁰

In this report we describe the results of a sperm segregation analysis in sperm chromosomes using a whole chromosome painting technique and the results of the study of aneuploidy by FISH in decondensed sperm in a carrier of a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32).

Materials and Methods

A man with a 46, XY, -5, -7, +t(5;7)(q21;q32) karyotype was ascertained after his wife underwent amniocentesis for advanced maternal age. The prenatal diagnostic indicate that the child carried the same balanced translocation as his father. There was a history of miscarriage in the father's family. A semen sample was obtained from this man, aliquoted and cryopreserved in liquid nitrogen. Consent was obtained from all family members studied, and the protocol of the study has been approved by our institutional ethics committee.

Preparation of Sperm Chromosomes

Sperm chromosomes were obtained after culture of zona-free hamster oocytes penetrated by human spermatozoa according to a procedure described elsewhere¹¹ with some modifications:¹²

- 1) we used thawed samples;
- 2) capacitation of spermatozoa was increased by treatment with ionophore A23187;
- 3) we used vinblastine as an antimetabolic instead of colcemid.

Slides were cryopreserved at -20°C until hybridisation.

Preparation of Sperm Nuclei

The semen sample to be used was thawed and washed with 0.9% NaCl to eliminate the cryoprotectant. The sample was fixed and decondensed following the protocol described by Vidal *et al.*¹³ Slides were preserved at -20°C until hybridisation.

Probes and Hybridisation Procedure

Whole chromosome painting was performed using chromosome-specific probes for chromosomes 5 and 7 (Vysis Inc, Downers Grove, IL, USA; Biovation Ltd, Aberdeen, UK). Slides with human sperm chromosome spreads were refixed

with 1% paraformaldehyde in PBS/50 mM MgCl₂ for 10 min and dehydrated in an ethanol series (70%, 95% and 100%). The probe mixture was dropped on to each slide, a coverslip was added and sealed with rubber cement. Combined denaturation was performed at 75°C for 5 min. After incubation, post-hybridisation washes were performed according to manufacturer's instructions. Slides were dehydrated in an ethanol series (70%, 95% and 100%) and counterstained and mounted with antifade solution (Vector Lab Inc, Burlingame, CA, USA) containing DAPI (Sigma, Madrid, Spain).

Two and three-colour FISH were performed in decondensed sperm nuclei, using centromere and locus specific probes. Two-colour FISH was performed to determine the frequency of disomy for autosomes, with a centromeric probe for chromosome 6, directly labelled with Spectrum Green (CEP 6, Vysis Inc.) used as a ploidy and hybridisation control, and a locus-specific probe for chromosome 21, directly labelled with Spectrum Orange (LSI 21, Vysis Inc.). To determine the frequency of disomy for the sex chromosomes, three-colour FISH was performed using centromere probes directly labelled for chromosome X (CEP X Spectrum Green, Vysis Inc.), chromosome Y (CEP Y Spectrum Orange, Vysis Inc.) and chromosome 18, (CEP 18 Spectrum Aqua, Vysis Inc.) used as a ploidy and hybridisation control. The hybridisation protocol followed manufacturer's instructions.

Scoring and Digital Imaging Storage

Slides were observed with an Olympus AX70 photomicroscope (Olympus Optical Co., Hamburg, Germany) equipped with epifluorescence optics. The Olympus filter set included three simple filters for visualising DAPI, FITC and Cy3 fluorescence, and a fourth triple filter for visualising DAPI/FITC/PI. The images were analysed with a Cytovision system (Applied Imaging, Sunderland, UK).

For sperm head analysis, only nuclei unequivocally identified as decondensed sperm because of their oval morphology and/or presence of a tail were scored. To decrease the subjectivity of the observations, the criteria described by¹⁴ were used.

Data were statistically analysed by an InStat 2.01 program (Graph Pad, San Diego, CA, USA) using a χ^2 test.

Results

Segregation analysis was performed on a total of 296 sperm complements by dual chromosome painting. All possible 2:2 and some 3:1 segregations were observed (Figure 1 a-e). Of the 296 sperm complements, 147 (49.7%) resulted from alternate segregation, of which 83 (28.0%) contained normal chromosomes and 64 (21.6%) the balanced translocation; 96 (32.4%) complements resulted from adjacent-1 segregation, 48 (16.2%) from adjacent-2 segregation and 5 (1.7%) from 3:1 segregation (Table 1). In the products of alternate segregation, the frequency of complements containing normal chromosomes was not significantly different from the frequency of complements with a balanced translocation (χ^2 test, $P = 0.3843$). The theoretical risk

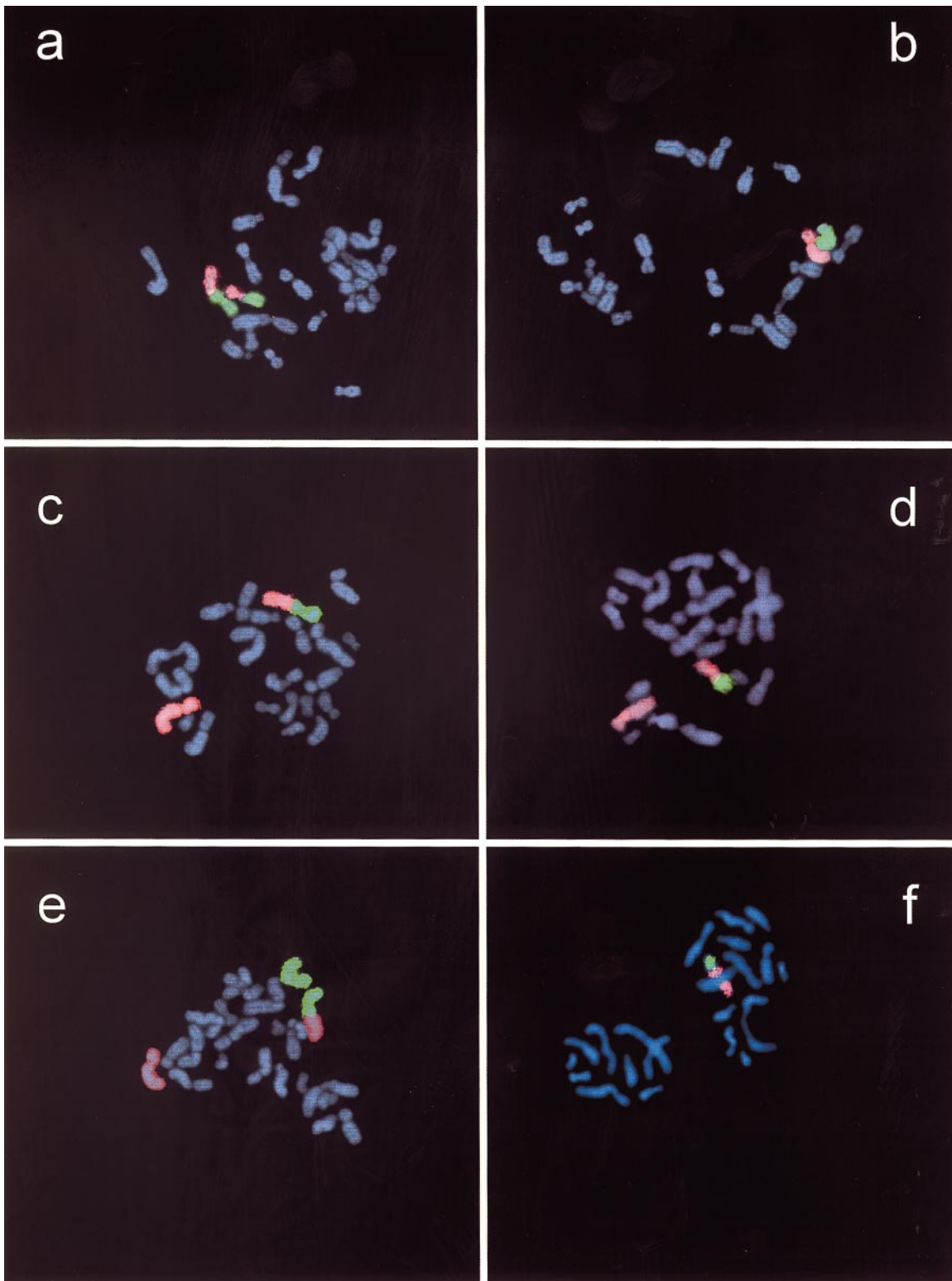


Figure 1 Sperm chromosome complements containing different segregation products. Whole chromosome painting of chromosome 5 (red) and 7 (green). **a**) Balanced. **b**) Normal. **c**) Adjacent 1. **d**) Adjacent 2. **e**) 3:1 containing two normal chromosomes 5 and 7 and a translocated chromosome der(7); this metaphase contains only 23 chromosomes because chromosome 19 is missing. **f**) 3:1 containing a single chromosome der(5).

of unbalanced offspring produced by this carrier is 50.3% (Table 1).

Aneuploidy frequencies of chromosomes not involved in the translocation were determined by FISH on decondensed sperm nuclei. Centromere probes from chromosomes X, Y, 6, 18, and a locus specific probe for chromosome 21 were used. A total of 20 118 spermatozoa, from the t(5;7) carrier, was analysed, 10 201 by two-colour FISH and 9917 by three-colour FISH. A total of 28 044 spermatozoa, from nine control donors, analysed by two-colour FISH, and 50 572 spermatozoa, from five control donors, analysed by three-colour FISH^{14,15} were used as controls for this study. The frequencies of gonosomal and autosomal hyperploidy detected in the translocation carrier and in the controls are shown in Table 2. There were no statistically significant differences in the frequencies of autosomal disomy between the controls and the translocation carrier. For sex chromosome disomies, sig-

Table 1 Meiotic segregation of sperm chromosomes in a t(5;7)

Segregation	Type	Number	Percent
Alternate	normal	83	28.0%
	balanced	64	21.6%
Subtotal: balanced		147	49.7%
Adjacent 1	5;der(7)	47	15.9%
	7;der(5)	49	16.6%
Adjacent 2	5;der(5)	29	9.8%
	7;der(7)	19	6.4%
3:1		5	1.7%
Subtotal: unbalanced		149	50.3%
Total		296	100%

Table 2 Frequency of hyperploidy and diploid sperm

Chromosome constitution	t(5;7) %	Controls % (±SD)	χ^2
Normal:			
23 X	50.96	49.98(±0.91) ^b	
23 Y	47.28	48.70(±1.18) ^b	
Gonosomal hyperploidy:			
X-X-18	0.01	0.10(±0.04) ^b	
Y-Y-18	0.07	0.16(±0.06) ^b	
X-Y-18	0.07	0.11(±0.05) ^b	
Total	0.15	0.37	0.0039
Autosomal hyperploidy:			
6-6-21	0.09	0.13(±0.11) ^a	0.8159
18-18-X or 18-18-Y	0.03	0.10(±0.03) ^b	0.0614
6-21-21	0.23	0.37(±0.12) ^a	0.1937
Diploidy:			
X-X-18-18 or Y-Y-18-18 or X-Y-18-18	0.09	0.25(±0.15) ^b	0.0028
6-6-21-21	0.11	0.27(±0.10) ^a	0.0039

^aRef. 14; ^bRef. 15

nificantly lower frequencies were observed in the translocation carrier than in controls (Table 2). The total frequency of diploid sperm in the translocation carrier (0.1%) was also lower than in controls (0.26%) (Table 2). The sex ratio was determined in 9917 cells and was not different from the expected 1:1 (χ^2 test, $P = 0.8153$).

Discussion

The production of normal, balanced or unbalanced gametes in carriers of reciprocal translocations depends on the location of the breakpoints and on the characteristics of the chromosomes involved (length, presence or absence of heterochromatin, chiasma formation).¹⁶⁻¹⁹ In most cases, such as the one studied by us, there is a predominance of 2:2 segregations, corresponding mainly to the alternate and adjacent 1 types as observed in those translocations that produce ring configurations.²⁰ The incidence of 3:1 segregations²⁰ is directly related to the formation of open configurations, such as chains; 4:0 segregations have seldom been described in sperm chromosome studies,^{3,17,21} and their products have never been found in newborns. FISH studies in sperm have been unable, so far, to differentiate between 4:0 segregations and diploid sperm because the number of probes used was limited to the chromosomes involved in the translocation.

So far, including the present work, 40 reciprocal translocations have been studied using the human-hamster system, confirming the tendencies indicated

above. Most segregations have been of the 2:2 type with mean frequencies of 45.6% for alternate and 37.1% for adjacent 1 segregation.⁵ Furthermore, epidemiological studies¹⁸ indicate that most cases of unbalanced offspring result from adjacent 1 segregations. This is not unexpected^{19,22} because the adjacent 2 and 3:1 types combine abnormal segregation and non-disjunction and, other than to the configuration of the tetravalent, may also be related to problems in the resolution of chiasmata.⁸ The mean risk of producing unbalanced offspring has been established at 54.4%²² which is comparable to the figure obtained by us in this case (50.3%).

However, these frequencies are much higher than the ones observed at birth²³ and underline the problems encountered when evaluating the risk at birth vs evaluating it at conception. Each estimate is valid on its own, and they should not be mixed, much less confused.

One further translocation affecting chromosomes 5 and 7 has been described in the literature; it was a t(5;7)(q13;p15.1),³ and the results of segregation were different from those observed in our case: 40.2% alternate, 26.2% adjacent 1, 16.6% adjacent 2 and 17.0% 3:1 segregation. However, the breakpoints in these two translocations were different and, based on the distribution of hot regions for chiasma formation,^{24,25} these differences could be related to the probable formation of interstitial chiasmata in our case and to the probable absence of interstitial chiasmata in the other (Figure 2).

As for the possible existence of preferential segregation products in spermatozoa, recently Van Hummelen *et al*,⁸ in a study of decondensed sperm heads using multicolour FISH, detected a higher number of spermatozoa containing short translocated segments after adjacent 1 segregation or its normal equivalent after adjacent 2 segregation. This distortion was explained by the authors⁸ as the non-resolution of chiasmata at meiosis I that would be directly proportional to the length of the translocated segment. However, a study of the segregation products in sperm chromosomes of translocation carriers (Table 3) does not support a distortion towards sperm carriers of short translocated segments (assuming the proportion between products = 1, $\chi^2 = 10.531$ for 18 freedom degree, $P = 0.9132$). Furthermore, a recent study⁹ on decondensed sperm heads in the carrier of a t(3;11) shows the opposite, ie a distortion towards products containing the longer translocated segment. Thus, more cases will

have to be studied to determine whether there is a general tendency towards the inclusion of one or other type of translocation product in viable sperm, the distribution is random, or it varies with each individual case.

For some time it has been suggested that interchromosomal effects²⁶ could increase the rate of other chromosome abnormalities, such as regular non-disjunction in carriers of structural chromosome reorganizations. However, among the 40 reciprocal translocations analysed so far using the human-hamster system, this interchromosomal effect has only been observed in the carrier of a double translocation.¹⁷ Although only 23 metaphases were studied, this patient had a 70% increase in the frequency of chromosome abnormalities (numerical) not directly related to the translocations.

Interchromosomal effects are difficult to evaluate, because one has to study at least 150–400 sperm metaphases to observe a three to two-fold increase in disomies,¹⁹ and so far most published cases are based on the analysis of fewer than 150 metaphases. Therefore to determine the possible existence of an interchromosomal effect in our patient, we analysed decondensed sperm heads by FISH using autosomal (6, 18, 21) and gonosomal (X, Y) fluorescent probes, combining 6 and 21 on the one hand and 18, X and Y on the other. In this way it is possible to analyse thousands of sperm heads. Although the chromosomes analysed (21, X and Y) are those most frequently involved in viable non-disjunction events²⁷ we did not find any increase in the frequency of disomy for any of the chromosomes analysed (21, X, Y) or for the controls used (6, 18). We did not find any significant increase in the level of diploidy either, although it seems to be the most common anomaly when meiosis is disrupted.²⁸ Interchromosomal effects such as those producing meiotic arrest or meiotic disruption resulting in diploidy could be related to more asymmetrical reorganizations or to other meiotic problems such as synaptic anomalies, resulting in higher degrees of unbalance, be they viable (diploidy) or unviable (apoptosis and meiotic arrest).

Acknowledgements

We thank Angels Niubó for technical assistance. This work was performed with financial support from Ministerio de Sanidad of Spain (FIS, 95/1741; FIS, 96/1992-01); our unit has also received support from the Generalitat de Catalunya (CIRIT, 1995SGR 00478).

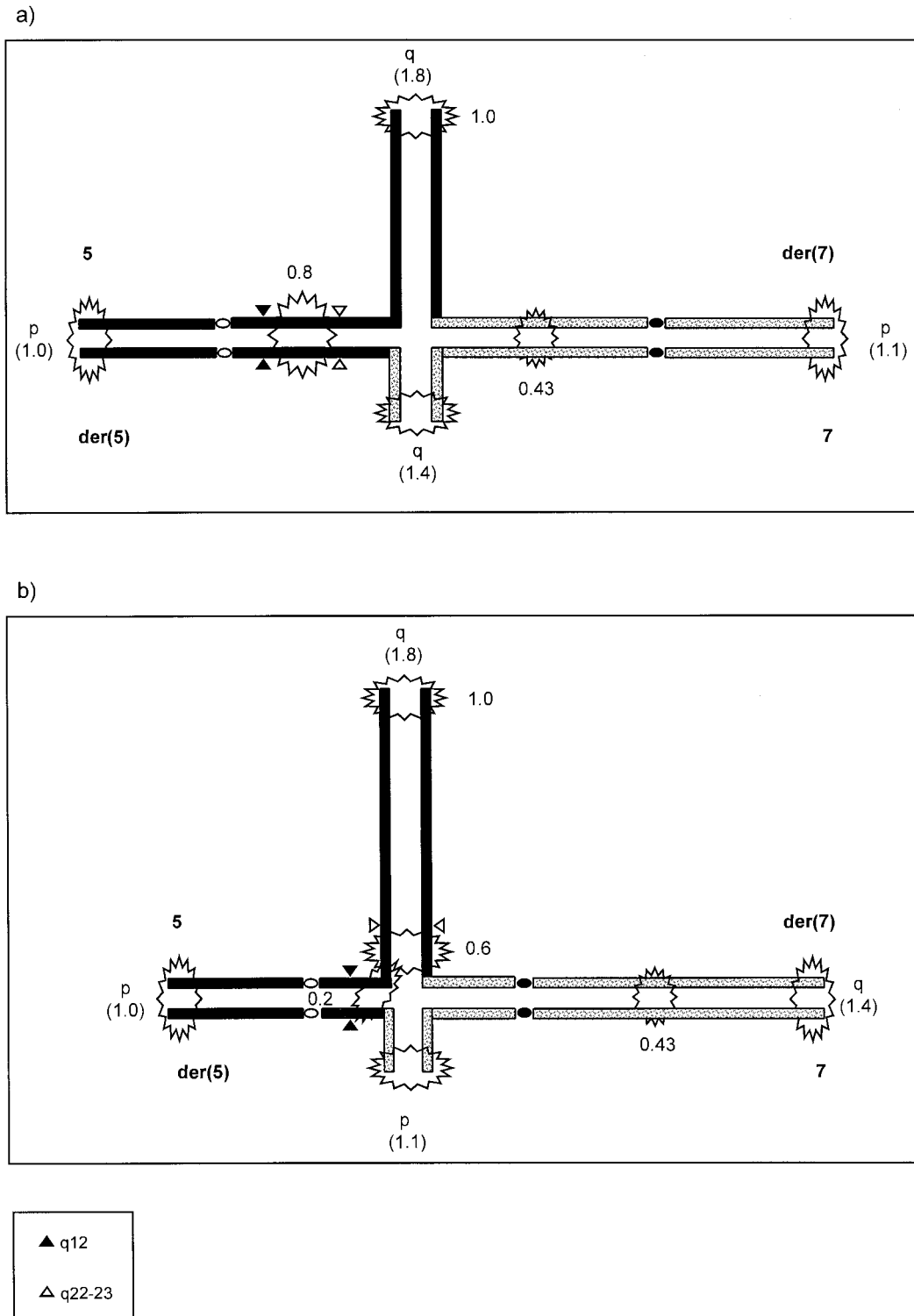


Figure 2 Tetraivalent figure at meiosis I **a)** for $t(5;7)(q21;q32)$ and **b)** for $t(5;7)(q13;p15.1)$. High recombination regions and mean chiasma frequency for each arm according to Laurie and Hultén^{24,25} are indicated.

Table 3 Ratio distortion of reciprocal sperm products from adjacent 1 segregation in different translocation carriers

Translocation carrier	No. of sperm analysed	Short/long translocated genotype	Ratio distortion	References
Hamster technique:				
t(1;2)(q32;q36)	105	-1, +der(1)/-2, +der(2)	1.2	20
t(1;4)(p36.2;q31.3)	90	-4, +der(4)/-1, +der(1)	0.73	25
t(1;4)(p36.2;q31.3)	115	-4, +der(4)/-1, +der(1)	0.57	25
t(1;9)(q22;q31)	173	-1, +der(1)/-9, +der(9)	1.24	29
t(1;11)(p36.3;q13.1)	548	-11, +der(11)/-1, +der(1)	0.97	30
t(2;9)(q21;p22)	208	-2, +der(2)/-9, +der(9)	0.64	31
t(2;18)(p21;q11.2)	165	-18, +der(18)/-2, +der(2)	0.81	3
t(3;11)(q25.3;q25)	262	-3, +der(3)/-11, +der(11)	0.96	32
t(3;16)(p23;q24)	201	-3, +der(3)/-16, +der(16)	1.07	33
t(4;6)(q28;p23)	158	-4, +der(4)/-6, +der(6)	1	31
t(5;7)(q13;p15.1)	157	-5, +der(5)/-7, +der(7)	0.78	3
t(5;7)(q21;q32)	296	-5, +der(5)/-7, +der(7)	0.96	this study
t(7;20)(q33.2;p13)	263	-7, +der(7)/-20, +der(20)	0.72	32
t(8;15)(p22;q21)	226	-15, +der(15)/-8, +der(8)	0.59	33
t(9;10)(q34;q11)	168	-10, +der(10)/-9, +der(9)	1.7	34
t(11;17)(p11.2;q21.3)	184	-11, +der(11)/-17, +der(17)	1.1	30
t(12;20)(q24.3;q11)	113	-20, +der(20)/-12, +der(12)	1.24	35
t(15;22)(q26.1;q11.2)	147	-22, +der(22)/-15, +der(15)	1.07	32
t(16;19)(q11.1;q13.3)	172	-6, +der(16)/-19, +der(19)	1	29
Decondensed sperm:				
t(1;10)(p22;q22)	4036	-1, +der(1)/-10, +der(10)	1.28	8
t(3;11)(q27.3;q24.3)	4029	-1, +der(1)/-2, +der(2)	0.77	9

Only studies that analysed ≥ 90 sperm complements are included

References

- De Breakeleer M, Dao TN: Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991; **2**: 245-250.
- Martin RH: A detailed method for obtaining preparations of human sperm chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1983; **35**: 252-256.
- Estop AM, Van Kirk V, Cieply K: Segregation analysis of four translocations, t(2;18), t(3;15), t(5;7) and t(10;12), by sperm chromosome studies and a review of the literature. *Cytogenet Cell Genet* 1995; **70**: 80-87.
- Martin RH, Spriggs EL: Sperm chromosome complements in a man heterozygous for a reciprocal translocation 46,XY,t(9;13)(q21.1;q21.2). *Clin Genet* 1995; **47**: 42-46.
- Pellestor F, Girardet A, Caignet L, Andréo B, Lefort G, Charlieu JP: Cytogenetic analysis of meiotic segregation in sperm from two males heterozygous for reciprocal translocations using PRINS and the hamster technique. *Cytogenet Cell Genet* 1997; **78**: 202-208.
- Rousseaux S, Chevret E, Monteil M *et al*: Meiotic segregation in male heterozygotes for reciprocal translocations: analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1995; **71**: 240-246.
- Estop AM, Cieply K, Aston Ch: The meiotic segregation pattern of a reciprocal translocation t(10;12)(q26.1;p13.3) by fluorescence *in situ* hybridization sperm analysis. *Eur J Hum Genet* 1997; **5**: 78-82.
- Van Hummelen P, Manchester D, Lowe X, Wyrobek AJ: Meiotic segregation, recombination and gamete aneuploidy assessed in a t(1;10)(p22.1;q22.3) reciprocal translocation carrier by three- and four-probe multicolor FISH in sperm. *Am J Hum Genet* 1997; **61**: 651-659.
- Martini E, Von Bergh ARM, Coonen E *et al*: Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3;11)(q27.3;q24.3) by triple FISH. *Hum Genet* 1998; **102**: 157-165.
- Martin RH, Spriggs EL, Ko E, Rademaker AW: The relationship between paternal age, sex ratio, and aneuploidy frequencies in human spermatozoa, as assessed by multicolor FISH. *Am J Hum Genet* 1995; **57**: 1395-1399.
- Benet J, Navarro J, Genescà A, Egozcue J, Templado C: Chromosome abnormalities in human spermatozoa after albumin or TEST-yolk capacitation. *Hum Reprod* 1991; **3**: 369-375.
- Cifuentes P, Navarro J, Míguez L, Egozcue J, Benet J: Sperm segregation analysis of a complex chromosome rearrangement 2;22;11 by whole chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet* (in press).
- Vidal F, Moragas M, Català V *et al*: Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent *in-situ* hybridization study. *Hum Reprod* 1993; **8**: 1740-1743.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F: Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent *in-situ* hybridization. *Hum Reprod* 1996; **4**: 722-726.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F: Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XY male assessed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Hum Genet* 1997; **99**: 413-416.
- Hultén MA: Chiasma distribution at diakinesis in the normal human male. *Hereditas* 1974; **6**: 55-78.
- Burns JP, Koduru PKR, Alonso ML, Chaganti RSK: Analysis of meiotic segregation in a man heterozygous for two reciprocal translocations using the hamster *in vitro* penetration system. *Am J Hum Genet* 1986; **38**: 945-964.

- 18 Jalbert P, Jalbert H, Sèle B: Types of imbalances in human reciprocal translocations: risk at birth. In: Daniel A (Ed.). *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. Alan R. Liss: New York, 1988, pp 267-291.
- 19 Martin RH: Segregation analysis of translocations by the study of human sperm chromosome complements. *Am J Hum Genet* 1989; **44**: 461-463.
- 20 Templado C, Navarro J, Requena R, Benet J, Ballesta F, Egozcue J: Meiotic and sperm chromosome studies in a reciprocal translocation t(1;2)(q32;q36). *Hum Genet* 1990; **84**: 159-162.
- 21 Benkhalifa M, Malet P, Qumsiyeh MB, Boucher D, Bellec V, Menezo Y: Chromosome aberrations in normal and translocated human sperm: role in reproduction pathology. *Ref Gynecol Obstet* 1994; **2**: 288-296.
- 22 Pellestor F, Sèle B, Jalbert H, Jalbert P: Direct segregation analysis of reciprocal translocations a study of 283 sperm karyotypes from four carriers. *Am J Hum Genet* 1989; **44**: 464-473.
- 23 Boué J, Gallano P: A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses. *Prenat Diagn* 1984; **4**: 45-47.
- 24 Laurie DA, Hultén MA: Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann Hum Genet* 1985; **49**: 189-201.
- 25 Laurie DA, Hultén MA: Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Ann Hum Genet* 1985^B; **49**: 203-214.
- 26 Aurias A, Prieur M, Dutrillaux, Lejeune J: Systematic analysis of 95 reciprocal translocation of autosomes. *Hum Genet* 1978; **45**: 259-282.
- 27 Templado C, Márquez C, Munné S *et al*: An analysis of human sperm chromosome aneuploidy. *Cytogenet Cell Genet* 1997; **74**: 194-200.
- 28 Egozcue J, Blanco J, Vidal F: Chromosome studies in human sperm nuclei using *in situ* hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 1997; **5**: 441-452.
- 29 Martin RH: Sperm chromosome analysis of two men heterozygous for reciprocal translocations t(1;9)(q22;q31) and t(16;19)(q11.1;q13.3). *Cytogenet Cell Genet* 1992; **60**: 18-21.
- 30 Spriggs EL, Martin RH, Hultén MA: Sperm chromosome complements from two reciprocal translocation heterozygotes. *Hum Genet* 1992; **88**: 447-452.
- 31 Martin RH, Barclay L, Hildebrand K, Ko E, Fowlow SB: Cytogenetic analysis of 400 sperm from three translocation heterozygotes. *Hum Genet* 1990; **86**: 33-39.
- 32 Martin RH, Hultén M: Chromosome complements in 695 sperm from three men heterozygous for reciprocal translocations and a review of the literature. *Hereditas* 1993; **118**: 165-176.
- 33 Brandriff B, Gordon L, Ashworth LK, Littman V, Watchmaker G, Carrano AV: Cytogenetics of human sperm. Meiotic segregation in two translocation carriers. *Am J Hum Genet* 1986; **38**: 197-208.
- 34 Martin RH: Meiotic segregation of human sperm chromosomes in translocation heterozygotes. Report of a t(9;10)(q34;q11) and a review of the literature. *Cytogenet Cell Genet* 1988; **47**: 48-51.
- 35 Martin RH, McGillivray B, Barclay L, Hildebrand K, Ko E: Sperm chromosome analysis in a man heterozygous for a reciprocal translocation 46,XY,t(12;20)(q24.3;q11). *Hum Reprod* 1990; **5**: 606-608.

PUBLICACION III

Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review

Cytogenetic and Genome Research 111(3-4): 281-290
(2005)

BENET Jordi, **OLIVER-BONET** Maria, **CIFUENTES** Piedad, **TEMPLADO** Cristina
NAVARRO Joaquina,

Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review

J. Benet, M. Oliver-Bonet, P. Cifuentes, C. Templado, J. Navarro

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Spain)

Manuscript received 25 October 2004; accepted in revised form for publication by R. Martin, 12 January 2005.

Abstract. Reciprocal translocations, the most frequent structural aberration in humans, are mainly transmitted by one of the parents. In order to analyze the chromosomal content of the spermatozoa from carriers of chromosomal reorganizations, two methods have been used, karyotyping of sperm chromosomes by the human-hamster system and fluorescence in situ hybridization (FISH) in decondensed sperm nuclei. In this work, we review 92 sperm chromosome segregation studies from 85 different reciprocal translocation carriers, including a triple translocation carrier. Using the human-hamster method, a total of 5,818 spermatozoa from 44 reciprocal translocation carriers have been analyzed, 43 of them carrying a single reciprocal translocation and one was a carrier of a double reciprocal translocation. A segregation analysis in a carrier of a $t(2;22;11)$ has been also reported. Carrying out FISH in sperm nuclei, a total of 237,042 spermatozoa from 46 reciprocal translocation carriers have been analyzed. Six of these were also analyzed by the human-hamster system. Taking into account both methods,

a total of 76 different reciprocal translocations have been studied. In 74 of these 76 translocations, the reorganization occurs between autosomes, and in the other two, the Y chromosome is involved. Although along general lines, there are similarities between the results obtained by the two methods of analysis, variations are observed when the distribution of the different types of segregations that produce imbalances is compared. As a general rule reciprocal translocation carriers produce more unbalanced sperm than normal or balanced sperm. The results reported also corroborate that the proportion of unbalanced forms depends on the characteristics of the reorganization and that it varies widely. Thus the importance of performing a detailed meiotic behavior analysis for each particular translocation in order to obtain enough information to give adequate genetic counseling is stressed. Aspects as to the possible overestimation of 3:1 segregations or the presence of interchromosomal effects still need to be elucidated.

Copyright © 2005 S. Karger AG, Basel

Background

The human species has a considerable frequency of individuals with an abnormal karyotype. Taking into account data reported in several studies of newborns, which include 59,514

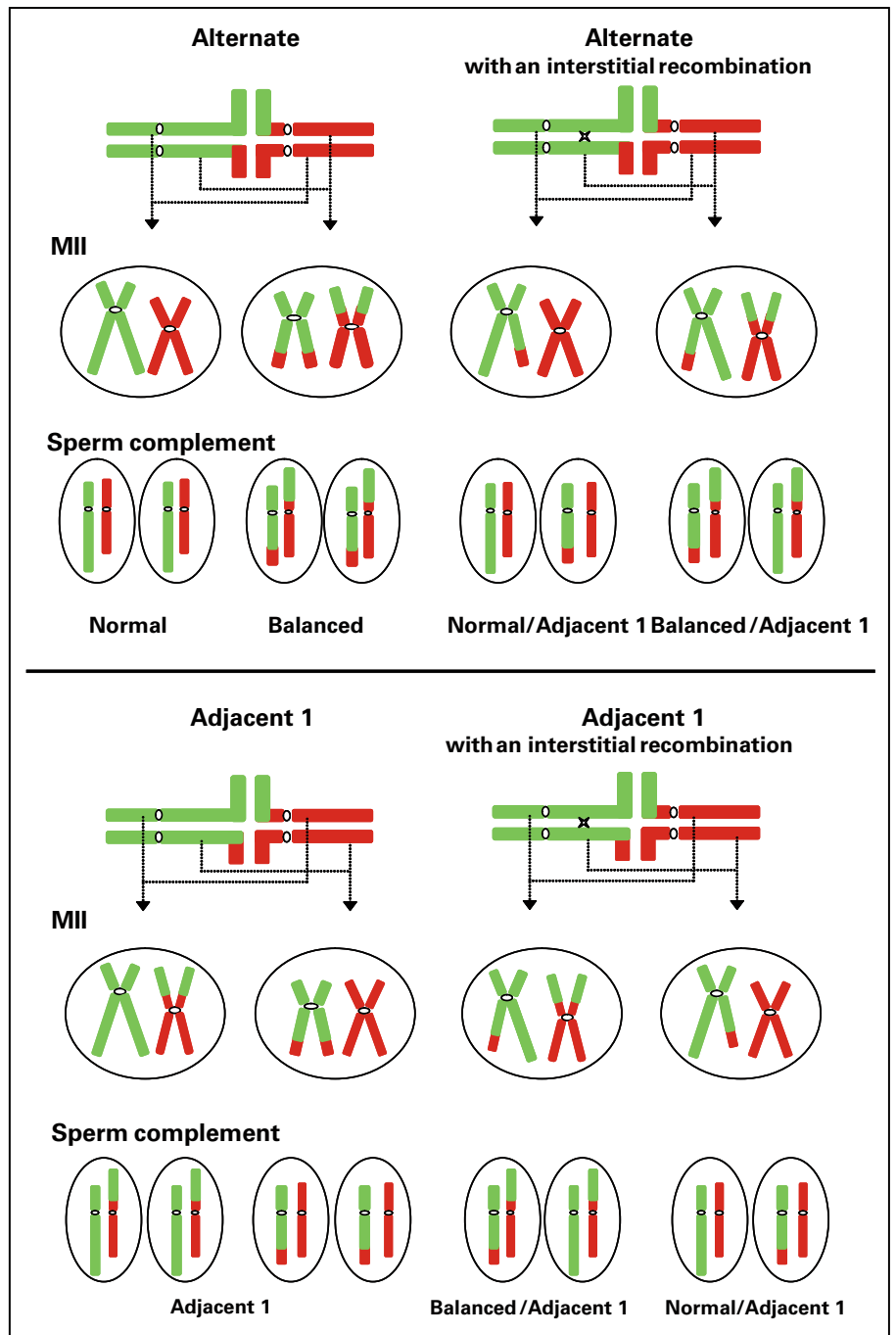
cases, translocations are the most frequent structural aberration in humans with an incidence of 0.178%, 0.092% corresponding to reciprocal translocations and 0.086% to Robertsonian translocations (De Braekeleer and Dao, 1991). A translocation consists of a mutual exchange of chromosomal segments between two chromosomes and establishes a new relationship between the translocated and centric fragments. In general, there is no apparent alteration to the carrier's phenotype. What does occur is a more or less drastic change in the size and relative position of the centromeres in the new, reorganized chromosomes, called derivative chromosomes.

It is known that the presence of chromosomal anomalies is associated with reproductive failures, thus in couples experiencing repeated pregnancy losses, the incidence of chromosomal translocations (1.88%, 1.07 and 0.81% corresponding to reciprocal and Robertsonian translocations, respectively) is

Supported by the Fondo de Investigación Sanitaria (Madrid) (project PI020258), the Ministerio de Ciencia y Tecnología (project BFI2002-01193) and the Generalitat de Catalunya (project 2001 SGR 00201).

Request reprints from Jordi Benet, Departament de Biologia Cel·lular Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Edifici M Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Spain) telephone: +34 935811773; fax: +34 935811025; e-mail: Jordi.Benet@uab.es

Current address of M.O.-B.: Department of Medical Genetics University of Calgary, Calgary, Alberta T2N 4N1 (Canada).



higher than the incidence present in newborn series (De Braekeleer and Dao, 1990). Summarizing the data, female translocation carriers (65.7%) are about twice as frequent as male translocation carriers (34.3%) among these affected couples.

On the other hand, there is also evidence which indicates that the presence of translocations alters the spermatogenic process. Summarizing the findings from different series of studies on infertile, oligozoospermic and azoospermic males, the incidence of translocation carriers is eight times more elevated than in newborn series. In these series, carriers of Robertsonian

translocations are more frequent than those of reciprocal translocations, nine times versus seven times, but reciprocal translocation carriers are more common in azoospermic males (De Braekeleer and Dao, 1991).

Contrary to aneuploidy, most structural chromosome abnormalities do not originate de novo but rather are transmitted by one parent being a carrier of the anomaly. The transmitted chromosome is either identical to or is a derivative of the parental rearranged chromosome (Jacobs, 1992). Because of this, there has been great interest for a long time in understanding

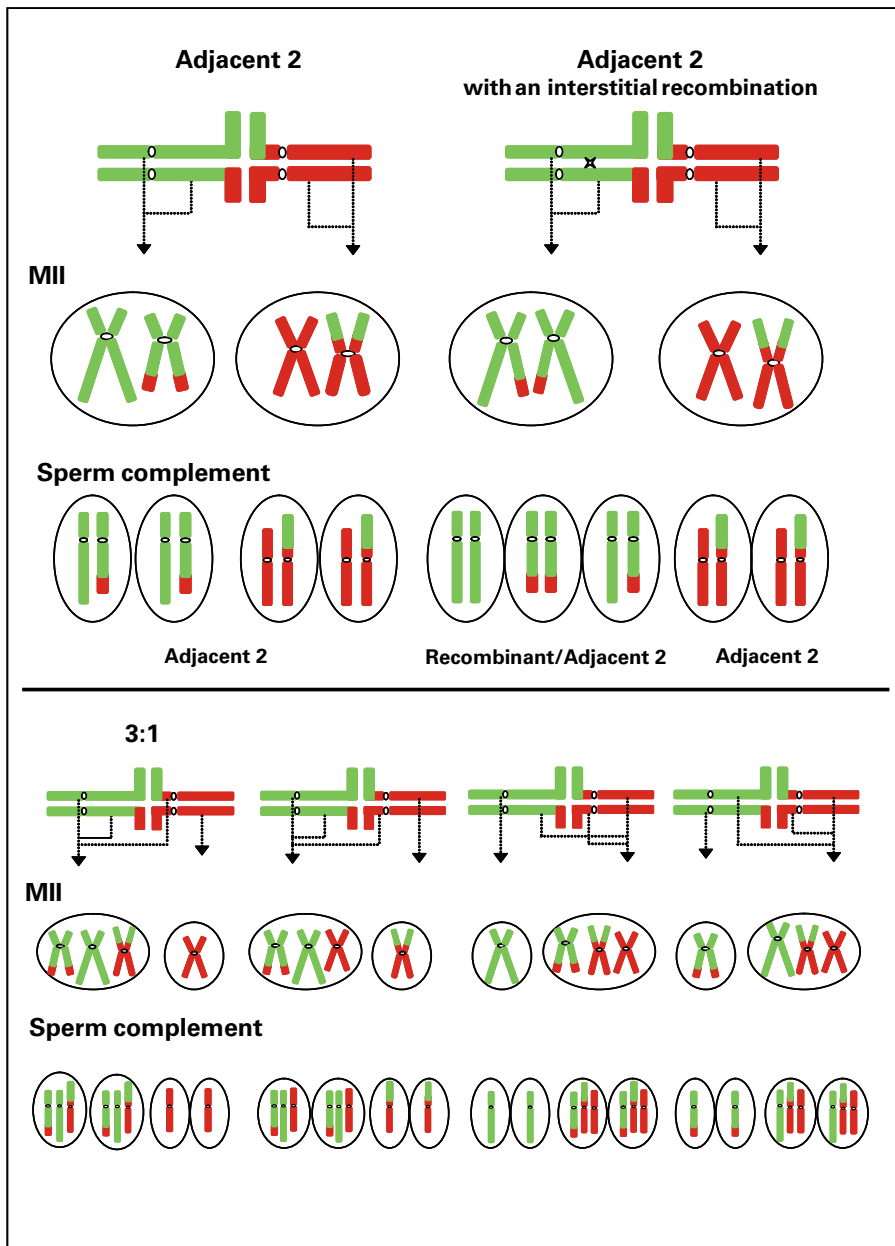


Fig. 1. Scheme of meiotic segregation for a reciprocal translocation.

the behavior and the result of meiotic segregation in this type of individual. In order to analyze the chromosomal content of the spermatozoa, two methods have been employed in the study of carriers of chromosomal reorganizations, karyotyping of human sperm chromosomes after human-hamster heterologous in vitro fertilization (Balkan and Martin, 1983) and fluorescence in situ hybridization (FISH) in decondensed sperm nuclei (Spriggs and Martin, 1994). During meiosis I the chromosomes reorganized by a translocation together with their homologues form a quadrivalent, and in anaphase I separate according to the different types of 2:2 segregation (alternate, adjacent 1 or adjacent 2), or according to a 3:1 segregation and less frequently according to a 4:0 segregation (Fig. 1). This behavior makes the carriers of reciprocal translocation generate an elevated per-

centage of chromosomally unbalanced gametes that can reduce the reproductive success of the carrier and increase the risk of transmitting chromosomal anomalies to offspring (Egozcue et al., 2000). During the last twenty-one years a large number of cytogenetic studies has been performed and reviewed on different translocation carriers (Estop et al., 1995; Guttenbach et al., 1997; Shi and Martin, 2001; Morel et al., 2004a).

Until now, and according to our knowledge of the literature, 92 sperm chromosome segregation studies from 86 different reciprocal translocation carriers, including a triple translocation carrier, have been reported. In this work, we review all of these studies, and compare results obtained by karyotyping performed after the human-hamster system and FISH in decondensed nuclei of spermatozoa.

Table 1. Meiotic segregation in reciprocal translocation carriers by sperm karyotyping after human-hamster system

Translocation	Age	No. of sperm	Chr. identified	N and B	Norm.	Bal.	Adj. 1	Adj. 2	3:1	4:0	Reference
t(1;2)(q32;q36)	32	105	G-band	40.9	23.8	17.1	41.9	5.7	11.4	0	Templado et al., 1990
t(1;4)(p36.2;q31.3)	38	115	G-band	46	31.3	14.7	38.2	6.9	8.7	0	Estop et al., 1992
t(1;4)(p36.2;q31.3)	40	90	G-band	39	20	19	50	7.7	3.3	0	Estop et al., 1992
t(1;9)(q22;q31)	31	173	Q-band	45.6	27.7	17.9	37.6	13.3	3.5	0	Martin, 1992
t(1;11)(p36.3;q13.1)	29	548	Q-band	33.2	15.9	17.3	42.9	15.9	8	0	Spriggs et al., 1992
t(1;13)(q41;q42)	n.a.	255	FISH ^a	41.3	24.4	16.9	41.6	14.5	2.3	0	Oliver-Bonet et al., 2002
t(2;3)(q24;p26)	30	83	Q-band	55.4	30.1	25.3	36.1	7.2	1.2	0	Martin, 1994
t(2;5)(p11;q15)	26	75	G-band	42.7 ^b	^b	^b	30.7	5.3	21.3	0	Templado et al., 1988
t(2;9)(q21;p22)	36	208	Q-band	43.3	25	18.3	28.4	24.1	4.3	0	Martin et al., 1990b
t(2;17)(q35;p13)	36	18	G-band	56	50	6	33	11	0	0	Jenderny, 1992
t(2;18)(p21;q11.2)	33	165	G-band	41.9	16.4	25.5	35.2	14.4	8.4	0	Estop et al., 1995
t(3;7)(q25;q36)	n.a.	68	R-band	27.9	16.2	11.7	45.6	19.1	7.4	0	Benkhalifa et al., 1994
t(3;8)(p13;p21)	29	73	G-band	34.2	27.4	6.8	43.8	20.5	1.4	0	Jenderny, 1992
t(3;11)(q25.3;q25)	24	262	Q-band	47.7	24.4	23.3	45.8	5.7	0.8	0	Martin and Hulten, 1993
t(3;15)(q26.2;q26.1)	37	50	G-band	48	22	26	36	12	2	2	Estop et al., 1995
t(3;16)(p23;q24)	25	201	Q-band	37.3	19.9	17.4	41.3	16.4	5	0	Brandriff et al., 1986
t(3;19)(p21;p13.3)	n.a.	128	FISH ^a	39.2	18	21.2	35.9	21.8	3.2	0	Oliver-Bonet et al., 2002
t(4;6)(q28;p23)	25	158	Q-band	45.6	24.1	21.5	51.9	1.9	0.6	0	Martin et al., 1990b
t(4;8)(q28;p23)	31	352	FISH ^a	35.4	19.3	16.1	33.2	19.9	11.3	0	Oliver-Bonet et al., 2001
t(4;12)(p11;p11)	n.a.	79	R-band	49.3	17.7	31.6	13.7	27.8	8.9	1.3	Benkhalifa et al., 1994
t(4;17)(q21.3;q23.2)	35	60	R-band	56.7	25	31.7	35	6.7	1.6	0	Pellestor et al., 1989
t(5;7)(q13;q15.1)	34	157	G-band	40.2	20.4	19.8	26.2	16.6	17	0	Estop et al., 1995
t(5;7)(q21;q32)	n.a.	296	FISH ^a	49.6	28	21.6	32.4	16.2	1.7	0	Cifuentes et al., 1999a
t(5;11)(p13;q23.2) ^c	36	23 ^c	Q-band	69.6	60.9	8.7	26.1	0	4.3	0	Burns et al., 1986
t(5;13)(q11;q33)	27	57	R-band	77.2	42.1	35.1	21.1	1.7	0	0	Pellestor et al., 1989
t(5;18)(p15;q21)	39	31	Q-band	80.7	45.2	35.5	16.1	0	3.2	0	Balkan and Martin, 1983
t(6;7)(q27;q22.1)	35	84	R-band	51.2	21.4	29.8	48.8	0	0	0	Pellestor et al., 1989
t(6;14)(p24;q22)	34	19	Q-band	68.4	42.1	26.3	31.6	0	0	0	Balkan and Martin, 1983
t(7;9)(q33;p21)	34	54	R-band	44.4	22.2	22.2	37	12	5.6	0	Pellestor et al., 1997
t(7;14)(q11;q24.1) ^c	36	23 ^c	Q-band	30.4	17.4	13	47.8	0	17.4	4.3	Burns et al., 1986
t(7;14)(q21;q13)	55	19	Q-band	52.7	31.6	21.2	31.6	15.8	0	0	Martin et al., 1990b
t(7;18)(q35;q11)	29	72	R-band	33.3	15.3	18.1	43.1	19.5	4.2	0	Pellestor et al., 1997
t(7;20)(q33.2;p13)	37	263	Q-band	38.3	20.4	17.9	39.9	16.3	5.3	0	Martin, 1992
t(8;15)(p22;q21)	31	226	Q-band	37.1	19	18.1	38.1	21.2	3.5	0	Brandriff et al., 1986
t(9;10)(q34;q11)	30	171	Q-band	40.4	20.8	19.6	48.2	5.4	5.9	0	Martin, 1988
t(9;13)(q21.1;q21.2)	33	81	Q-band	46.9	25.9	21	35.8	17.3	0	0	Martin and Spriggs, 1995
t(9;17)(p13;q21.3)	n.a.	131	FISH ^a	51.1	30.5	20.6	31.3	14.5	3.1	0	Cifuentes et al., 1999b
t(9;17)(q12;p12)	n.a.	85	FISH ^a	51.8	31.8	20	27.1	17.6	3.5	0	Cifuentes et al., 1999b
t(9;18)(p12;q12.1)	26	82	R-band	34.2	20.7	13.5	63.4	0	2.4	0	Pellestor et al., 1989
t(10;12)(q26.1;p13.3)	40	72	G-band	61.1	33.3	27.8	26.3	6.9	5.6	0	Estop et al., 1995
t(11;17)(p11.2;q21.3)	24	184	Q-band	38.6	21.8	16.8	32.1	26.6	2.7	0	Spriggs et al., 1992
t(11;22)(q23;q11)	30	13	Q-band	23.1	7.7	15.4	38.5	23.1	15.4	0	Martin, 1984
t(12;20)(q24.3;q11)	40	113	Q-band	46.8	22.1	24.7	41.6	9.7	1.8	0	Martin et al., 1990a
t(15;22)(q26.1;q11.2)	31	147	Q-band	34	21.1	12.9	39.5	22.4	4.1	0	Martin and Hultén, 1993
t(16;19)(q11.1;q13.3)	39	172	Q-band	39.5	18.6	20.9	27.9	31.4	1.2	0	Martin, 1992
Mean ^d		129.8		45.5	25.4	20.1	35.9	12.6	4.9	0.2	
Mean ^e		149.8		43.9	23.4	20.5	36.7	13.6	4.8	0.1	

^a FISH performed using whole chromosome painting.

^b Similarity of the translocated segments has hampered normal or balanced discrimination in several karyotypes of this carrier.

^c These two reciprocal translocations were carried by the same patient (total analyzed sperm = 23).

^d Mean calculated by taking into account all the analyzed reciprocal translocations (n = 45).

^e Mean calculated by taking into account reciprocal translocations with ≥50 analyzed cells (n = 38).

Methods of cytogenetic sperm segregation analysis

The spermatozoon is a very differentiated cell that has an elevated degree of condensation of its chromatin principally due to the substitution of its histones for protamines. The analysis of its chromosomal content requires previous decondensation of the nucleus. The first method described for accomplishing this is based on a heterologous in vitro fertilization of zona-free hamster oocytes and human spermatozoa (Rudak et al., 1978). Decondensation of the chromosomal material of the

spermatozoon and the subsequent formation of the male and female pronuclei are produced in the cytosol of the oocyte. The process is stopped (with the use of anti-mitotic agents), when the stage of the first mitotic metaphase of the heterozygote is reached. The fixation of these zygotes permits the observation of the chromosomal complements, which can be analyzed by means of classical chromosomal banding: C-, Q-, R- and G-banding (Rudak et al., 1978; Martin, 1983; Sèle et al., 1985; Benet et al., 1986, 1992) or by FISH techniques (Colls et al., 1997; Cifuentes et al., 1998). The former method is the only

Table 2. Meiotic segregation in a t(2;22;11) carrier by sperm whole chromosome painting after human-hamster system

Complex chromosomal rearrangement	Age ^a	No. of sperm	Chromosome identification	Type of segregation						Reference
				Normal	Balanced	Unbalanced				
						3:3	4:2	5:1		
t(2;22;11)(q13;q11.2;q23)	n.a.	208	2, 11, 22 WCP ^b	9.6	3.8	64.9	20.7	1.0	Cifuentes et al., 1998	

^a n.a. = not available.

^b WCP= whole chromosome painting.

one which allows for the analysis of the totality of the nuclear content of the spermatozoon, but the number of complements that can be karyotyped per individual is, from the statistical point of view, relatively low (Guttenbach et al., 1997).

The application of non-radioactive in situ hybridization techniques in the nuclei of spermatozoa is an alternative method for the cytogenetic study of the human sperm (Guttenbach and Schmid, 1990; Wyrobek et al., 1990). It is based, in general, on an appropriate chemical decondensation of the previously fixed sperm nuclei such that their chromatin can be accessible to hybridization with DNA probes. Normally, centromeric, telomeric and locus-specific probes are used. This is a relatively simple method which, additionally, allows for the analysis of a large number of spermatozoa. Nevertheless, due to the fact that only two or three probes are used in each analysis, it only provides information on the chromosomes studied and the analysis of all of the chromosomal complement of a specific sperm is not possible.

Reciprocal translocation segregation studies by human-hamster system

Using the human-hamster heterologous fusion, a total of 5,818 spermatozoa from 44 reciprocal translocation carriers has been analyzed for meiotic segregation reorganization, 43 of these were carriers of a single reciprocal translocation and one was a carrier of a double reciprocal translocation (Table 1).

All of the 45 reorganizations studied involved two autosomes. Of the 39 arms of autosomes, only five (8q, 10p, 16p, 18p and 21q) have not been involved in any of the reciprocal translocations studied. The average number of spermatozoa analyzed, per carrier, is 132.2, ranging between 13 and 548. In 22 of the carriers, the studies have been carried out on more than 100 cells per carrier, in 16 of the carriers they were between 50–90 cells and in 7 of the carriers fewer than 35 cells were analyzed.

Cytogenetic analysis performed by means of bands, FISH or whole chromosome painting (WCP) permits the identification of all possible types of segregation. Only in one case, and due to a similarity of the size and the pattern of bands of the translocated segments, it has not been possible to differentiate normal from balanced sperm (Templado et al., 1988). In the presence of an odd number of interstitial recombinations, half of the meiotic outcomes produced by either alternate or adjacent 1 segregation are going to be indistinguishable from the meiotic

products produced also by either alternate or adjacent 1 segregation in the absence of interstitial recombination (Fig. 1) (Armstrong and Hultén, 1998). Nevertheless, when frequencies of each segregation type are considered, the effect of interstitial recombination can be overlooked, since the randomness of this event should compensate for this recombination (Oliver-Bonet et al., 2002).

The means for each type of segregation (considering first all reciprocal translocation cases reported, and second only the cases with more than 50 sperm studied) are indicated at the end of Table 1. The exclusion of the cases with less than 50 analyzed cells reduces the possible error rates arising from small sample sizes. The most frequent type of 2:2 segregation has been the alternate, followed by adjacent 1 and adjacent 2, respectively. Segregation 3:1 is almost 5% and 4:0 is very rarely observed. Considering only the studies reporting more than 50 chromosome complements, the observed mean frequencies for the different types of segregation are 43.9% for the alternate (with a range of 27.9–77.2%), 36.7% for adjacent 1 (range from 12.7 to 63.4%), 13.6% for adjacent 2 (range from 1.9 to 31.4%), 4.8% for segregation 3:1 (range from 0 to 21.3%) and 0.1% for 4:0 segregation.

A segregation analysis in a carrier of a complex chromosomal rearrangement, t(2;22;11), has been also reported (Table 2). In this case, an elevated frequency of unbalanced sperm was found (86.5%) including more than 50 different types of segregation (Cifuentes et al., 1998). These results agree with the formation of a hexavalent figure and demonstrate that all possible combinations of segregation can continue throughout the meiotic and spermiogenic process.

Reciprocal translocation segregation studies by FISH analysis on sperm nuclei

A total of 237,042 spermatozoa from 46 reciprocal translocation carriers has been analyzed for meiotic segregation using FISH procedures on decondensed sperm nuclei (Table 3). Six of these were also analyzed by the human-hamster heterologous system and the corresponding results are included in Tables 1 and 3.

Forty-four of the 46 reorganizations are autosomal reciprocal translocations and the two remaining ones are reciprocal translocations involving chromosomes Y and 1, and Y and 16. Of the 39 arms of autosomal chromosomes, only 8 autosomal arms (5p, 7p, 9p, 16p 18p, 19p 19q and 21q) have not been

Table 3. Meiotic segregation in reciprocal translocation carriers by FISH analysis of interphase sperm nuclei

Translocation	Age ^a	No. of sperm	Probes used ^b	N and B	Normal	Balanced	Adj 1	Adj 2	3:1	4:0	Others	Reference
Autosomal translocations												
t(1;6)(p22;p21.3)	n.a.	1006	CEP/CEP/Tel	37.4			43.1	7.7	10.7	0	1.1	Escudero et al., 2003
t(1;8)(q33.2;q24.1)	n.a.	9956	CEP/CEP			84.9 ^c		7.1	7.1	1.7	0.12	Prigent and Viguié, 1996
t(1;10)(p22.1;q22.3)	40	4036	CEP/CEP/Tel			48.1	42.5	4.9	3.9	0.3	0.4	Van Hummelen et al., 1997
t(1;11)(p36.3;q13.1)	29	13071	CEP/CEP			82.5 ^c		8.3	9.2	0.06	0.02	Spriggs and Martin, 1994
t(1;13)(q42.12;q32.2)	n.a.	1005	CEP/Tel/LSI	37.0			29	8.2	23.3	0	2.6	Escudero et al., 2003
t(1;18)(p36;q21)	n.a.	1000	CEP/Tel/Tel	29.2			9.2	16.6	43.2	0	1.8	Escudero et al., 2003
t(2;6)(p12;q24)	n.a.	7000	CEP/Tel/Tel	49.9			42.4	2.5	4.2	0	0	Lim et al., 2003
t(2;14)(p23.1;q31)	32	4610	CEP/LSI			80.0 ^c		5.2	5.8	0	9.0	Rousseaux et al., 1995
t(2;18)(p21;q11.2)	33	3139	CEP/CEP/LSI	43.6			29.8	10.5	12.8	0.5	2.8	Estop et al., 1998
t(2;18)(q11.2;q21.1)	n.a.	1079	CEP/Tel/Tel	31.1			28.8	16.0	24.2	0	0	Escudero et al., 2003
t(2;20)(q24.1;q13.1)	37	815	CEP/CEP			90.7 ^c		5.2	4.0	0	0	Trappe et al., 2002
		801	Tel/Tel			51.7 ^d		48.2	3.8	0	0	Trappe et al., 2002
t(3;4)(q12;p15.2)	n.a.	1000	CEP/Tel/Tel	23.9			14.7	24.5	34.2	0	2.7	Escudero et al., 2003
t(3;9)(p25;q32)	34	10278	CEP/CEP/Tel			47.2	42.0	14.7	4.5	0.2	0.3	Honda et al., 1999
t(3;9)(q26.2;q32)	32	10022	CEP/CEP/Tel			52.5	35.9	5.4	5.9	0.14	0.04	Honda et al., 1999
t(3;11)(q27.3;q24.3)	33	4029	CEP/LSI/LSI	44.3			15.8	6.6	28.9	0.8	3.6	Martini et al., 1998
t(3;12)(p14;q24.3)/46XY	n.a.	1000	CEP/Tel/Tel	41.3			3.7	18.4	34.8	0	1.8	Escudero et al., 2003
t(4;8)(q28;p23)	31	6590	CEP/Tel/Tel	30.5			28.5	20.5	19.5	0	0	Oliver-Bonet et al., 2001
t(5;8)(q33;q13)	42	10344	CEP/LSI/LSI	45.1			38.3	7.0	6.6	1.2	1.8	Blanco et al., 1998
t(5;15)(q35;q22)	n.a.	1032	CEP/Tel/Tel	45.9			44.1	0.7	8.3	0	1	Escudero et al., 2003
t(6;9)(p12;q13)	n.a.	1015	CEP/Tel/Tel	23.6			14.1	40.1	21.9	0	0.4	Escudero et al., 2003
t(6;11)(q14;p14)	34	13968	CEP/CEP			73.0 ^c		9.0	3.0	0.1	14.9	Rousseaux et al., 1995
t(6;11)(q14;p14)	44	13876	CEP/CEP			78.0 ^c		8.0	2.8	0.4	10.8	Rousseaux et al., 1995
t(7;8)(q11.21;cen)	30	34527	CEP/CEP	56.7	30.4	26.3	25.1	11.1	7.1	0.04	0	Mercier et al., 1998
t(7;8)(q11.21;cen)	n.a.	10023	CEP/CEP	62.8	35	28	17.6	12.8	6.5	0.3	0	Morel et al., 2004c
t(7;9)(q33;p21)	34	10658	CEP ^g /CEP ^e			86 ^c		10.4	3.0	0.5	0.1	Pellestor et al., 1997
t(7;18)(q35;q11)	29	10462	CEP ^g /CEP ^e			77.2 ^c		15.9	6.6	0.4	0	Pellestor et al., 1997
t(8;9)(q24.2;q32)	39	3118	CEP/CEP/LSI	44.4			41.0	3.1	9.4	0.6	1.4	Estop et al., 1998
t(8;22)(q24.22;q11.21)	n.a.	1003	CEP/Tel/LSI	23.8			15.0	19.0	41.7	0	0.7	Escudero et al., 2003
t(9;10)(q11;p11.1)	25	5157	CEP/CEP/LSI	56.3			12.9	9.4	21.4	0	0	Rives et al., 2003
t(9;22)(q21;q11.2) ^f	32	4124	CEP/Tel/LSI	55.9			26.4	10.6	6.2	0.6	0.3	Morel et al., 2004b
t(10;12)(q26.1;p13.3)	40	10049	CEP/CEP			84.3 ^c		11.0	4.4	0.2	0.15	Estop et al., 1997
t(10;14)(q24;q32)	n.a.	3111	CEP/Tel/Tel	44.6			38.6	11.9	4.9	0	0	Oliver-Bonet et al., 2004
t(10;15)(q26;q12)	32	2602	CEP/CEP			93.4 ^c		2.9	2.4	0	5.6	Baccetti et al., 2003
		n.a.	Tel/Tel	32.8			n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Baccetti et al., 2003
t(11;17)(q13.1;p11.2)	n.a.	5371	CEP/Tel/Tel	40.8			26.1	25.7	7.4	0	0	Oliver-Bonet et al., 2004
t(11;22)(q23;q11)	n.a.	1044	CEP/Tel/LSI	21.8			14.4	31.5	30.3	0	2	Escudero et al., 2003
t(11;22)(q23;q11)	44	1925	CEP/LSI/LSI	27.4			17.6	12.5	40.1	0.5	1.9	Estop et al., 1999
t(11;22)(q25;q12)	29	1012	CEP/LSI/LSI	29.1			21.2	15.1	34.6	0	0	Van Assche et al., 1999
t(14;20)(p11.2;p11.1)	29	1003	LSI/CEP	51.0	27	24	19	21	4	0	5	Mennicke et al., 1997
t(15;17)(q21;q25)	32	8790 ^g	LSI/Tel/CEP	51.2			35.3	8.9	2.8	0	1.8	Cora et al., 2002
t(15;17)(q21;q25)	27	^g	LSI/Tel/CEP	49.4			37.7	7.9	3	0	2	Cora et al., 2002
t(15;17)(q21;q25)	24	^g	LSI/Tel/CEP	48.1			40.3	8.5	2.4	0	0.8	Cora et al., 2002
t(15;17)(q21;q25)	55	^g	LSI/Tel/CEP	52.7			34.4	10.7	1.5	9	0.7	Cora et al., 2002
t(15;22)(q22;q13)	n.a.	1000	CEP/Tel/LSI	18.6			15.9	16.0	43.3	0	5.8	Escudero et al., 2003
t(17;22)(q11;q12)	35	700	CEP/LSI/LSI	19.0			12.9	5.8	46.8	0	15.5	Geneix et al., 2002
Mean		5252.2		40.5			26.6	12.4	14.5	0.2	2.2	
Gonosomal translocations												
t(Y;1)(q12;p34)	30	191	CEP/CEP/CEP/Yq	36.0	24	12	64	0	0	0	0	Mennicke et al., 1997
t(Y;16)(q11.21;q24)	43	500	CEP/CEP/CEP/Yq	51.0	27	24	36	0	12	0	1	Giltay et al., 1999

^a n.a. = not available.^b CEP = centromeric probe; LSI = locus specific identifier probe; Tel = telomeric probe.^c N+B+Adj1.^d N+B+Adj2.^e PRINS labeling technique.^f Data summarized from two analyzed samples.^g A total of 8790 sperm nuclei were scored in these four carriers.

involved in any of the reciprocal translocations studied. Taking into account both methods, only three arms 16p, 18p and 21q are not present in the reciprocal translocations studied. The mean of analyzed sperm in autosomal reciprocal translocation carriers is 5,371.6, ranging between 700 and 34,527. More than

10,000 cells per carrier have been analyzed in 11 cases, between 3,000 and 10,000 cells in 12 carriers and between 700 and 3,000 in 17 carriers.

In general, due to the fact that the frequency of aneuploid spermatozoa for a specific chromosome is low, the sample size

recommended for analysis of sperm aneuploidy is 10,000 or more cells (Egozcue et al., 1997). A sample size 10 times smaller (1,000 cells) might be sufficient for the analysis of the different types of 2:2 segregation, and also for the 3:1 one since, in general, these are found at a frequency of more than 10 times higher than disomies. Nevertheless, in our experience, the analysis of more than 3,000 spermatozoa is needed in order to obtain stable frequencies for each of the different types of segregation.

According to the number and types of probes used, and the hybridization place (in the arm or close to the centromere), this method allows for the identification of a part or all of the possible types of segregation (Table 3). The application of only two probes (8 studies) does not permit differentiation between alternate and adjacent 1 segregations. In order to differentiate between these two types, the most frequent method is the analysis with three probes (31 studies), the performance of a double analysis (two centromeric probes and two telomeric probes) and the combination of the results (2 studies) can also give this information, even though it has not been obtained from the same sample. Generally, however, it has not been possible to distinguish between normal or balanced complements, and only in some cases (3 carriers) and due to the two breakpoints being at the pericentromeric region, has this differentiation been possible.

Gonosomal reciprocal translocations have been analyzed using four probes; the fact that this translocation type involves three different chromosomes (X, Y and one autosome) also made it possible to discriminate between normal and balanced spermatozoa. In the two cases (Table 3), spermatozoa resulting from alternate and adjacent 1 segregation were found, but not from adjacent 2.

At the end of Table 3 the means of each of the types of segregation are indicated, taking into account all the cases of autosomal reciprocal translocations in which the analysis of the corresponding type of segregation has been possible. The most frequent type of 2:2 segregation has been the alternate (40.5%), followed by adjacent 1 (26.6%) and adjacent 2 (12.4%), respectively. The 3:1 segregation (14.5%) is more frequent than adjacent 2, and the 4:0 (0.2%) is very rarely observed. The ranges of the frequencies for each type of segregation are, in general, wide. From 18.6 to 55.9% for the alternate, from 3.7 to 44.1% for adjacent 1, from 0.7 to 40.1% for adjacent 2, from 1.5 to 46.8% for the 3:1 segregation and from 0 to 0.8% for the 4:0 segregation.

Comparison of results obtained by both methods

The mean frequencies of normal or balanced and unbalanced spermatozoa, obtained by means of one method or the other, are similar and indicate that reciprocal translocation carriers produce fewer balanced spermatozoa than unbalanced ones. The mean frequency of these products is approximately 44 and 56%, respectively, in the studies performed by the human-hamster system, and approximately 40 and 60%, respectively, in the studies performed by FISH in sperm nuclei. Taking into account the data obtained by both methods, the percentage of normal and balanced spermatozoa for each translocation can vary greatly,

from 18.6 to 80.7% (Tables 1 and 3). All of the authors agree that each reciprocal translocation has a specific pattern of segregation that depends, in great part, on the characteristics of the quadrivalent formed, that is, the chromosomes involved in reorganization, the breakpoints, the length of the translocated segments and of the interstitial segments.

Although, along general lines, there are similarities between the results obtained by the two methods of analysis, when the distribution of the different types of segregations that produce imbalances is compared, variations are observed. Thus, the mean frequency of adjacent 1 obtained by the human-hamster system is higher than that found by FISH in sperm nuclei (36.7 vs. 26.6%). Those corresponding to adjacent 2 are similar (13.6 vs. 12.4%), and that corresponding to the 3:1 segregation is inferior to that described by FISH in sperm nuclei (4.8 vs. 14.5%).

These differences could be due to the differences found in each one of the reciprocal translocations studied, even though technical differences unique to each method cannot be discarded, as the results obtained by a single sample analyzed by both methods suggest (Oliver-Bonet et al., 2001). Given that both alternate and adjacent 1 segregations distribute homologous centromeres to different poles of the chromosome spindle, it is logical that these are the most frequent segregations. Notwithstanding, it is thought that specific factors can affect the segregation pattern such that normally infrequent products, such as those corresponding to adjacent 2 and 3:1 segregations, are found with a greater incidence than expected. It has been suggested that adjacent 2 segregations can be found in a more preferential manner than what is usual if the interstitial segments or the translocated segments involved are so small that no chiasma can be formed in these regions (Rickards, 1983). Moreover, it has been described that there is an inverse relationship between the length of the interstitial segment and the frequency of adjacent 2 segregation such that the shorter this segment is, the greater the probability is that this segregation will be produced (Faraut et al., 2000). According to this, high frequencies of adjacent 2 segregation have been observed in several reciprocal translocation carriers, i.e. t(3;19), t(4;8), (Table 1) and t(11;17) (Table 3).

It has also been proposed that the participation of an acrocentric chromosome in reorganization or a very asymmetrical configuration of the quadrivalent can favor 3:1 segregation (Jalbert et al., 1980). Twenty of the 44 autosomal reciprocal translocations studied by FISH sperm nuclei more frequently show a 3:1 segregation than an adjacent 2 segregation. Nevertheless, an acrocentric chromosome is involved in only eight of these 20 reciprocal translocations. It is worth mentioning, however, that in five of the seven reciprocal translocations in which the 3:1 segregation is the most frequent type of segregation, chromosome 22 is involved. Almost all of the cases in which adjacent 2 is more frequent than adjacent 1 correspond to patients included in a PGD-IVF program (Escudero et al., 2003). Perhaps a bias might exist in the infertile heterozygote carrier population in the sense that this type of population of reciprocal translocation carriers tend to produce a greater proportion of unbalanced products of segregation. Nonetheless, it is important to note that almost all analyses that have found high frequencies of 3:1 segregation have been performed by combining

one centromeric probe with two telomeric or locus specific probes. As stated above, 3:1 segregations can be overestimated if there is a failure of hybridization of the small telomeric or locus specific probe (Martini et al., 1998).

It has been described that family members who are carriers of the same reciprocal translocation show a similar pattern in the respective segregation frequencies: t(1;4) in two cousins (Estop et al., 1992), t(6;11) in two siblings (Rousseaux et al., 1995), t(15;17) in a father and three sons (Cora et al., 2002) and t(7;8) in two siblings (Morel et al., 2004c). These data indicate that the type of segregation patterns depends fundamentally on the chromosomal and genetic characteristics associated with reciprocal translocations and not on the characteristics of an environmental type.

In control men, structural or numerical sperm chromosome aberration frequencies do not vary over relatively long periods of time, that is, several months or a few years (Brandriff et al., 1988; Benet et al., 1992). In a similar fashion, the maintenance of segregation frequencies has also been shown in a t(10;12) and a t(9;22) carrier (Estop et al., 1998; Morel et al., 2004b).

When the results of segregations obtained from individual translocation carriers with the same affected chromosomes are compared, it is seen that in some cases the frequency of each type of segregation is similar. This is the case for two patients who are carriers of a t(3;9) (Honda et al., 1999), for two patients who are carriers of a t(6;11) Rousseaux et al., 1995 and for three patients who are carriers of a t(11;22) (Escudero et al., 2003; Estop et al., 1999; Van Assche et al., 1999). But the opposite situation also occurs. There are different individual translocation heterozygotes with the same translocated chromosomes which show different segregation frequencies. This is the case, for example, of two individuals who are carriers of a t(5;7) (Estop et al., 1995; Cifuentes et al., 1999a). It is possible that, in this case, the frequency of the recombination phenomena can be altered due to the position of the breakpoints, so that the cause of the differences in the segregation pattern is the presence or absence of chromosomal exchanges.

Modifications in the number and position of the chiasmata in the quadrivalent can affect the ring or chain configuration that this quadrivalent adopts during the diakinesis stage. It has been proposed that the ring configurations preferably turn towards 2:2 segregations, while chain configurations favor the 3:1 segregation. In this sense, in a segregation analysis of a t(1;2) segregation carried out in sperm chromosome complements and in MI, a concordance between the frequencies of 2:2 and 3:1 segregations and those of ring and chain tetravalent, respectively, has been found (Templado et al., 1990). Nonetheless, such agreement has not been observed in a carrier of a t(15;20) (Goldman and Hultén, 1993). Recent studies show that, despite the dispositions in chain or ring possibly being a determining factor, other factors, such as the presence of interstitial chiasmata within a chain configuration could favor the 2:2 segregation instead of the 3:1 segregation (Oliver-Bonet et al., 2004).

The proportions of the two types of complementary products for each type of specific segregation are expected to be similar. Nevertheless, sometimes they are found in significantly different frequencies. It has been proposed that distortions in adjacent 1 and 2 proportions can be caused by the presence of

unfinished recombinations in MI (Van Hummelen et al., 1997). However, results obtained in other studies do not agree with this explanation (Cifuentes et al., 1999a; Honda et al., 1999). In relation to the 3:1 segregation, in general there is an excess of monosomic spermatozoa compared to the complementary trisomic spermatozoa. Although an early selection during spermatogenesis of one of the two products has been noted (Mercier et al., 1998), technical problems cannot be discarded due to, for example, a reduction in the efficiency of hybridization in the smallest probes (Martini et al., 1998; Genéix et al., 2002; Rives et al., 2003).

The possible presence of interchromosomal effects in carriers of reciprocal translocations has been evaluated by means of the FISH technique in sperm nuclei. The effects' existence has been controversial (Blanco et al., 2000; Estop et al., 2000). A review of various studies that include 29 reciprocal translocation carriers indicates that 58% of the carriers show an increase in the frequency of at least one chromosome abnormality that is associated with the reorganization, and that chromosomes 1 and 21 may be among some of the most affected chromosomes due to the presence of a translocation (Shi and Martin, 2001). Chromosomal reorganization carriers have different seminal parameters, from normal to oligoasthenoteratozoospermia. This great variability may be due to the chromosomes involved in the reorganization and to the breakpoints. It has been proposed that the incidence of interchromosomal effects could be restricted to those translocation carriers with an altered semenogram (Pellestor et al., 2001). However, an altered semenogram is not always associated with interchromosomal effects (Rives et al., 2003), thus it is an open question as to which factors, if any, are responsible for the existence of interchromosomal effects in reciprocal translocation carriers.

In conclusion, results obtained from this revision confirm that, as a general rule, reciprocal translocation carriers produce more unbalanced sperm than normal or balanced sperm. The results reported also corroborate that the proportion of unbalanced forms depends on the characteristics of the reorganization and that it varies widely (from 23 to 81%). Thus, the studies stress the importance of performing a detailed meiotic behavior analysis for each particular translocation in order to obtain enough information to give adequate genetic counseling. Out of the 76 different reciprocal translocations reported so far, only one, t(11;22) (which is the most frequent reciprocal translocation in humans), has been analyzed in more than one unrelated familiar individual. The analysis of more reciprocal translocations will allow for the comparative meiotic behavior analysis of identical or similar translocations. Aspects as to the possible overestimation of 3:1 segregation or the presence of interchromosomal effects still need to be elucidated. A way to clarify these aspects would be the use of methodologies that allow for the simultaneous analysis of all chromosomes. However, methods now available, such as the human-hamster system, are expensive and only report a small number of analyzed cells. The applications of new assays on the analysis of reciprocal translocations, such as microarrays or comparative genome hybridization may allow us to achieve a more comprehensive understanding of the meiotic behavior of this kind of chromosomal reorganization.

References

- Armstrong SJ, Hultén MA: Meiotic segregation analysis by FISH investigations in sperm and spermatocytes of translocation heterozygotes. *Eur J Hum Genet* 6:430–431 (1998).
- Baccetti B, Bruni E, Collodel G, Gambera L, Moretti E, Marzella R, Piomboni P: 10,15 reciprocal translocation in an infertile man: ultrastructural and fluorescence in-situ hybridization sperm study: Case report. *Hum Reprod* 18:2302–2308 (2003).
- Balkan W, Martin RH: Chromosome segregation into the spermatozoa of two men heterozygous for different reciprocal translocations. *Hum Genet* 63:345–348 (1983).
- Benet J, Genescà A, Navarro J, Egozcue J, Templado C: G-banding of human sperm chromosomes. *Hum Genet* 73:181–182 (1986).
- Benet J, Genescà A, Navarro J, Egozcue J, Templado C: Cytogenetic studies in motile sperm from normal men. *Hum Genet* 89:176–180 (1992).
- Benkhalifa M, Malet P, Qumsiyeh MB, Boucher D, Bellec V, Menezo Y: Chromosome aberrations in normal and translocated human sperm: role in reproduction pathology. *Rev Fr Gynecol Obstet* 2:288–296 (1994).
- Blanco J, Egozcue J, Clusellas N, Vidal F: FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and interchromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenet Cell Genet* 83:275–280 (1998).
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F: Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 106:500–505 (2000).
- Brandriff B, Gordon L, Ashworth LK, Littman V, Watchmaker G, Carrano AV: Cytogenetics of human sperm: meiotic segregation in two translocation carriers. *Am J Hum Genet* 38:197–208 (1986).
- Brandriff BF, Gordon L, Moore D II, Carrano AV: An analysis of structural aberrations in human sperm chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 47:29–36 (1988).
- Burns JP, Koduru PR, Alonso ML, Chaganti RS: Analysis of meiotic segregation in a man heterozygous for two reciprocal translocations using the hamster in vitro penetration system. *Am J Hum Genet* 38:954–964 (1986).
- Cifuentes P, Navarro J, Míguez L, Egozcue J, Benet J: Sperm segregation analysis of a complex chromosome rearrangement, 2;22;11, by whole chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet* 82:204–209 (1998).
- Cifuentes P, Navarro J, Blanco J, Vidal F, Míguez L, Egozcue J, Benet J: Cytogenetic analysis of sperm chromosomes and sperm nuclei in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) by in situ hybridization. *Eur J Hum Genet* 7:231–238 (1999a).
- Cifuentes P, Navarro J, Egozcue J, Benet J: Segregation analysis on sperm chromosomes in two carriers of a t(9;17) reciprocal translocation: whole chromosome painting study. *Hum Reprod* 14(s1):239 (1999b).
- Colls P, Templado C, Martínez-Pasarell O, Darroudi F, Natarajan AT: Sequential G-banding FISH on human sperm chromosomes. *Chromosome Res* 5:457–461 (1997).
- Cora T, Acar H, Kaynak M: Molecular cytogenetic detection of meiotic segregation patterns in sperm nuclei of carriers of 46,XY,t(15;17)(q21;q25). *J Androl* 23:793–798 (2002).
- De Braekeleer M, Dao TN: Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod* 5:519–528 (1990).
- De Braekeleer M, Dao TN: Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6:245–250 (1991).
- Egozcue J, Blanco J, Vidal F: Chromosomes studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 3:441–452 (1997).
- 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* 6:93–105 (2000).
- Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M, Munné S: Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertil Steril* 79:1528–1534 (2003).
- Estop AM, Levinson F, Cieply KM, Van Kirk V: The segregation of a translocation t(1;4) in two male carriers heterozygous for the translocation. *Hum Genet* 89:425–429 (1992).
- Estop AM, Van Kirk V, Cieply K: Segregation analysis of four translocations, t(2;8), t(3;15), t(5;7), and t(10;12), by sperm chromosome studies and a review of the literature. *Cytogenet Cell Genet* 70:80–87 (1995).
- Estop AM, Cieply KM, Aston CE: The meiotic segregation pattern of a reciprocal translocation t(10;12)(q26.1;p13.3) by fluorescence in situ hybridization sperm analysis. *Eur J Hum Genet* 5:78–82 (1997).
- Estop AM, Cieply KM, Wakim A, Feingold E: Meiotic products of two reciprocal translocations studied by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 83:193–198 (1998).
- Estop AM, Cieply KM, Munné S, Feingold E: Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of the spermatozoa of a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Hum Genet* 104:412–417 (1999).
- Estop AM, Cieply KM, Munné S, Surti U, Wakim A, Feingold E: Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? *Sperm FISH studies*. *Hum Genet* 106:517–524 (2000).
- Faraut T, Mermet MA, Demongeot J, Cohen O: Cooperation of selection and meiotic mechanisms in the production of imbalances in reciprocal translocations. *Cytogenet Cell Genet* 88:15–21 (2000).
- Geneix A, Schubert B, Force A, Rodet K, Briançon G, Boucher D: Sperm analysis by FISH in a case of t(17;22)(q11;q12) balanced translocation: Case report. *Hum Reprod* 17:325–331 (2002).
- Giltay JC, Kastrop PMM, Tiemessen CHJ, Van Inzen WG, Scheres JMJC, Pearson PL: Sperm analysis in a subfertile male with a Y;16 translocation, using four-color FISH. *Cytogenet Cell Genet* 84:67–72 (1999).
- Goldman ASH, Hultén MA: Meiotic analysis by FISH of a human male 46,XY,t(15;20)(q11.2;q11.2) translocation heterozygote: quadrivalent configuration, orientation and first meiotic segregation. *Chromosoma* 102:102–111 (1993).
- Guttenbach M, Schmid M: Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 46:553–558 (1990).
- Guttenbach M, Engel W, Schmid M: Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations. A review. *Hum Genet* 100:1–21 (1997).
- Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Honda N, Hara T, Ohama K: Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers, t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triple-color fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 105:428–436 (1999).
- Jacobs PA: The chromosome complement of human gametes. *Oxf Rev Reprod Biol* 14:47–72 (1992).
- Jalbert P, Sele B, Jalbert H: Reciprocal translocations: a way to predict the mode of imbalanced segregation by pachytene-diagram drawing. *Hum Genet* 55:209–222 (1980).
- Jendery J: Sperm chromosome analysis of two males heterozygous for a t(2;17)(q35;p13) and a t(3;8)(p13;p21) reciprocal translocation. *Hum Genet* 90:171–173 (1992).
- Lim AS, Lim TH, Kee SK, Chieng R, Tay SK: Sperm segregation patterns by fluorescence in situ hybridization studies of a 46,XY,t(2;6) heterozygote giving rise to a rare triploid product of conception with a 69,XXY,t(2;6)(p12;q24) der(6)t(2;6)(p12;q24)pat karyotype. *Am J Med Genet* 117:172–176 (2003).
- Martin RH: A detailed method for obtaining preparations of human sperm chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 35:252–256 (1983).
- Martin RH: Analysis of human sperm chromosome complements from a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Clinical Genet* 25:357–361 (1984).
- Martin RH: Meiotic segregation of human sperm chromosomes in translocation heterozygotes: report of a t(9;10)(q34;q11) and a review of the literature. *Cytogenet Cell Genet* 47:48–51 (1988).
- Martin RH: Sperm chromosome analysis of two men heterozygous for reciprocal translocations: t(1;9)(q22;q31) and t(16;19)(q11.1;q13.3). *Cytogenet Cell Genet* 60:18–21 (1992).
- Martin RH: Sperm chromosome complements in a man heterozygous for a reciprocal translocation t(2;3)(q24;p26). *Hum Reprod* 9:1512–1515 (1994).
- Martin RH, Hultén M: Chromosome complements in 695 sperm from three men heterozygous for reciprocal translocations, and a review of the literature. *Hereditas* 118:165–175 (1993).
- Martin RH, Spriggs EL: Sperm chromosome complements in a man heterozygous for a reciprocal translocation 46,XY,t(9;13)(q21.1;q21.1) and a review of the literature. *Clin Genet* 47:42–46 (1995).
- Martin RH, Barclay L, Hildebrand K, Ko E, Fowlow SB: Cytogenetic analysis of 400 sperm from three translocation heterozygotes. *Hum Genet* 86:33–39 (1990a).
- Martin RH, McGillivray B, Barclay L, Hildebrand K, Ko E: Sperm chromosome analysis in a man heterozygous for a reciprocal translocation 46,XY,t(12;20)(q24.3;q11). *Hum Reprod* 5:606–609 (1990b).
- Martini E, Von Bergh ARM, Coonen E, de Die-Smulders CEM, Hopman AHN, Ramaekers FCS, Geraedts JPM: Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3;11)(q27.3;q24.3) by triple FISH. *Hum Genet* 102:157–165 (1998).
- Mennicke K, Diercks P, Schlieker H, Bals-Pratsch M, Al Hasani S, Diedrich K, Schwinger E: Molecular cytogenetic diagnostics in sperm. *Int J Androl* 20 (Suppl 3):11–19 (1997).
- Mercier S, Morel F, Fellman F, Roux C, Bresson JL: Molecular analysis of the chromosomal equipment in spermatozoa of a 46,XY,t(7;8)(q11.2;cen) carrier by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 102:446–451 (1998).
- Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Amice V, Amice J, De Braekeleer M: Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *Int J Androl* 27:200–212 (2004a).
- Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Marchetti C, Lefebvre V, Delobel B, Amice V, Amice J, De Braekeleer M: Lack of intraindividual variation of unbalanced spermatozoa frequencies from a 46,XY,t(9;22)(q21;q11.2) carrier: Case report. *Hum Reprod* 19:2227–2230 (2004b).

- Morel F, Douet-Guilbert N, Roux C, Tripogney C, Le Bris MJ, De Braekeleer M, Bresson JL: Meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21:cen) translocation in two carrier brothers. *Fertil Steril* 81:682–685 (2004c).
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Carrera M, Egozcue J, Benet J: Meiotic segregation analysis in a t(4;8) carrier: comparison of FISH methods on sperm chromosome metaphases and interphase sperm nuclei. *Eur J Hum Genet* 9:395–403 (2001).
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Carrera M, Egozcue J, Benet J: Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Mol Hum Reprod* 8:958–963 (2002).
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Abad C, Guitart M, Egozcue J, Benet J: From spermatocytes to sperm: meiotic behaviour of human male reciprocal translocations. *Hum Reprod* 19:2515–2522 (2004).
- Pellestor F, Sèle B, Jalbert H, Jalbert P: Direct segregation analysis of reciprocal translocations: a study of 283 sperm karyotypes from four carriers. *Am J Hum Genet* 44:464–473 (1989).
- Pellestor F, Girardet A, Coignet L, Andreo B, Lefort G, Charlieu JP: Cytogenetic analysis of meiotic segregation in sperm from two males heterozygous for reciprocal translocations using PRINS and hamster techniques. *Cytogenet Cell Genet* 78:202–208 (1997).
- Pellestor F, Imbert I, Andreo B, Lefort G: Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ labelling techniques. *Hum Reprod* 16:1155–1164 (2001).
- Prigent Y, Vigié F: Ségrégations germinales chez un homme 46,XY,t(1;8) (q33.2;q24.1) par hybridation in situ fluorescente (FISH). Ninth French Cytogeneticists Congress, Paris (1996).
- Rickards GK: Orientation behavior of chromosome multiples of interchange (reciprocal translocation) heterozygotes. *Annu Rev Genet* 17:443–498 (1983).
- Rives N, Jarnot M, Mousset-Simeon N, Joly G, Mace B: Fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis of chromosome segregation and interchromosomal effect in spermatozoa of a reciprocal translocation t(9,10)(q11;p11.1) carrier. *J Hum Genet* 48:535–540 (2003).
- Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Devillard F, Lespinasse J, Sèle B: Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocations: analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 71:240–246 (1995).
- Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi R: Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 274:911–913 (1978).
- Sèle B, Pellestor F, Estrade C, Ostorero C, Warembourg E, Gelas M, Jalbert H, Jalbert P: Mise en évidence des chromosomes de spermatozoïdes humains dans un système hétérospécifique: difficultés techniques. *Pathologie Biologie* 33:875–880 (1985).
- Shi Q, Martin RH: Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction* 121:655–666 (2001).
- Spriggs EL, Martin RH: Analysis of segregation in a human male reciprocal translocation carrier, t(1;11)(p36.3;q13.1), by two-colour fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Develop* 38:247–250 (1994).
- Spriggs EL, Martin RH, Hultén M: Sperm chromosome complements from two human reciprocal translocation heterozygotes. *Hum Genet* 88:447–452 (1992).
- Templado C, Navarro J, Benet J, Genescà A, Perez MM, Egozcue J: Human sperm chromosome studies in a reciprocal translocation t(2;5). *Hum Genet* 79:24–28 (1988).
- Templado C, Navarro J, Requena R, Benet J, Ballesta F, Egozcue J: Meiotic and sperm chromosome studies in a reciprocal translocation, t(1;2)(q32;q36). *Hum Genet* 84:159–162 (1990).
- Trappe R, Böhm D, Kohlhasse J, Weise A, Liehr T, Essers G, Meins M, Zoll B, Bartels I, Burfeind P: A novel family-specific translocation t(2;20)(p24.1;q13.1) associated with recurrent abortions: molecular characterization and segregation analysis in male meiosis. *Cytogenet Genome Res* 98:1–8 (2002).
- Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, Bonduelle M, Vandervorst M, Van Steirteghem A, Liebaers I: Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Mol Hum Reprod* 5:682–690 (1999).
- Van Hummelen P, Manchester D, Lowe X, Wyrobek AJ: Meiotic segregation, recombination, and gamete aneuploidy assessed in a t(1;10)(p22.1;q22.3) reciprocal translocation carrier by three- and four-probe multicolor FISH in sperm. *Am J Hum Genet* 61:651–659 (1997).
- Wyrobek AJ, Alhborn T, Balhorn R, Stanker L, Pinkel D: Fluorescence in situ hybridization to Y chromosome in decondensed human sperm nuclei. *Mol Reprod Develop* 27:200–208 (1990).

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

