

**ESTUDI CITOGENÈTIC I MOLECULAR DEL  
PROCÉS MEIÒTIC EN INDIVIDUS  
PORTADORS DE TRANSLOCACIONS  
RECÍPROQUES EQUILIBRADES**

Memòria presentada per Maria Oliver Bonet per a aspirar al grau de Doctor per la  
Universitat Autònoma de Barcelona en el programa de Doctorat de Biologia Cel·lular

Bellaterra, Juny de 2003



El Dr. Jordi Benet Català, Professor Titular, i la Dra. Joaquina Navarro Ferreté, Professora Titular del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona

## CERTIFIQUEN

Que na Maria Oliver Bonet ha realitzat sota la seva direcció, en la Unitat de Biologia de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, el treball que, per optar al títol de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona en el programa de Doctorat de Biologia Cel·lular, presenta amb el títol de

ESTUDI CITOGENÈTIC I MOLECULAR DEL PROCÉS MEIÒTIC EN INDIVIDUS PORTADORS DE TRANSLOCACIONS RECÍPROQUES EQUILIBRADES

Dr. Jordi Benet

Dra. Joaquina Navarro

Bellaterra, Juny 2003



El nostre agraïment a les institucions que han donat suport econòmic a aquest treball:

- Ministerio de Sanidad: projectes FIS 98/0031-01 i FIS PI020258
- Generalitat de Catalunya: CIRIT, 1999 SGR-00104 i CIRIT, 2001 SGR-00201.

Maria Oliver Bonet ha estat beneficiària d'una beca predoctoral del Ministerio de educación y Cultura, AP(97), i d'una beca per estades a l'estranger de la Generalitat de Catalunya (2001BEAI200094).

## ÍNDEX







<b>1. Introducció</b>	1
1.1. L'espermatogènesi	3
1.2. La meiosi	5
1.2.1. El complexe sinaptonemal: estructura i funció	6
1.2.2. La recombinació meiòtica	7
1.3. Mètodes d'estudi del procés meiòtic	8
1.3.1. Estudi de la recombinació meiòtica	8
1.3.2. Estudi del procés sinàptic	10
1.3.3. Aproximacions metodològiques a l'anàlisi de la segregació cromosòmica	11
1.3.3.1. Anàlisi de cromosomes d'espermatozoide	11
1.3.3.2. Anàlisi de nuclis descondensats d'espermatozoides	12
1.4. Anomalies cromosòmiques en l'espècie humana	13
1.5. Incidència d'anomalies cromosòmiques en els gàmetes d'individus control	14
1.6. Estudi citogenètic i del procés meiòtic en individus portadors de reorganitzacions cromosòmiques equilibrades	18
1.6.1. Incidència de les reorganitzacions cromosòmiques en població infèril	18
1.6.2. El comportament meiòtic de les reorganitzacions estructurals	18
1.6.3. Meiosi en portadors de translocacions recíproques equilibrades	19
<b>2. Objectius</b>	27
<b>3. Material i mètodes</b>	33
3.1. Obtenció d'extensions de cromosomes derivats d'espermatozoides humans: tècnica de fecundació <i>in vitro</i> heteròloga hámster-humà	35
3.1.1. Protocol	35
3.1.2. Material biològic	35

3.1.2.1. Obtenció dels oòcits	35
3.1.2.2. Processat dels oòcits	37
3.1.2.3. Espermatozoides	37
3.1.3. Inseminació, control de penetració i cultiu	38
3.1.4. Obtenció de cromosomes derivats de pronuclis d'espermatozoides	39
3.1.5. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent dels pronuclis masculins	39
3.2. Obtenció d'extensions de nuclis descondensats d'espermatozoide	40
3.2.1. Fixació	40
3.2.2. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent en nuclis d'espermatozoide	41
3.2.2.1. Descondensació	41
3.2.2.2. Hibridació <i>in situ</i>	41
3.3 Obtenció d'extensions de cromosomes meiótics i complexos sinaptonemals	42
3.3.1. Biòpsia testicular	42
3.3.2. Cromosomes meiótics	44
3.3.2.1. Hibridació <i>in situ</i> sobre cromosomes meiótics	44
3.3.3. Complexos sinaptonemals	45
3.3.3.1. Immunocitogenètica	45
3.3.4. Hibridació <i>in situ</i> sobre extensions de complexos sinaptonemals	46
3.3.4.1. CenM-FISH	46
3.3.4.2. Hibridació <i>in situ</i>	47
3.4. Obtenció de dades i tractament d'imatges	50
3.4.1. Anàlisi estadístic de les dades	50
<b>4. Resultats</b>	<b>53</b>
4.1. Article 1	55

4.2. Article 2	69
4.3. Article 3	79
4.4. Article 4	115
<b>5. Discussió</b>	139
5.1. Contribució de les translocacions recíproques en l'incidència de gàmetes cromosòmicament desequilibrats	141
5.2. Anàlisi de la segregació cromosòmica. Resultat en les diferents etapes de l'espermatogènesi	146
5.3. Relació entre productes d'un mateix tipus de segregació	148
5.4. Anàlisi de quiasmes	150
5.5. Presència d'efectes intercromosòmics	151
5.6. Els complexos sinaptonemals com a estructura informativa del procés sinàptic	153
<b>6. Conclusions</b>	161
<b>7. Bibliografia</b>	167







# **1. INTRODUCCIÓ**

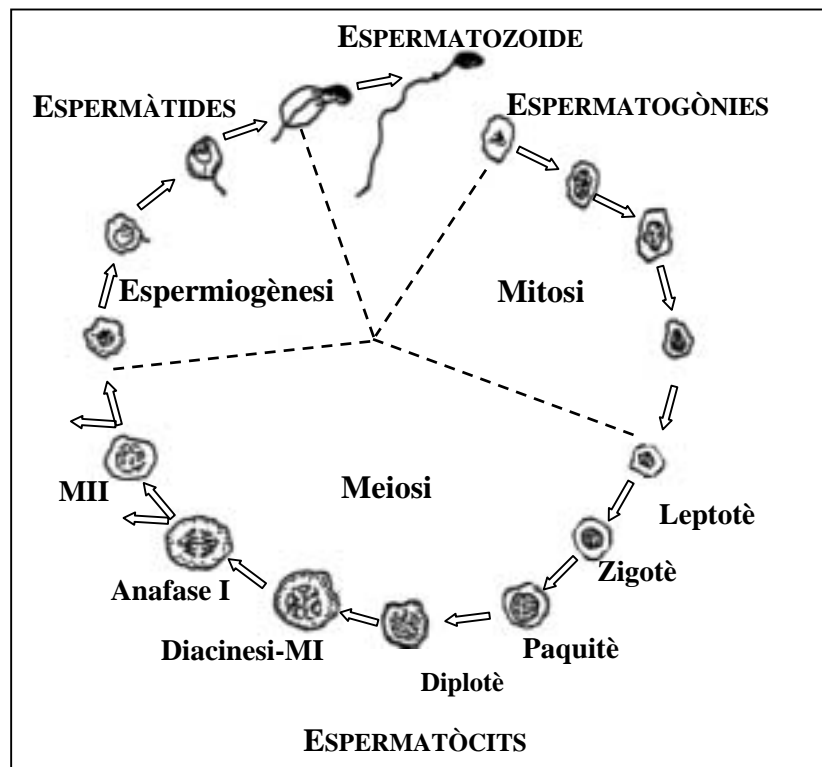




### 1.1. L'ESPERMATOGÈNESI

L'espermatogènesi és un procés d'esdeveniments cel·lulars seqüencials mitjançant el qual les cèl·lules mare germinals diploïds es transformen en espermatozoides haploïds. En aquest procés hi trobem tres tipus cel·lulars diferents: les espermatogònies, els espermatòcits i les espermatides. Els fenòmens citològics que afecten als diferents tipus cel·lulars corresponen a diferents etapes de l'espermatogènesi, i es poden agrupar en tres fases diferenciades (Figura 1). Durant la primera de les fases, les espermatogònies proliferen mitòticament i originen dos subtipus d'espermatogònies: les espermatogònies tipus A, que continuaran proliferant mitòticament per donar lloc a més espermatogònies, i les espermatogònies tipus B, que donaran lloc als espermatòcits, iniciant-se així el procés d'espermatogènesi.

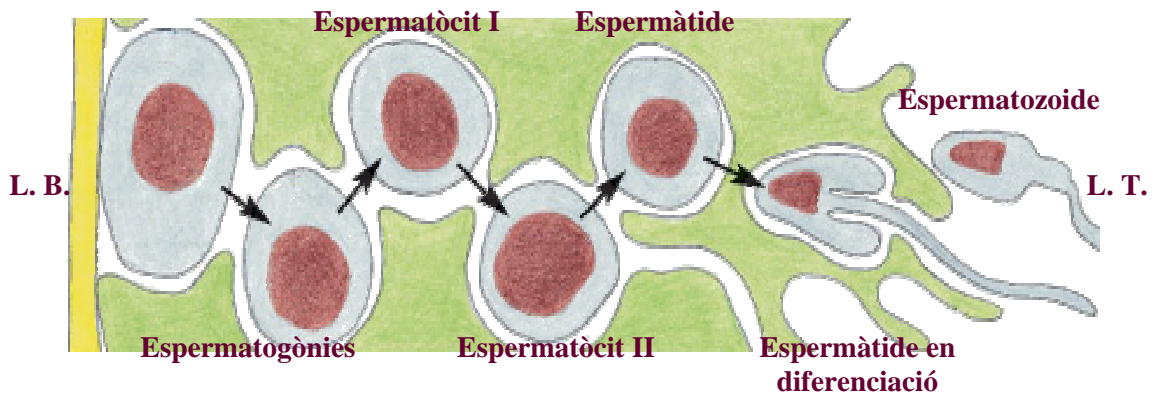
**Figura 1.** Esquema de l'espermatogènesi



Durant la segona etapa, els espermatòcits es divideixen meiotícament i esdevenen espermatides haploïds, les quals, ja durant la darrera fase de l'espermatogènesi, coneguda amb el nom d'espermiogènesi, es diferencien en espermatozoides.

La disposició de les cèl·lules implicades en l'espermatogènesi a l'interior dels túbuls seminífers no és a l'atzar. Donat que es tracta d'un procés sincrònic que s'inicia a intervals regulars, les cèl·lules queden ordenades en vàries capes cel·lulars de tal manera que a cada una de les capes hi trobem grups de cèl·lules en la mateixa etapa de desenvolupament. Les espermatogònies es col·loquen a prop de la membrana basal, i entre elles i la llum del túbul s'hi disposen la resta de tipus cel·lulars en el següent ordre: espermatòcit I, espermatòcit II, espermatida i espermatozoide (Figura 2).

**Figura 2.** Estratificació de l'epiteli seminífer (adaptat d'Alberts i col, 2002)



**L.B.:** Làmina Basal; **L.T.:** Llum del Túbul seminífer

La durada de l'espermatogènesi i de les diferents etapes que la conformen és específica i constant per a cada espècie. Pel que fa a l'home, aproximadament cada 16 dies grups d'espermatogònies interconnectades entre sí a través de ponts

citoplasmàtics inicien simultàniament un nou cicle espermatogènic, que es completarà aproximadament en 74 dies. Així, l'estratificació de l'epiteli seminífer que s'observa a nivell histològic és conseqüència directa tant de l'entrada sincrònica i cíclica de grups d'espermatogònies en el procés espermatogènic, com de la durada constant de les diferents etapes de l'espermatogènesi.

## **1.2. LA MEIOSI**

La generació de gàmetes haplòids genèticament normals i complets és essencial per a la reproducció i la continuïtat de l'espècie. La meiosi és el procés encarregat de vigilar que cada gàmeta rebi una còpia de cada cromosoma i de possibilitar alhora l'intercanvi de material genètic entre cromosomes homòlegs (recombinació meiòtica). D'aquesta manera s'aconsegueix mantenir constant el número cromosòmic i assegurar la variabilitat genètica de l'espècie.

Per tal que cada una de les gàmetes rebi una única còpia de cada parell de cromosomes, la cèl·lula meiòtica fa una única replicació de DNA seguida de dues rondes de divisions nuclears. A la primera divisió, o meiosi I (MI), es dona la segregació dels cromosomes homòlegs cap a pols oposats. Durant la segona divisió, o meiosi II (MII), ocorre la segregació de les cromàtides germanes, de manera anàloga a la divisió mitòtica, tot generant els gàmetes haplòids. El procés s'inicia amb una profase meiòtica especialment llarga. És precisament en aquesta fase cel·lular quan tenen lloc els dos esdeveniments transcendents de la meiosi: l'aparellament físic dels cromosomes homòlegs, amb la formació del complex sinaptonemal (CS), i la recombinació meiòtica.

### **1.2.1 El complexe sinaptonemal: estructura i funció**

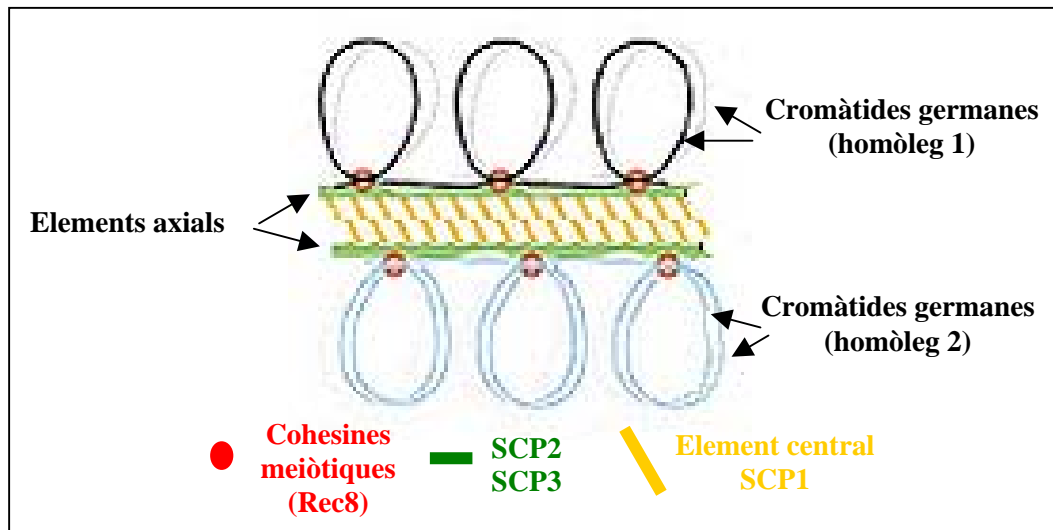
El complexe sinaptonemal és una estructura proteïca, tripartita i microscòpica exclusiva de les cèl·lules meiótiques, descrita per primera vegada l'any 1956 (Moses 1956), i molt conservada al llarg de l'evolució. Apareix plenament desenvolupada entre els homòlegs aparellats d'un bivalent a paquí, i intervé en el manteniment de l'associació íntima dels cromosomes homòlegs, la sinapsi. Amb anterioritat a l'aparició del CS, durant l'etapa de leptotè, cada cromosoma homòleg (format per dues cromàtides germanes), s'associa a una estructura proteïca d'aproximadament 50nm. de diàmetre coneguda com element axial. A l'etapa de zigotè, a mesura que progressa l'aparellament dels homòlegs, els elements axials derivats dels cromosomes homòlegs comencen a unir-se gràcies a la incorporació d'un altre tipus de proteïna, que intervé en la constitució de l'element central del CS. Una vegada s'ha completat la sinapsi, els elements axials es coneixen amb el nom d'elements laterals.

En els darrers anys s'han anat identificant les proteïnes que formen part d'aquesta estructura. Les tres més ben caracteritzades són: la proteïna SCP1 (també coneguda com SYN1), SCP2 i SCP3 (o COR1) (Schalk et al. 1998). SCP2 i SCP3 són components dels elements laterals, mentre que SCP1 és un component de l'element central (Figura 3).

L'estructura del CS és el suport físic on es disposa la maquinària enzimàtica necessària per dur a terme els intercanvis d'informació genètica. Malgrat que el CS es disposa al llarg de tot el bivalent, la seva presència no garanteix l'aparició de fenòmens de recombinació a qualsevol punt, sinó que l'intercanvi genètic únicament

ocorre allà on se situa aquesta maquinària enzimàtica (Petes 2001). Aquests llocs reben el nom de nòduls de recombinació.

**Figura 3.** Estructura del complex sinaptonemal (adaptada de (Petronczki et al. 2003))



### 1.2.2 La recombinació meiótica

La recombinació ocorre després de la replicació de DNA, durant la profase I. Els processos de recombinació meiótica inclouen trencaments de doble cadena de DNA, la invasió de la cadena, la formació de unions de Holliday i d'heteroduplex de DNA, i el processat dels intermediaris de recombinació mitjançant processos que inclouen la reparació d'errors de replicació de DNA. La distribució dels punts de recombinació al llarg dels bivalents es controla de manera que sigui obligada la presència de al manco un intercanvi per parella d'homòlegs, però limitant al mateix temps el nombre de nòduls per bivalent (fenomen d'interferència) ((Hultén 1974). La recombinació recíproca porta a la formació de quiasmes durant la profase meiótica i és essencial tant des del punt de vista mecànic com des del punt de vista genètic. Des del punt de vista mecànic, perquè els entrecreuaments es transformen en quiasmes,

els quals són necessaris per mantenir els homòlegs units i així assegurar la seva correcta disjunció durant la primera divisió meiótica. Les errades en aquest procés condueixen a la no disjunció i, conseqüentment, a la generació d'aneuploidies. Des del punt de vista genètic, perquè gràcies a la recombinació es generen noves combinacions al·lèliques, proporcionant la diversitat genètica.

En mamífers, un dels components principals dels nòduls de recombinació és la proteïna Mlh1 (Baker et al. 1996), homòloga a la proteïna MutL d'*Escherichia coli*. És una proteïna de reparació de DNA que apareix formant agregats sobre el CS a l'estadi de paquitè (Plug et al. 1998). En ratolí, el seu nombre i distribució coincideixen amb els patrons d'intercanvi meiótic i d'interferència genètica positiva observats en estudis citogenètics i moleculars previs (Anderson et al. 1999). Aquests resultats, juntament amb d'altres estudis realitzats en humà, aporten evidències suficients per poder considerar els *foci* de Mlh1 com a llocs putatius de recombinació (Barlow and Hultén 1998; Koehler et al. 2002).

### **1.3 MÈTODES D'ESTUDI DEL PROCÉS MEIÒTIC**

#### **1.3.1 Estudi de la recombinació meiótica**

Clàssicament, l'estudi de l'intercanvi genètic s'ha realitzat mitjançant aproximacions genètiques i citològiques (Hassold et al. 2000). L'anàlisi citològica dels bivalents en l'estadi de diacinesi-MI permet conèixer el número i la posició dels quiasmes en cada un dels bivalents. Les tècniques habitualment utilitzades per a l'obtenció dels bivalents meiótics són modificacions de les descrites en d'altres treballs (Evans et al. 1964). A més de permetre l'anàlisi de recombinació, aquesta tècnica també s'utilitza quan es volen observar totes les fases de la meiosi, des

d'espermatogònies fins a espermatozoides, de manera que és possible realitzar un seguiment de tot el procés: des del moment en que es produeix la sinapsi plena i la recombinació, a la fase de paquíté, passant per la fase de diacinesi-MI on es poden observar quiasmes que indiquen els llocs on prèviament han tingut lloc processos de recombinació, fins a la fase de MII, on podem trobar els cromosomes resultants de la primera segregació meiótica. Estudis realitzats amb aquesta tècnica d'extensió cromosòmica combinada amb tècniques de tinció uniforme, van permetre fer una aproximació al número i al patró de distribució dels punts de recombinació per cada bivalent cromosòmic (Laurie and Hultén 1985).

Actualment, l'aplicació de tècniques d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) sobre extensions de complements de cromosomes meiótics facilita l'anàlisi del comportament meiótic de cromosomes particulars. Aquesta tècnica permet la detecció de seqüències específiques de DNA, i es basa en el reconeixement d'una seqüència diana del DNA cel·lular per part d'una sonda o seqüència de nucleòtids complementària. Per tal que es pugui dur a terme el reconeixement o hibridació entre les dues seqüències complementàries, cal provocar la desnaturalització d'ambdues molècules de DNA. Malgrat que la tècnica de FISH ens permet identificar els bivalents meiótics, l'especial morfologia i condensació d'aquests durant l'etapa de diacinesi-MI dificulta estimar amb precisió les distàncies físiques entre els quiasmes presents per bivalent, complicant així l'estudi de la recombinació meiótica

Recentment, s'ha desenvolupat un mètode alternatiu que permet analitzar els processos d'intercanvi genètic a l'estadi de paquíte. Aquesta tècnica utilitza la localització d'anticossos fluorescents de proteïnes pròpies del CS i de la maquinària de recombinació (Barlow and Hultén 1996). D'aquesta manera es realitza l'anàlisi

dels processos recombinants a través de les proteïnes que es troben en els nòduls de recombinació. Aquesta tècnica pot proporcionar mapes de recombinació més precisos que els obtinguts mitjançant l'anàlisi citogenètica dels bivalents a estadi de diacinesi-MI (Laurie and Hultén 1985).

### **1.3.2. Estudi del procés sinàptic**

L'estudi dels complexos sinaptonemals durant la profase meiótica ha proporcionat molta informació del procés normal d'aparellament dels cromosomes meiótics. Les tècniques clàssiques d'observació són la de tinció amb nitrat de plata (Solari 1980) que permet l'anàlisi al microscopi òptic, i la tècnica seqüencial de microscòpia òptica-microscòpia electrònica (Navarro et al. 1981). Aquestes metodologies han aportat gran quantitat d'informació sobre la morfologia i l'estructura dels CS i han ajudat a caracteritzar la cinètica de formació dels CS al llarg de la profase (Vidal et al. 1984). A més, permeten la realització d'idiogrames de CS a partir de l'establiment de l'índex centromèric de cada un dels CS (Solari 1980). Diferents treballs realitzats entre els anys vuitanta i noranta han posat de manifest la presència d'un seguit de formacions anòmales dels CS, com ara anomalies sinàptiques (Navarro et al. 1986), CS fragmentats i CS corresponent a figures estructurals anòmales (Hultén et al. 1974; Navarro et al. 1991; Navarro et al. 1986; Vidal et al. 1982).

La detecció de les proteïnes que formen el CS, els nòduls de recombinació i els cinetocors a través de la tècnica d'immunocitoquímica proporciona també informació sobre l'estat sinàptic del bivalent. L'ús d'aquesta metodologia fa possible, en protocols de microscòpia òptica, una identificació més fàcil i ràpida dels



punts de recombinació i l'establiment de l'índex centromèric. A més, a diferència de les tècniques clàssiques, el protocol de la immunocitoquímica preserva la cromatina fins al punt de permetre l'aplicació de tècniques de FISH (Barlow and Hultén 1996), de manera que, fins al moment, ha estat possible la identificació simultània de fins a quatre bivalents en l'estadi de paquitè.

### **1.3.3. Aproximacions metodològiques a l'anàlisi de la segregació cromosòmica**

El complement cromosòmic de l'espermatozoide, producte final de l'espermatogènesi, proporciona informació sobre els processos que han tingut lloc durant la meiosi. L'espermatozoide és una cèl·lula molt diferenciada, amb una elevada especialització dirigida a aconseguir la fecundació de l'oòcit. Un dels trets característics de l'espermatozoide és l'elevat grau de condensació del seu nucli, degut bàsicament a la substitució de les histones per protamines. Donat que el contingut cromosòmic únicament es pot analitzar després de la descondensació del seu nucli, s'ha fet necessari desenvolupar una sèrie de tècniques que aconseguixin aquesta descondensació.

#### *1.3.3.1. Anàlisi de cromosomes d'espermatozoide*

L'anàlisi del contingut cromosòmic de l'espermatozoide humà fou descrit per primera vegada l'any 1978 (Rudak et al. 1978). Els cromosomes d'espermatozoide humà s'obtenen després d'un procés llarg que s'inicia amb la fusió heteròloga de l'oòcit de hàmmster amb l'espermatozoide humà. A continuació ocorre la descondensació del material cromosòmic de l'espermatozoide a l'interior del citoplasma de l'oòcit i la formació dels pronuclis masculí i femení. Mitjançant l'ús d'antimitòtic, s'atura el procés a l'estadi de la primera metafase mitòtica del zigot

format. La fixació d'aquests zigots permet obtenir els complements cromosòmics, els quals poden analitzar-se ja sigui mitjançant tècniques de bandeig cromosòmic (Benet et al. 1986) o bé tècniques de FISH (Colls et al. 1997), i es fa possible la identificació de qualsevol tipus d'anomalia cromosòmica. Amb aquesta tècnica s'ha pogut determinar, en diferents estudis, l'incidència d'anomalies cromosòmiques en individus controls (Templado et al. 1996), en individus portadors de cariotips anòmals tant numèrics (Benet and Martin 1988) com estructurals (Cifuentes et al. 1998), en individus exposats a diferents agents genotòxics (Alvarez et al. 1997) i en individus afectats per diferents tipus de càncer (Martin et al. 1997). No obstant, i malgrat que l'ús d'aquesta tècnica permet observar la totalitat del contingut nuclear de l'espermatozoide, el número de complements que es poden analitzar per individu és, des del punt de vista estadístic, relativament baix (Guttenbach et al. 1997).

#### *1.3.3.2. Anàlisi de nuclis descondensats d'espermatozoide*

Un avenç quantitatiu en l'estudi de la segregació cromosòmica en les gàmetes fou l'aplicació de les tècniques de FISH en nuclis d'espermatozoides químicament descondensats (Holmes and Martin 1993; Wyrobek et al. 1990). Mitjançant aquesta tècnica s'han fet estudis d'aneuploidia en pacients infèrtils amb cariotip normal (Shi and Martin 2001) i en pares d'individus afectats per la síndrome de Turner (Martínez-Pasarell et al. 1999; Soares et al. 2001) o la síndrome de Down (Blanco et al. 1998c); també s'han dut a terme anàlisis de segregació en pacients portadors d'anomalies numèriques (Estop et al. 1998b; Martin et al. 1999) i de reorganitzacions estructurals (Blanco et al. 1998a; Geneix et al. 2002).

Aquest és un mètode ràpid, relativament simple, que a més permet analitzar un número elevat d'espermatozoides. No obstant, també presenta limitacions. Entre

altres, aquesta metodologia es basa en la identificació de normalment dos o tres cromosomes per anàlisi, de manera que no és possible l'anàlisi de tot el complement cromosòmic d'un espermatozoide determinat.

#### 1.4. ANOMALIES CROMOSÒMIQUES EN L'ESPÈCIE HUMANA

La reproducció de l'espècie humana destaca per la presència anormalment elevada d'embrions portadors d'algun tipus d'anomalies cromosòmiques. Els estudis citogenètics realitzats en fetus de diferent edat gestacional i en nounats mostren l'elevada freqüència i la gran varietat d'anomalies cromosòmiques en produir-se la concepció. Si considerem les dades aportades en la darrera revisió (Jacobs 1992), les cromosomopaties, ja siguin numèriques o estructurals, són presents en el 47.9% dels avortaments espontanis, els quals són a la vegada un 15% de totes les concepcions reconegudes, en el 5.65 % de les morts perinatals i en el 0.93% dels nounats. La Taula 1 mostra la distribució de les anomalies en les tres poblacions esmentades.

**Taula 1:** adaptada de Jacobs, 1992

Població	Tipus d'anomalies (%)					Total
	Trisomies	Monosomies	Poloploidies	Estructurals	Altres	
Avortaments espontanis	26.8	8.6	9.8	2	0.7	47.9
Mort perinatal	3.8	0.25	0.6	0.4	0.6	5.65
Nounats	0.30	<0.01	-	0.6	0.02	0.93

La majoria de les anomalies numèriques, o aneuploidies, apareixen *de novo* com a resultat d'un error en la segregació dels cromosomes durant les divisions meiòtiques o postmeiòtiques. Aquest fenomen és conegut amb el nom de no disjunció i, en el cas de les divisions meiòtiques, pot ocórrer durant la meiosi I (errades en la segregació dels cromosomes homòlegs) o també durant la meiosi II

(errades en la segregació de les cromàtides germanes). Pel que fa a l'origen de les anomalies estructurals, un 80% (Jacobs 1992) són heretades d'un dels progenitors, el qual n'és portador en equilibri.

La major part d'aquestes anomalies es transmeten a les gàmetes a través del procés meiótic. Per tant, l'estudi de la gametogènesi és necessari quan es vol aprofundir en el coneixement dels processos que es poden veure alterats a causa d'aquestes anomalies, de la seva supervivència i transmissió i de la incidència en la descendència.

## **1.5. INCIDÈNCIA D'ANOMALIES CROMOSÒMIQUES EN ELS GÀMETES D'INDIVIDUS**

### **CONTROL**

Mitjançant la tècnica heteròloga hámster-humà (Rudak et al. 1978), s'han analitzat més de 20.000 complements d'espermatozoides de controls (Guttenbach et al. 1997). La mitjana d'espermatozoides portadors d'aberracions cromosòmiques estructurals pels diferents controls és d'aproximadament entre el 6 i el 7% (Guttenbach et al. 1997). L'elevada diferència trobada entre els diferents laboratoris reflecteix l'existència d'una variabilitat interindividual. Tot i així, l'ús de tècniques de fixació diferents (Kamiguchi i Mikamo, 1986) o bé els diferents criteris utilitzats a l'hora de considerar les anomalies tant numèriques com estructurals són factors que cal tenir en compte a l'hora d'interpretar aquesta variabilitat.

L'incidència d'anomalies cromosòmiques trobades es resumeix en la següent taula:

**Taula 2:** adaptada de Guttenbach et al, 1997

Referència	Percentatge d'anomalies		
	Estructurals	Numèriques	
		Hipohaploidia	Hiperhaploidia
Rudak et al. 1978	0.0	3.3	1.7
Martin et al. 1982	1.7	2.1	5.4
Martin et al. 1983	3.3	2.7	2.4
Brandriff et al. 1984	6.5	1.0	0.6
Brandriff et al. 1985	7.7	0.9	0.7
Kamiguchi and Mikamo 1986	13.0	0.5	0.5
Martin et al. 1987	6.2	3.4	1.3
Jenderny and Röhrborn 1987	6.2	0.8	0.8
Brandriff et al. 1988	6.9		
Martin and Rademaker 1990		3.3	0.7
Estop et al. 1991	3.6	6.3	2.0
Pellestor 1991	3.5	6.1	
Benet et al. 1992	6.9	9.1	2.0
Jenderny et al. 1992	8.4	0.9	0.9
Benkhalifa et al. 1994	7.0	5.0	3.0
Estop et al. 1995a	8.9		
Templado et al. 1996		9.1	1.9

Les anomalies estructurals descrites s'agrupen en tres categories: reorganitzacions estables (translocacions, insercions, cromosomes marcadors i petites deleccions que poden tenir el seu origen en les primeres etapes de l'espermatogènesi (segurament a nivell d'espermatogònia), elements inestables (anells, cromosomes dicèntrics, fragments acèntrics, gaps i trencaments cromosòmics) i, finalment, aberracions de cromàtide (gaps i trencaments). Els estudis realitzats mostren com un 64.4% dels trencaments tenen lloc en bandes G clares, que hi ha una relació d'aquests punts de trencament amb els llocs fràgils i els punts de trencament *de novo*, i que els cromosomes més afectats, tot i que no de manera significativa, són els cromosomes 3, 9 i 17 (Estop et al. 1995a). Pel que fa a les anomalies numèriques

descrites amb aquesta tècnica, diferents estudis mostren un augment significatiu en la incidència de disomies pels següents cromosomes: 1, 9, 21, X i Y (Martin and Rademaker 1990) (Templado et al. 1996).

Amb la tècnica de FISH en nuclis descondensats d'espermatozoide, s'han analitzat més de cinc milions d'espermatozoides d'individus controls. La Taula 3 mostra els percentatges de disomia trobats en els estudis realitzats en els darrers cinc anys, segons les dades aportades per la revisió realitzada per (Shi and Martin 2000). Segons es desprèn d'aquest treball, no tots els cromosomes mostren la mateixa susceptibilitat a la no disjunció, essent la freqüència mitjana de disomia de 0.15% pels cromosomes autosòmics i de 0.26% pels cromosomes sexuals (Shi and Martin 2000). L'anàlisi de FISH en caps descondensats també ha permès determinar la incidència d'anomalies estructurals en individus controls (Baumgartner et al. 1999; Slotter et al. 2000; Van Hummelen et al. 1996). El tipus d'anomalies estructurals que es poden detectar són les delecions telomèriques, les insercions, les translocacions i els cromosomes dicèntrics. Els autors estimen que la freqüència mitjana d'aquests tipus d'anomalies és de 1.4%, un resultat semblant a l'observat en els estudis fets amb la tècnica de hámster-humà (Brandriff et al. 1988).

**Taula 3** Freqüències de disomia en controls analitzats mitjançant la tècnica de FISH en nuclis d'espermatozoides descondensats

Referència	Disomia (%) per cromosoma																Sexuals
	1	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	17	18	21	22	
Assada et al. 2000									.07					.08			
Baumgartner et al. 1999															.07		.16
Blanco et al. 1998b			.14											.10	.38		.37
Carrell et al. 1999										.40				.20	.35		
Estop et al. 2000										.05				.07	.14		.22
Harkonen et al. 1999	.11			.05													
Honda et al. 1999											.31				.23		
Li and Hoshiai 1998													.12				.22
Martin and Rademaker 1999										.19						1.2	
Martínez-Pasarell et al. 1999			.04														.21
Martini et al. 1998										.07					.37		
McInnes et al. 1998	.09									.13					.37		
Mercier et al. 1998				.16	.14							.06		.21			
Nishikawa et al. 2000														.14			.43
Padungtod et al. 1999														.05			.14
Pang et al. 1999		.15	.13	.31	.23	.20	.20	.13	.05	.20			.20	.11	.18		.14
Rives et al. 2002		.07											.15	.02	.22	.25	.28
Rousseaux et al. 1998											.48				.48		
Rubes et al. 1998					.05												.22
Shi and Martin 2000										.07					.18		.36
Soares et al. 2001		.06								.10				.04	.07	.06	
Ushijima I et al. 2000										.09				.13	.19		.38

## **1.6. ESTUDI CITOGENÈTIC I DEL PROCÉS MEIÒTIC EN INDIVIDUS PORTADORS DE REORGANITZACIONS CROMOSÒMIQUES EQUILIBRADES**

### **1.6.1. Incidència de les reorganitzacions cromosòmiques en població infèrtil**

Els portadors de reorganitzacions cromosòmiques estructurals equilibrades solen presentar problemes de fertilitat, de manera que no és inusual que es detecti l'alteració després de la realització d'un cariotip sol·licitat per establir les causes d'esterilitat o d'avortaments recurrents. De fet, l'incidència d'anomalies cromosòmiques en les cèl·lules somàtiques de pacients infèrtils és molt més elevada que la que es troba en la població control (De Braekeleer and Dao 1991). Així, un 13.7% dels pacients azoospermics i un 4.6% dels pacients oligozoospermics són portadors de cariotips anòmals equilibrats (Shi and Martin 2001).

La presència d'alteracions cromosòmiques pot afectar el decurs normal del procés meiòtic. Les anomalies que podem trobar durant els processos meiòtics inclouen, entre altres, baix nombre de quiasmes, presència d'univalents, fragmentació, bivalents asimètrics i poliploidia, i poden constatar-se posteriorment en la presència de constitucions cromosòmiques alterades dels espermatozoides, fenomen que pot desembocar en pèrdua gamètica, reducció de la fertilitat o aneuploidia en la descendència (Egozcue et al. 2000).

### **1.6.2. El comportament meiòtic de les reorganitzacions estructurals**

Els estudis meiòtics en portadors de reorganitzacions estructurals són nombrosos (Chandley 1984; Goldman and Hultén 1992), i juntament amb els estudis de complexes sinaptonemals (Navarro et al. 1986), mostren en molts casos la presència d'anomalies sinàptiques que poden molt bé relacionar-se amb el major o



menor grau de severitat del bloqueig meiótic d'aquests pacients. En el cas de pacients portadors de reorganitzacions estructurals, els gàmetes poden presentar trisomies o monosomies parcials resultants de la segregació anòmala, ocorreguda durant la meiosi, dels cromosomes reorganitzats (Chandley 1984). Els estudis de segregació meiótica realitzats en cromosomes d'espermatozoide de portadors de reorganitzacions equilibrades mostren que la freqüència d'espermatozoides cromosòmicament desequilibrats és, en portadors de translocacions robertsonianes, d'aproximadament un 15% (Ogawa et al. 2000), en portadors de translocacions recíproques, entre un 19 i un 77% (Guttenbach et al. 1997), i en portadors d'inversions paracèntriques i pericèntriques entre un 0 i un 30%, depenent de la mida dels segments invertits (Martin 1999; Navarro et al. 1993).

L'any 1963, es va proposar que la presència d'una reorganització cromosòmica podia implicar alteracions en la segregació dels demés cromosomes no implicats en la reorganització (Lejeune 1963); aquest fenomen es va batejar amb el nom d'Efecte Intercromosòmic. En els darrers anys, diferents estudis realitzats mitjançant la tècnica de FISH en nuclis descondensats d'espermatozoide han anat encaminats a descobrir la presència d'aquesta particularitat en portadors de translocacions cromosòmiques (Blanco et al. 2000; Estop et al. 2000; Pellestor et al. 2001), però els resultats obtinguts fins al moment no són concluent.

### **1.6.3. Meiosi en portadors de translocacions recíproques equilibrades**

Les translocacions recíproques són el resultat d'un intercanvi de material cromosòmic entre braços de dos cromosomes distints. Els portadors de translocacions recíproques equilibrades són fenotípicament normals, i la majoria

presenten un procés espermatogènic normal. No obstant, i tal com acabem d'assenyalar en l'apartat anterior, sovint presenten alteracions a la gametogènesi que es poden traduir en expressions variables del grau d'infertilitat (des d'oligozospèrmia fins a azoospèrmia) o en aparició d'avortaments espontanis i/o descendència afectada per anomalies estructurals desequilibrades. Estudis realitzats utilitzant la tècnica de fecundació *in vitro* heteròloga hámster-humà en més de 35 portadors de translocació, mostren com entre un 19 i un 77% dels espermatozoides de pacients portadors de translocació porten una dotació cromosòmica desequilibrada (Guttenbach et al. 1997). L'aplicació de la tècnica de FISH en nuclis descondensats d'espermatozoides d'individus portadors de translocacions recíproques també permet fer anàlisis de la segregació dels cromosomes implicats en la reorganització. En la següent taula s'inclouen els resultats obtinguts en els estudis fets fins ara.

**Taula 4:** segregació cromosòmica en portador de translocacions recíproques

Translocació (referència)	Patrons de segregació (%)				
	Normal	Equilibrada	Adjacent 1	Adjacent 2	3:1
t(1;10)(p22.1;q22.3) (Van Hummelen et al. 1997)	90.5 <sup>a</sup>			4.9	3.9
t(1;11)(p36.3;q13.1) (Spriggs and Martin 1994)	82.5 <sup>a</sup>			8.3	9.2
t(2;14)(p23.1;q31) (Rousseaux et al. 1995)	88 <sup>a</sup>			5.5	6.5
t(2;18)(p21;q11.2) (Estop et al. 1998a)	45		30.8	10.9	13.2
t(3;9)(q26.2;q32) (Honda et al. 1999)	88.4 <sup>a</sup>			5.4	5.9
t(3;9)(q25;q32) (Honda et al. 1999)	89.2 <sup>a</sup>			6.0	4.5
t(3;11)(q27.3;q24.3) (Martini et al. 1998)	44.3		15.9	6.6	28.9
t(5;8)(q33;q13) (Blanco et al. 1998a)	46.5		39.5	7.2	6.8
t(6;11)(q14;p14) (Rousseaux et al. 1995)	86 <sup>a</sup>			10.5	3.5
t(6;11)(q14;p14) (Rousseaux et al. 1995)	87.4 <sup>a</sup>			9.0	3.1
t(7;8)(q11.21;cen) (Mercier et al. 1998)	30.4	26.3	25.1	11.1	7.1
t(7;9)(q33;p21) (Pellestor et al. 1997) <sup>b</sup>	86 <sup>a</sup>			10.4	3
t(7;18)(q35;q11) (Pellestor et al. 1997) <sup>b</sup>	77.2 <sup>a</sup>			15.9	6.6
t(8;9)(q24.2;q32) (Estop et al. 1998a)	45.4		41.9	3.2	9.6
t(10;12)(q26.1;p13.3) (Estop et al. 1997)	84.3 <sup>a</sup>			11	4.4
t(11;22)(q23;q11) (Estop et al. 1999)	27.4		17.6	12.5	40.1
t(11;22)(q25;q22) (Van Assche et al. 1999)	29.1		21.2	15.2	34.6
t(17;22)(q11;q22) (Geneix et al. 2002)	19		12.9	5.8	46.8

a: no es pot diferenciar la segregació alternant de l'adjacent 1

b: estudi realitzat mitjançant la tècnica de PRINS

Durant la meiosi I, els cromosomes implicats en la translocació i els seus homòlegs aconsegueixen aparellar-se gràcies a la formació d'una figura que es coneix amb el nom de quadrivalent. A partir d'aquesta estructura, la separació dels

cromosomes homòlegs pot ocórrer seguint fins a quatre patrons de segregació distints. Així, quan els cromosomes reorganitzats i els seus homòlegs normals es dirigeixen cap a pols oposats, de manera que els gàmetes resultants són normals o equilibrats, la segregació que té lloc es coneix amb el nom d'alternant. En el cas que els centròmers homòlegs s'hagin dirigit cap a pols oposats, però els gàmetes resultants presentin nul·lisomies i trisomies parcials dels cromosomes reorganitzats, la segregació rep el nom d'adjacent I. Quan els dos cromosomes homòlegs van junts al mateix pol, la segregació rep el nom d'adjacent II. En aquest tipus de segregació, les nul·lisomies i les trisomies parcials són majors que les que s'observen en l'adjacent I. Finalment, una no disjunció parcial o completa dels cromosomes que formen el quadrivalent donarà lloc a una segregació 3:1 ó 4:0.

Els percentatges de cada tipus de segregació estan estretament relacionats amb les característiques físiques del quadrivalent. Aquestes, a la vegada, vénen determinades per factors com ara els cromosomes implicats, la morfologia dels cromosomes implicats en la translocació, la longitud dels segments intersticials i translocats, la probabilitat de recombinació en aquests segments i la localització dels punts del trencament. És important remarcar que la presència d'un procés de recombinació en alguna de les regions intersticials del quadrivalent pot provocar l'aparició de gàmetes desequilibrats a partir de la segregació alternant i de gàmetes equilibrats a partir de la segregació adjacent I, tal i com es mostra a la Figura 4.

Figura 4. Esquema de la segregació en un portador d'una translocació recíproca

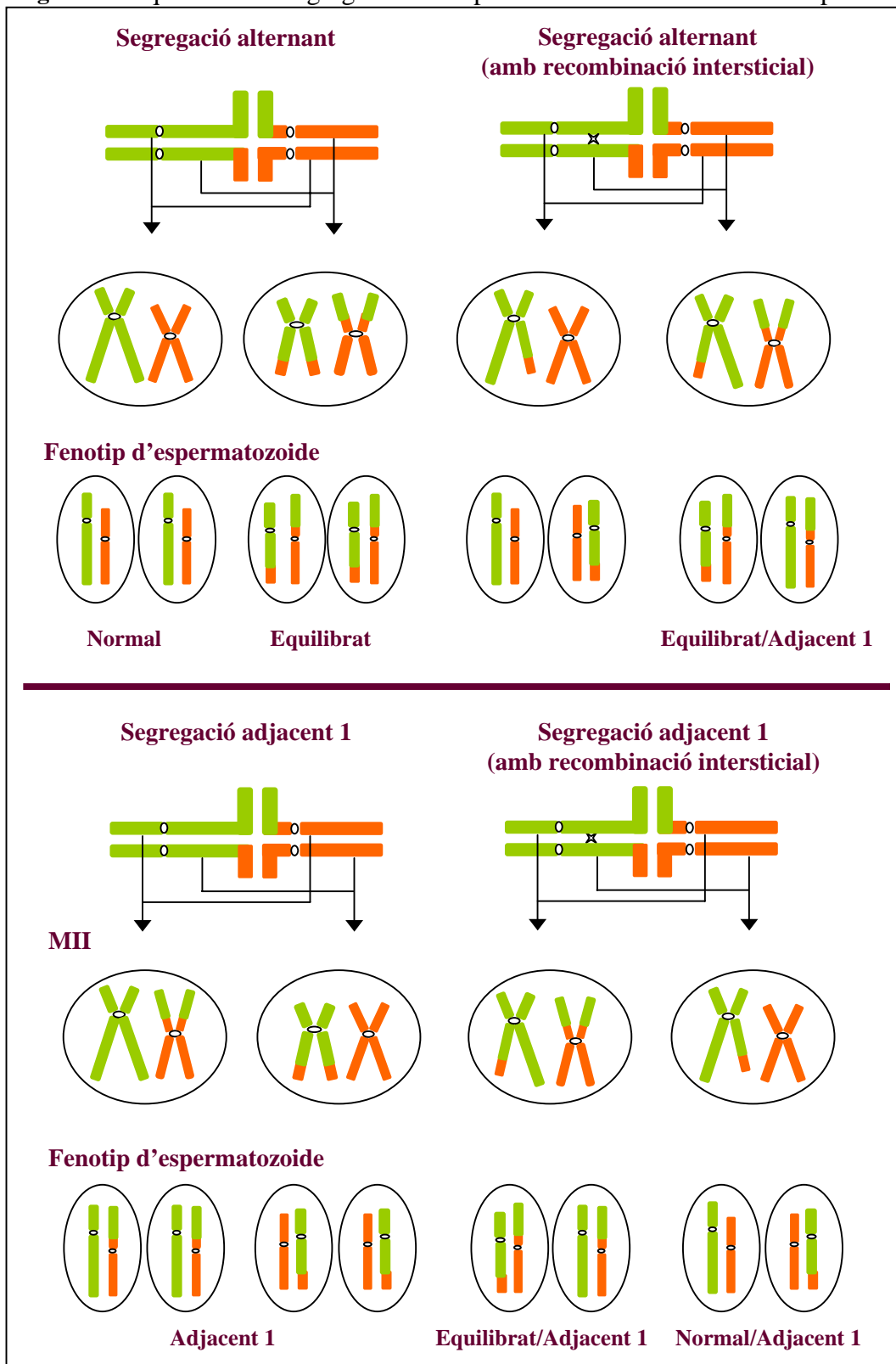
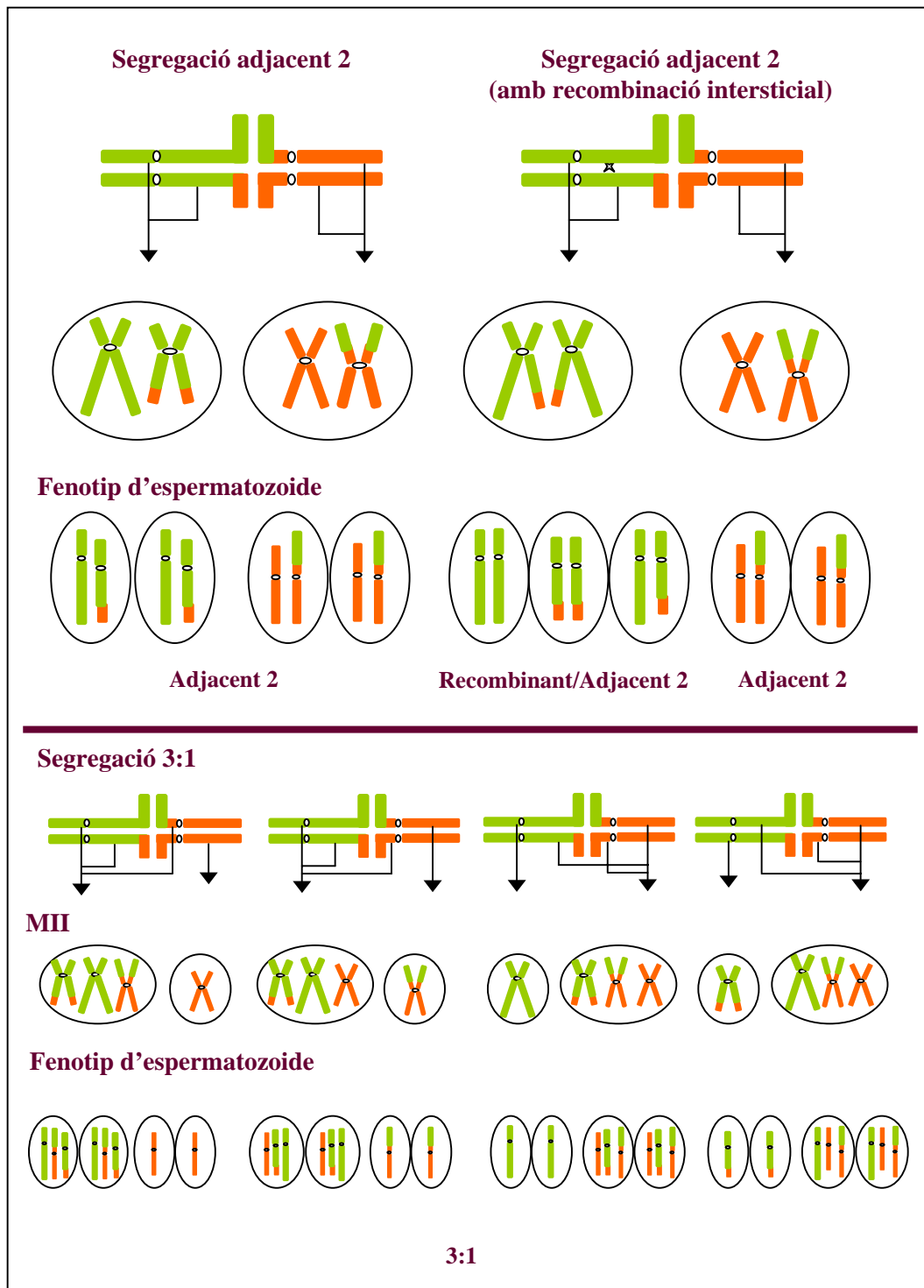


Figura 4 (continuació)









## **2. OBJECTIUS**



**Objectiu 1**

Analitzar els tipus de segregació meiótica en diferents etapes de la gametogènesi masculina en portadors de translocacions. Comparació dels resultats obtinguts.

**Objectiu 2**

Determinar les freqüències d'aneuploidies per els cromosomes X, Y, 6, 18 i 21 en nuclis descondensats d'espermatozoide, per tal de determinar l'existència de possibles efectes intercromosòmics.

**Objectiu 3**

Avaluar el risc cromosòmic en el moment de la concepció dels portadors de translocacions cromosòmiques analitzats.

**Objectiu 4**

Avaluar el patró de recombinació mitjançant l'anàlisi de quiasmes en portadors de translocacions.

**Objectiu 5**

Identificar els bivalents en extensions de CS mitjançant l'aplicació conjunta de tècniques immunocitogenètiques i tècniques de multi FISH.







### **3. MATERIALS I MÈTODES**





### **3.1. OBTENCIÓ D'EXTENSIONS DE CROMOSOMES DERIVATS D'ESPERMATOZOIDES**

#### **HUMANS: TÈCNICA DE FECUNDACIÓ *IN VITRO* HETERÒLOGA HÀMSTER-HUMÀ**

##### **3.1.1 Protocol**

El protocol seguit és una adaptació del descrit en el nostre laboratori per (Benet et al. 1991), i està esquematitzat a la Figura 5 (pàgina 33)

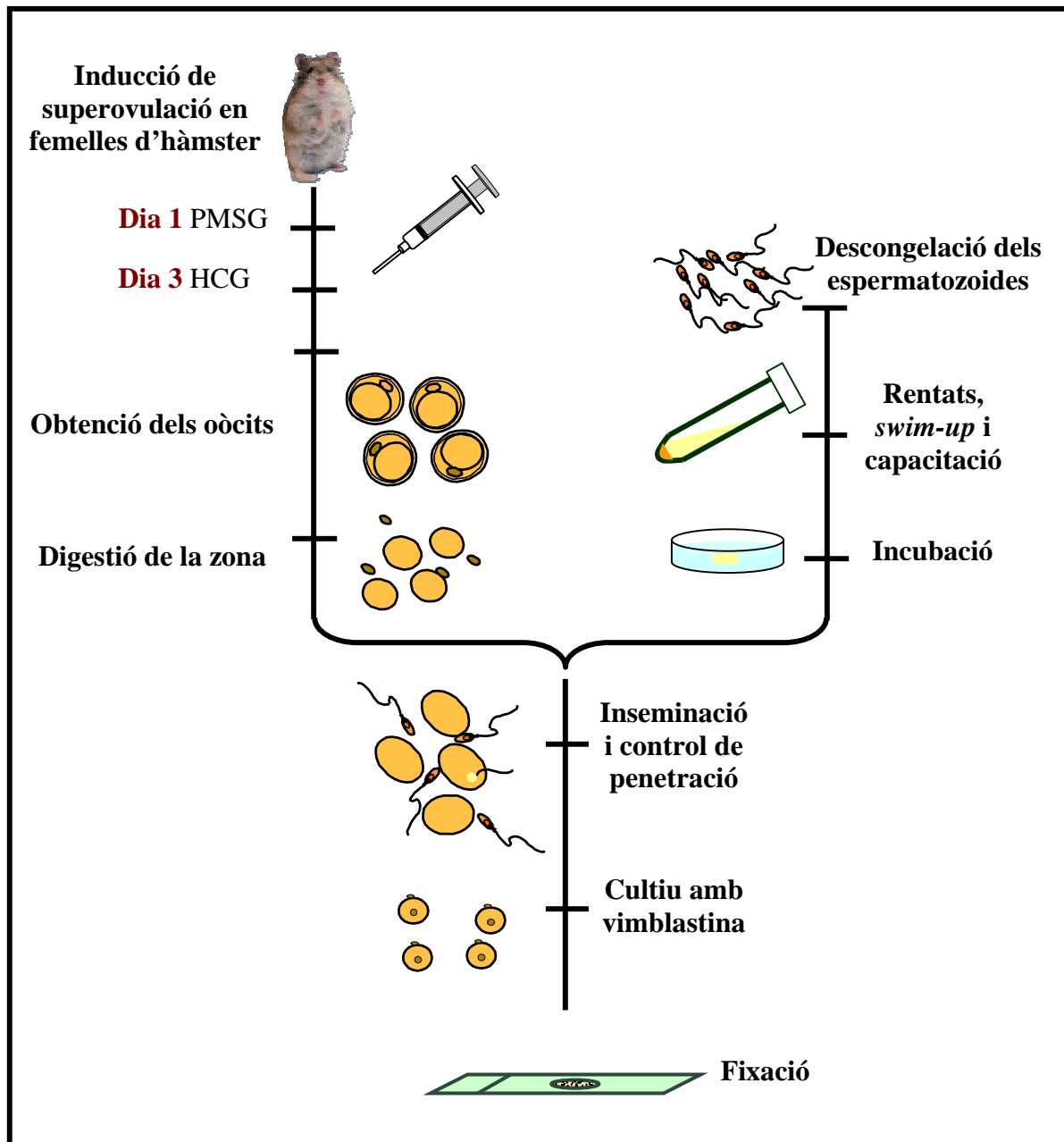
##### **3.1.2. Material Biològic**

###### *3.1.2.1. Obtenció dels oòcits*

Els oòcits s'obtenen mitjançant superovulació induïda hormonalment en femelles de l'espècie *Mesocricetus auratus* (hàmsster siri o daurat), d'aproximadament 3 mesos d'edat. El protocol que se segueix és el següent:

- Injecció intraperitoneal de 35-40 UI/animal de gonadotropina d'euga gestant (PMSG) el primer dia del cicle de les hàmssters. L'acció d'aquesta hormona provoca la maduració sincrònica d'un elevat nombre d'oòcits.
- Injecció també via intraperitoneal de 35-40 UI/animal d'hormona gonadotropina coriònica humana (hCG), entre 58 i 60 hores més tard de la injecció de PMSG. L'acció d'aquesta segona hormona aconsegueix la superovulació dels oòcits madurats.
- Sacrifici de les femelles de hàmsster (de sis a vuit femelles per experiment), entre 16 hores i mitja i 17 hores després de la segona injecció hormonal, i dissecció de l'ampul·la de l'oviducte. Per tal de recollir els oòcits, l'ampul·la se situa en medi BWW<sub>3</sub> (medi BWW suplementat amb 0.3% albúmina sèrica humana (HSA)) i es realitza una perfusió, tot aplicant una pressió hidràulica

Figura 5. Protocol d'obtenció de complements cromosòmics d'espermatozoide



en un dels dos extrems del conducte ampul·lar amb l'ajut d'una xeringa, de manera que els *cumulus oophorus* s'expulsen per l'altre extrem.

#### 3.1.2.2. *Processat dels oòcits*

Els cúmulus obtinguts es tracten amb una solució enzimàtica de 0.1% hialuronidasa en BWW<sub>3</sub>, per tal d'alliberar l'oòcit de les cèl·lules del cúmulus que l'acompanyen.

Els oòcits obtinguts es recullen i es renten dues vegades amb medi BWW<sub>3</sub> abans de tractar-los amb una solució enzimàtica de 0.1% tripsina en medi BWW<sub>3</sub>, durant dos o tres minuts, per a digerir la zona pel·lúcida de l'oòcit. Aquest punt és indispensable per tal de permetre la fecundació interespecífica d'aquests oòcits amb espermatozoides humans.

#### 3.1.2.3. *Espermatozoides*

Les mostres de semen de pacients portadors de reorganitzacions cromosòmiques foren obtingudes després de tres o quatre dies d'abstinència, recollides en flascons estèrils de polietilè i, després de permetre la seva líquefacció (aproximadament 20 minuts a temperatura ambient), congelades seguint un protocol adaptat del descrit per d'altres autors (Chernos and Martin 1989). Breument, la mostra de semen es dilueix 1:1 en crioprotector (30% de rovell d'ou, 14% glicerol, 1.98% glucosa, 1.72% citrat sòdic i 2% glicina en solució aquosa), s'homogeneïtza la barreja mitjançant una agitació suau i es reparteix en criotubs estèrils (1ml/criotub). Els criotubs es col·loquen en un contenidor de congelació (Nalgene Cryo 1°C) a -80°C un mínim de quatre hores. D'aquesta manera es permet la congelació progressiva de la mostra. Passat aquest temps, els criotubs es transfereixen al tanc de nitrogen líquid (-196°C), on resten fins a la seva utilització.

Les mostres de semen es descongelen a temperatura ambient durant uns deu minuts. A continuació, es renten dues vegades amb medi BWW<sub>3</sub> per tal d'eliminar el crioprotector i el plasma seminal. La selecció d'espermatozoides es fa mitjançant la tècnica de *swim-up* (migració vertical dels espermatozoides mòbils a partir del sediment centrifugat) (Andolz et al. 1987). Els espermatozoides seleccionats se centrifuguen i el pellet es ressuspèn en una solució 10 µM d'ionòfor de calci A23187 en BWW<sub>3</sub> i s'incuben durant deu minuts, a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> (Alvarez et al. 1996). Passat aquest temps, els espermatozoides es renten dues vegades amb medi BWW<sub>33</sub> (BWW suplementat amb 3.3% d'HSA) per tal d'eliminar l'ionòfor, i s'ajusta la concentració d'espermatozoides mòbils a la concentració desitjada. La gota amb espermatozoides es disposa en una placa de petri i es cobreix amb oli mineral. Finalment, els espermatozoides s'incuben durant dues hores a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> abans d'emprar-los en la inseminació

### 3.1.3 Inseminació, control de penetració i cultiu

Els oòcits sense zona pel·lúcida es renten en medi BWW<sub>33</sub> i es traslladen a la placa de petri que conté la mostra d'espermatozoides. Els gàmetes es co-incuben a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> per permetre la fecundació. Per tal d'evitar la polispèrmia, es realitzen controls de penetració. Aquests controls es basen en l'observació a contrast de fase (400x) del citoplasma d'uns pocs oòcits (entre cinc i deu per control). La penetració pot observar-se en forma de caps d'espermatozoides inflats amb la corresponent cua associada dins el citoplasma de l'oòcit. Quan entre el 50 i el 70% dels oòcits observats presenta un mínim de un cap descondensat, els oòcits

inseminats es renten per eliminar l'excés d'espermatozoides i es cultiven en medi F-10, a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> durant aproximadament cinc o sis hores.

#### **3.1.4. Obtenció de cromosomes derivats de pronuclis d'espermatozoides**

Després del cultiu en F-10, els oòcits fecundats es traspassen a una nova placa que conté F-10 amb 0.1 µg/ml de vimblastina (agent antimitòtic), i s'hi deixen entre onze i dotze hores.

Les extensions dels cromosomes s'aconsegueixen mitjançant un procés de fixació. Primer de tot, grups de 10 a 20 oòcits es tracten amb una solució de citrat sòdic a l'1% (hipotònic) durant cinc minuts. A continuació, aquests oòcits són recollits i dipositats en el centre d'un portaobjectes desengreixat, on són fixats amb unes gotes de solució fixadora de Carnoy (etanol:àcid acètic 3:1). Les preparacions es mantenen a -20°C fins a la seva utilització.

#### **3.1.5. Hibridació *in situ* fluorescent dels pronuclis masculins**

La tècnica utilitzada és la descrita en un treball previ (Cifuentes et al. 1998). Els portaobjectes són postfixats amb la següent seqüència de rentats:

- 1xPBS (cinc minuts a temperatura ambient)
- 50mM MgCl<sub>2</sub> en PBS (cinc minuts a temperatura ambient)
- 1% formaldehid /50mM MgCl<sub>2</sub> en PBS (deu minuts a temperatura ambient)
- 1xPBS (cinc minuts a temperatura ambient)

Després de la postfixació els portaobjectes es deshidraten en una sèrie d'alcohols (70%, 85%, 100%), dos minuts en cada un d'ells i es deixen assecar a temperatura ambient. Mentrestant es prepara la barreja de sondes més el tampó

d'hibridació, segons les proporcions indicades pel proveïdor. Les sondes utilitzades depenen de la reorganització que es vulgui estudiar, de manera que tots els cromosomes implicats puguin ésser detectats mitjançant pintat cromosòmic. A més, a la barreja també s'inclouen sondes centromèriques específiques pels cromosomes sexuals.

El DNA diana i el DNA de les sondes es desnaturalitza conjuntament de la següent manera: es col·loca la barreja de sondes sobre la regió del portaobjectes que conté les extensions cromosòmiques. S'aplica un cubreobjectes i se segella amb goma aràbiga. La desnaturalització té lloc sobre una placa de calor (Hybrite) a 70°C, durant tres minuts. Acabat el procés, comença la hibridació, la qual té lloc en cambra humida a 37°C, durant un mínim de 16 hores.

Passat aquest temps, es retira el cubreobjectes i es comencen els rentats posthibridació:

- Tres rentats de deu minuts en 50% Formamida en 2xSSC, a 45°C.
- Un rentat de deu minuts en 2xSSC, a 45°C.
- Un rentat de cinc minuts en 2xSSC/0.1% Tween20, també a 45°C.

Després de l'últim rentat, es fa una sèrie d'alcohols, es deixa assecar el portaobjectes a temperatura ambient i es contratenyeix amb una barreja de DAPI ¼ (0.032 ng/µl) en antifade (Vectashield, Vector Laboratories).

## **3.2. OBTENCIÓ D'EXTENSIONS DE NUCLIS DESCONDENSATS D'ESPERMATOZOIDES**

### **3.2.1. Fixació**

Les mostres de semen es descongelen a temperatura ambient. Una vegada descongelades es renten amb isotònic (NaCl 0.9%) per tal d'eliminar el

criopreservant i el plasma seminal. Tot seguit, se sotmeten a un tractament hipotònic (KCl 0.075%) seguit d'una centrifugació a 600g., durant cinc minuts. El pel·let obtingut es fixa amb Carnoy, es dilueix fins a la concentració desitjada i, finalment, es llença una gota de la suspensió cel·lular aconseguida sobre un portaobjectes desengreixat amb metanol. Les preparacions es mantenen a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins a la seva utilització.

### **3.2.2. Hibridació *in situ* fluorescent en nuclis d'espermatozoide**

#### *3.2.2.1. Descondensació*

Els portaobjectes amb nuclis d'espermatozoide se sotmeten a un tractament de descondensació de la cromatina, per tal de facilitar l'accés de les sondes al DNA diana. Després de descongelar-los, els portaobjectes s'introdueixen dins una cubeta amb 2xSSC, tres minuts, es deshidraten en una sèrie d'alcohols (70%, 85%, 100%), dos minuts en cada un d'ells i es deixen assecar a temperatura ambient. Una vegada secs, comença el tractament de descondensació. Així, els portaobjectes s'incuben a  $37^{\circ}\text{C}$  en una solució de ditiotreitòl (DTT) 5mM amb tampó Tris i sabó Triton X-100, durant un temps que pot variar entre 12 i 20 minuts, depenent de les característiques de la mostra. Passat aquest temps, es renten els portaobjectes amb 2xSSC, es deshidraten i es deixen assecar a temperatura ambient. El grau de descondensació es controla sota microscòpia de contrast de fase.

#### *3.2.2.2. Hibridació *in situ**

Assolit el grau de condensació desitjat, la mostra es desnatura en 70% formamida en 2xSSC a  $72^{\circ}\text{C}$ , durant tres minuts. Posteriorment, es deshidrata la mostra en una sèrie d'alcohols i es deixa assecar a temperatura ambient. Mentrestant,

es desnaturalitza la barreja de sondes dels cromosomes que es vulguin detectar a 75°C durant cinc minuts. S'aplica aquesta barreja sobre el portaobjectes, es cobreix amb un cubreobjectes, se segella amb goma aràbiga i es deixa hibridant la mostra en una cambra humida a 37° C durant un mínim de 18 hores. Passat aquest temps, es retira el cubreobjectes i es comencen els rentats posthibridació:

- Un rentat de dos minuts en 0.4xSSC, a 75° C.
- Un rentat d'un minut en 4xSSC / 0.005% Tween20 (4xSSCT) a temperatura ambient.

Després de l'últim rentat, es fa una sèrie d'alcohols, es deixa assecar el portaobjectes a temperatura ambient i es contratenyeix amb una dilució de DAPI ¼ (0.032 ng/µl) en *antifade* (Vectashield).

### **3.3. OBTENCIÓ D'EXTENSIONS DE CROMOSOMES MEIÒTICS I COMPLEXES**

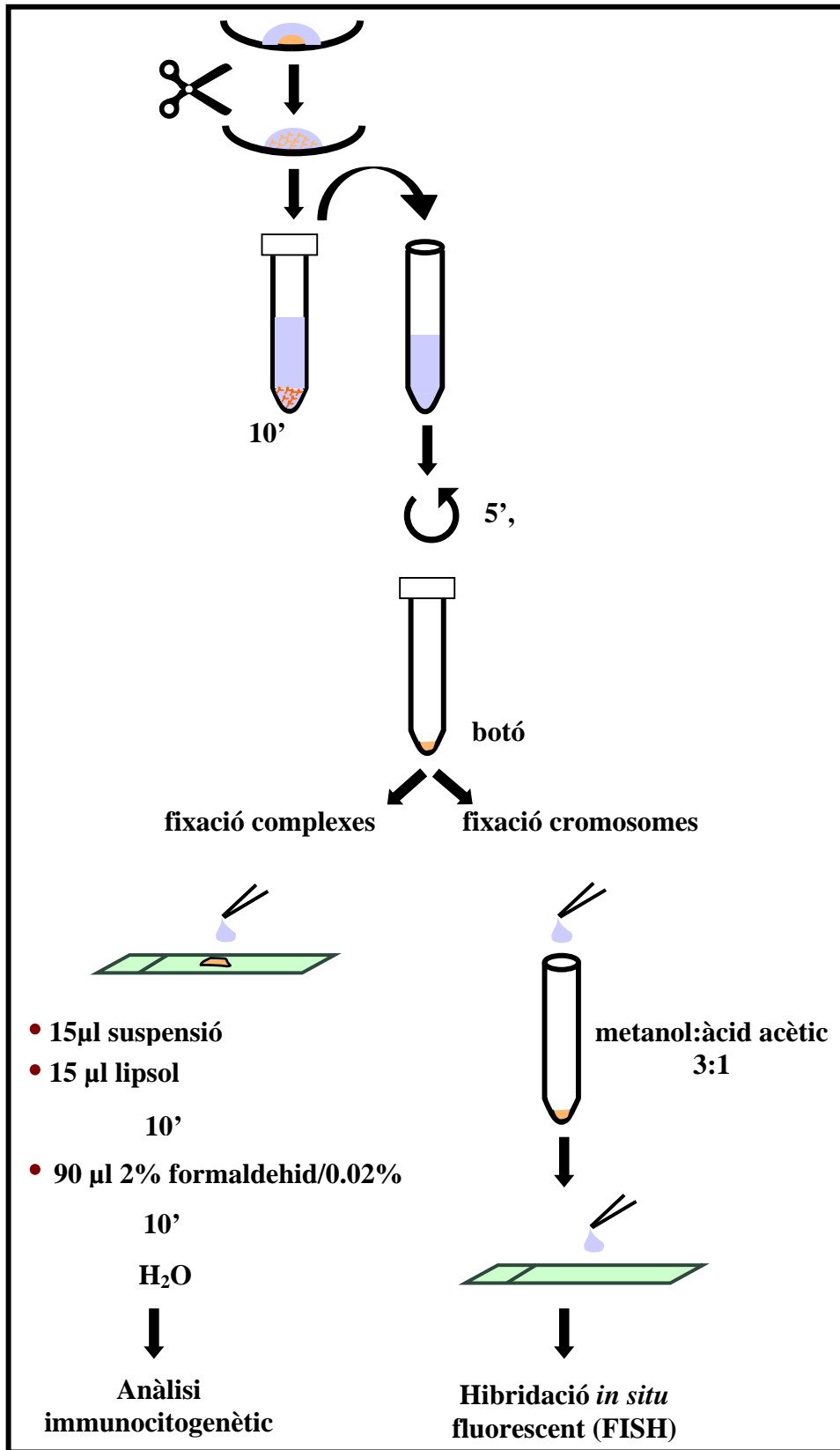
#### **SINAPTONEMALS**

##### **3.3.1. Biòpsia testicular**

Les biòpsies testiculars de pacients portadors de reorganitzacions cromosòmiques es varen obtenir per escissió, sota anestèsia local. De cada biòpsia se'n feren dues parts, una per ser processada per obtenir cromosomes meiòtics, l'altra per aconseguir extensions de complexos sinaptonemals (CS), i es recolliren en tubs de centrífuga amb 5 ml. de medi hipotònic (citrats sòdic a l'1%, cromosomes meiòtics) o isotònic (NaCl 0.9%, CS) (Figura 6).



Figura 6. Obtenció de cromosomes meiòtics i complexos sinaptonemals



### 3.3.2. Cromosomes meiòtics

Els fragments destinats a l'obtenció de cromosomes meiòtics es col·loquen en un vidre de rellotge amb un volum mínim de medi hipotònic (citrat sòdic 1%) i es trossegueu els túbuls seminífers amb unes tisores de dissecció per tal d'alliberar el màxim nombre de cèl·lules. La suspensió cel·lular obtinguda es recull amb una pipeta pasteur i es trasllada a un tub de centrifuga de 10 ml. S'afegeixen 7 ml. de medi hipotònic, i es deixa reposar la suspensió durant uns deu minuts, per tal que les restes de túbuls seminífers sedimentin. Passat aquest temps, es recull el sobrenedant i es traspassa a un nou tub de centrifuga. Se centrifuga durant 5 min. a 600g., es descarta el sobrenedant i el botó cel·lular aconseguit es ressuspèn entre 3 i 5 ml. de medi hipotònic, afegit gota a gota. Es repeteix aquest procés dos cops més per tal de rentar la mostra. La fixació de les cèl·lules es fa emprant fixador Carnoy. Les extensions es realitzen llençant una gota sobre un portaobjectes desengreixat amb metanol 100%.

Posteriorment a la fixació, els portaobjectes es rastregen amb microscòpia de contrast de fase per tal de capturar les extensions obtingudes (x400) i classificar-les segons l'estadi cel·lular. Més tard, i abans de la hibridació, les extensions es tenyeixen amb 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) i es capturen amb microscòpia fluorescent (x1000). Aquestes imatges són útils perquè ens permeten observar la morfologia dels cromosomes abans que el procés de la hibridació l'alteri.

#### 3.3.2.1. Hibridació *in situ* sobre cromosomes meiòtics

Se segueix el protocol descrit anteriorment (hibridació *in situ* sobre cromosomes d'espermatzoide).

### 3.3.3. Complexes sinaptonemals

La biòpsia es col·loca també en un vidre de rellotge, però en aquest cas es trosseja en un volum mínim de medi isotònic (NaCl 0.9%). Per obtenir la suspensió cel·lular es processa la mostra de la manera explicada en l'apartat anterior, però emprant medi isotònic enlloc de medi hipotònic.

Una vegada obtinguda la suspensió cel·lular, es procedeix a la fixació. En aquest cas, s'utilitza una solució de formaldehid al 2% amb 0.02% de *sodium dodecil sulfat* (SDS). El pH del fixador s'ajusta amb borat sòdic 1M a 8.4. El protocol seguit és el descrit per d'altres autors (Barlow and Hultén 1996), amb petites modificacions. Es col·loquen 15 µl de suspensió sobre un portaobjectes desengreixat amb metanol. S'afegeixen 15 µl de solució Photoflo 0.003%, i es deixa en aquestes condicions durant deu minuts. Passat aquest temps, s'afegeixen 90-100 µl de fixador. Passats deu minuts més, es renta el portaobjectes amb aigua destil·lada i es deixa assecar a temperatura ambient. Les cèl·lules profàsiques en paquitè es poden observar a microscòpia de contrast de fase. Els portaobjectes es conserven a -20°C fins a la seva utilització.

#### 3.3.3.1. Immunocitogenètica

Els portaobjectes es bloquegen durant 30 minuts aplicant 200 µl d'una solució 0.05% de llet en pols en 4xSSCT. Es prepara la dilució desitjada dels anticossos primaris, necessaris per detectar els complexos sinaptonemals i les proteïnes implicades en processos de recombinació, en solució bloqueig:

*Rabbit anti-rat SCP3*, 1:1000

*Human anti-CREST*, 1:1000

*Mouse anti- MLH1*, 1:250

S'apliquen entre 80 i 100 µl d'aquesta dilució a cada portaobjectes. Aquests es deixen incubar en cambra humida a 37° C un mínim de cinc hores. A continuació es realitzen tres rentats de cinc minuts en 4xSSCT a temperatura ambient. Es prepara la dilució en solució bloqueig de dos dels anticossos secundaris:

*goat anti-rabbit* conjugat amb TRITC (Sigma) 1:250

*goat anti-mouse* conjugat amb FITC 1:250

Sense deixar assecar el portaobjectes, s'aplica la barreja i es deixa incubant en cambra humida a 37° C un mínim de dues hores. Passat aquest temps, es tornen a fer tres rentats en 4xSSCT, i s'incuba de nou la mostra en cambra humida a 37° C durant un mínim d'una hora, ara però amb l'anticòs secundari *rabbit anti-human* conjugat amb Pacific Blue (Zenon Complex, Molecular Probes).

El procés acaba amb tres rentats en 4xSSCT de cinc minuts a temperatura ambient, seguit d'un breu rentat en aigua destil·lada. Es deixa assecar el portaobjectes a temperatura ambient i es contratenyeix amb una barreja de DAPI ¼ (0.032 ng/µl) en antifade (Vectashield, Vector Laboratories).

### **3.3.4. Hibridació *in situ* sobre extensions de complexos sinaptonemals**

#### **3.3.4.1. *CenM-FISH***

La tècnica del cenM-FISH es basa en els principis del MFISH (Multicolor FISH) que permet l'estudi simultani dels 22 parells de cromosomes autosòmics i del parell sexual presents en l'espècie humana, gràcies a que cada parell de cromosomes és pintat amb una combinació d'entre un i cinc colors, única i pròpia, que permet diferenciar-lo dels demés parells.

La particularitat del 24-cenM-FISH es troba en el fet que únicament són pintats els centròmers dels cromosomes, enlloc dels cromosomes sencers. D'aquesta manera, els cromosomes són identificats gràcies a la combinació de colors del centròmer (a l'apèndix 1 es pot veure la combinació de colors que hem aplicat en el nostre treball). Per tal d'obtenir cada un dels centròmers, primer de tot cal separar la seqüència centromèrica del plàsmid que la conté i posteriorment amplificar-les per separat mitjançant processos de DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide-Primed Polymerase Chain Reaction), segons protocol previament descrit (Senger et al. 1998).

Posteriorment es fa la barreja del DNA centromèric d'aquells cromosomes que comparteixen un color i es realitza el marcatge amb el fluorocrom adequat, també mitjançant una PCR. En el nostre cas els fluorocroms emprats foren: *spectrum orange* (SO), *spectrum green* (SG), *spectrum red* (SR), Cy5 (BIO) i *dietilaquamarine* (DAC).

A continuació, es barregen tots els fragments marcats, s'aliquoten en volums iguals i es provoca la precipitació del DNA afegint 25 µg de t-RNA i 2 µg de COT1-DNA. La presència de COT1-DNA és necessària per tal d'evitar fenòmens d'hibridació creuada entre diferents centròmers. El producte de la precipitació es deixa assecat i es manté a -20°C fins al moment de la seva utilització. En la Figura 7 es pot veure un exemple de protocol de marcatge

#### 3.3.4.2. Hibridació in situ

Els portaobjectes previament analitzats amb immunocitogenètica es renten breument en 4xSSCT, es postfixen i es desnaturalitzen en 70% formamida en 2xSSC

a 70° C, durant dos minuts. Després de la deshidratació, la mostra es deixa assecar a temperatura ambient.

La sonda de DNA es resuspén en 10 µl de tampó d'hibridació (20% dextran sulfat en 50% formamida/2xSSC). A continuació es desnaturalitza a 75° C, durant cinc minuts, i va seguida per un període de prehibridació de deu minuts a 37° C. L'hibridació es fa en cambra humida, a 37° C, durant un mínim de 18 hores.

Després dels rentats posthibridació, un rentat de dos minuts en 0.4xSSC, a 70°C, seguit d'un rentat d'un minut en 4xSSC/0.005%Tween20 (4xSSCT) a temperatura ambient, els portaobjectes s'incuben en cambra humida a 37° C amb una dilució 1:80 d'estreptavidina anti-biotina conjugada amb Cy5 en solució bloqueig, durant un temps no inferior als 40 minuts. Aquest pas és necessari per poder visualitzar aquells centròmers marcats amb biotina. Finalment, es renten els portaobjectes en 4xSSCT durant deu minuts a temperatura ambient, es fa un breu rentat en aigua destil·lada, es deixa assecar el portaobjectes a temperatura ambient i es contratenyeix amb una dilució de DAPI ¼ (0.032 ng/µl) en *antifade* (Vectashield).

**Figura 7.** Exemple de les barreges de marcatge

<b>MIX SO (1/2 x)</b>		
12,88µl	6,44	µl H <sub>2</sub> O
2µl	1	µl 10x tampó hibridació
1,6µl	0,8	µl dNTPs (Reamp-Mix)
0,4µl	0,2	µl SO-dUTP
1µl	0,5	µl DOP- Primer
2µl	1	µl MgCl <sub>2</sub>
0,12µl	0,06	µl AmpliTaq
	10,00	µl
<b>MIX SR (1x)</b>		
12,88µl	12,88	µl H <sub>2</sub> O
2µl	2	µl 10x tampó hibridació
1,6µl	1,6	µl dNTPs (Reamp-Mix)
0,4µl	0,4	µl SR dUTP
1µl	1	µl DOP- Primer
2µl	2	µl MgCl <sub>2</sub>
0,12µl	0,12	µl AmpliTaq
	20,00	µl
<b>MIX SG (1/2 x)</b>		
10,88µl	5,44	µl H <sub>2</sub> O
2µl	1	µl 10x tampó hibridació
2µl	1	µl dNTPs (Label-Mix)
2µl	1	µl SG-dUTP
1µl	0,5	µl DOP- Primer
2µl	1	µl MgCl <sub>2</sub>
0,12µl	0,06	µl AmpliTaq
	10,00	µl
<b>MIX DAC (1/2 x)</b>		
12,72µl	6,24	µl H <sub>2</sub> O
2µl	1	µl 10x tampó hibridació
2µl	1	µl DEAC MIX
0,4µl	0,2	µl DEAC-dUTP
1µl	0,5	µl DOP- Primer
2µl	1	µl MgCl <sub>2</sub>
0,12µl	0,06	µl AmpliTaq
	10,00	µl
<b>MIX BIO (1x)</b>		
12,08µl	12,08	µl H <sub>2</sub> O
2µl	2	µl 10x tampó hibridació
2µl	2	µl dNTPs (Label-Mix)
0,8µl	0,8	µl BIO-dUTP
1µl	1	µl DOP- Primer
2µl	2	µl MgCl <sub>2</sub>
0,12µl	0,12	µl AmpliTaq
	20,00	µl

### **3.4. OBTENCIÓ DE DADES I TRACTAMENT D'IMATGES**

L'obtenció de dades i d'imatges s'ha realitzat emprant dos sistemes de captura:

Microscopi epifluorescent Olympus A70 (Olympus Optical Co., Hamburg, Alemanània), equipat amb un joc de filtres específics per a DAPI, FITC, TRITC i Aqua, a més d'un filtre de triple banda (FITC/PI/DAPI), acoplat a un sistema de captura Cytovision (Applied Imaging, Sunderland, Gran Bretanya).

Microscopi epifluorescent Olympus A60 (Olympus Optical Co., Hamburg, Alemanània), equipat amb un joc de filtres específics per a Aqua, FarRed, Gold, FITC, TRITC, DAPI, a més d'un filtre de triple banda (FITC/PI/DAPI), acoplat a un sistema de captura Smartcapture de Vysis (Digital Scientific; Cambridge, UK).

#### **3.4.1 Anàlisi estadístic de les dades**

La determinació de la significància de l'incidència d'aneuploidia per cromosoma en els individus analitzats es va fer mitjançant el test de Chi-quadrat. Per a les comparacions de les freqüències de quiasmes, el test utilitzat fou la t d'Student.







## **4. RESULTATS**



**4.1. ARTICLE 1**

**Títol:** Meiotic segregation analysis in a t(4;8) carrier: comparison of FISH methods on sperm chromosome metaphases and interphase sperm nuclei

**Autors:** Maria Oliver-Bonet, Joaquina Navarro, Montserrat Codina-Pascual, Marta Carrera, Josep Egozcue and Jordi Benet

**Publicació:** European Journal of Human Genetics, 2001, 9, 395-403

**Index d'impacte:** 3.173































**4.2. ARTICLE 2**

**Títol:** Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk

**Autors:** Maria Oliver-Bonet, Joaquina Navarro, Marta Carrera, Josep Egozcue and Jordi Benet

**Publicació:** Molecular HumanReproduction, 2002, 8, 958-963

**Index d'impacte:** 2.751





















### **4.3. ARTICLE 3**

**Títol:** Meiotic studies by multi-FISH in sperm and spermatocytes of two human translocation carriers

**Autors:** Maria Oliver-Bonet, Joaquina Navarro, Montserrat Codina-Pascual, Carlos Abad, Miriam Guitart, Josep Egozcue and Jordi Benet

**Publicació:** enviat per a publicació



# **Meiotic studies by multi-FISH in sperm and spermatocytes of two human translocation carriers**

Maria Oliver-Bonet<sup>1</sup>, Joaquina Navarro<sup>1</sup>, Montserrat Codina-Pascual<sup>1</sup>, Carlo Abad<sup>2</sup>,  
Miriam Guitart<sup>2</sup>, Josep Egozcue<sup>1</sup> and Jordi Benet<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Consorci Hospitalari Parc Taulí. 08208, Sabadell, Spain

<sup>3</sup>To whom correspondence should be addressed





## **Abstract**

The aim of this work was the study of the mechanisms which affect meiotic segregation in human male translocations carriers. To this purpose, meiotic studies using multicolour fluorescent *in situ* hybridization on both spermatocytes and sperm nuclei were performed in two different translocation carriers, t(11;17)(q13.1;p11.2) (subject 1, S1) and t(10;14)(q24;q32) (subject 2, S2). Ring configuration was the main quadrivalent form found in MI, 91.8% in S1 and 96.08% in S2. Overall chiasma frequency was found to be significantly decreased in S1. In S2, chiasma frequency within the interstitial region of chromosomes 10 and 14 was increased and the recombination pattern was modified. As was expected from the different frequencies of the interstitial chiasmata found in MI in the two subjects, the incidence of asymmetric dyads was specially high in S2 and sporadic in S1. In both carriers, segregation frequencies observed at MII were not different from the segregation data obtained in descondensed sperm nuclei. The concordance observed among results obtained in different spermatogenic stages indicates an absence of cellular selection based on chromosomal unbalances. Results obtained in the aneuploidy assay performed on sperm nuclei have not reported any evidence for an interchromosomal effect.

## **Introduction**

Meiosis is the process by which haploid gametes are produced. It includes two successive cell divisions, after just one round of DNA replication. The pairing of homologous chromosomes and the exchange of genetic information between them (recombination) take place during the first meiotic division. In anaphase I, homologous chromosomes segregate to opposite poles, and two haploid cells are formed. During the second meiotic division, sister chromatids of each homologue separate to produce haploid cells, which after a differentiation process will form oocytes in females and spermatozoa in males.

Synapsis and meiotic recombination play a critical role in meiosis. When the SC disappears during diplotene, homologous chromosomes are held together by crossover events. If recombination fails, homologous segregation is disturbed, and the bivalents become univalents (Egozcue et al. 2000). The behaviour of the univalents is not predictable, and the risk of generating chromosomal abnormalities due to non-disjunction, loss or misdivision during meiosis I is increased (Hassold and Hunt 2001). Some of these abnormalities will not affect the viability of the meiotic cell, and the meiotic process will be completed; then, a chromosomally abnormal gamete will be formed. This can lead to clinical consequences. In fact, nearly half of all spontaneous abortions are chromosomally abnormal (Hassold et al. 1996). Structural chromosomal rearrangements are present in 2% of spontaneous abortions (Jacobs 1990). Most structural abnormalities (80%) are inherited from one of the parents (Jacobs 1992), who carries a balanced form of a chromosomal rearrangement, without gain or loss of genetic material. The presence of a reorganisation may alter the normal progress of meiosis in two different ways. The

first one is related to the reorganisation itself. In the case of a reciprocal translocation, the chromosomes involved form a quadrivalent during the synapsis process. The behaviour of this particular structure during meiotic segregation is unique for each translocation carrier (Cifuentes et al. 1999), and determines the proportion of balanced and unbalanced gametes for the carrier tested. It depends upon several factors, such as the size of the interstitial and translocated segments, the morphological characteristics of the rearranged chromosomes and the distribution pattern of chiasmata during MI, and affects the final frequencies of normal and aberrant gametes. The proportion between balanced and unbalanced phenotypes differs greatly from one carrier to another (Guttenbach et al. 1997; Shi and Martin 2001). Information about the presence of chiasmata and, in particular, interstitial chiasmata in the quadrivalent can help to elucidate the segregational mechanisms which lead to the production of different proportions of balanced and unbalanced gametes (Armstrong and Hultén 1998).

The second way through which a reorganisation may alter meiosis is a phenomenon known as interchromosomal effect (ICE) (Lejeune 1963). In this case, the presence of a structural abnormality may disturb the meiotic segregation of other chromosome pairs not related to the rearrangement, thus producing aneuploid sperm. Then, ICE can be evaluated through an increase of the aneuploidy frequencies of other chromosomes, which are different from the reorganised chromosomes (Estop et al. 2000).

To understand the mechanisms which affect meiotic segregation patterns in human male carriers of reciprocal translocation, the direct analysis of testicular biopsies is necessary. In this work, fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) has been used on

meiotic spreads of two translocation carriers, t(11;17)(q13.1;p11.2) and t(10;14)(q24;q32). This method has allowed for the identification of the MI quadrivalent, the determination of chiasma frequency generally and within the quadrivalent, and the detection of balanced and unbalanced segregating products at MII. Finally, by using FISH on decondensed sperm nuclei, the proportion of each different sperm phenotype has been determined in order to compare it with the segregation pattern obtained by the analysis of MII, and , finally, the presence of possible ICE for X, Y, 6, 18 and 21 chromosomes was also tested.

## **Materials and Methods**

### **Donors**

The first patient (Subject 1, S1) had a 46,XY,t(11;17)(q13.1;p11.2) karyotype. He was ascertained because of repeated reproductive failures. The second patient (Subject 2, S2) carries a t(10;14)(q24;q32) translocation. He was also ascertained because of repeated reproductive failures that ended in miscarriage. According to WHO parameters, both carriers had normal spermograms (World Health Organization 1999). Idiograms of both reorganisations are shown in Figure 1.

Each patient provided one semen sample prior to surgery. Fresh ejaculates were allowed to liquefy and then aliquoted and cryopreserved. This study was approved by the institutional Ethics Committee, and the patients gave written informed consent.

### **Meiotic slide preparation**

Testicular biopsies were obtained by open incision under general anaesthesia. The testicular tissue was macerated in a hypotonic solution (sodium citrate 1%) until the attainment of cell suspension, and then placed in a centrifuge tube in order to separate testicular cells from seminiferous tubule remains. The supernatant was recovered and placed in another tube, centrifuged for 5 min at 600g, and finally resuspended in a few drops of sodium citrate 1%.

Fixation and spreading of the cells was performed using the method described by (Evans et al. 1964). Each slide was screened by phase contrast microscopy, and phase images of each chromosome extension at 40x magnifications were captured and stored using a Cytovision imaging system (Applied Imaging; Sunderland, UK). Slides were then counterstained with DAPI, and images of the previously captured extensions were obtained at 100x and stored using the same system.

Meiotic chromosome extensions were hybridised with probe mixtures containing whole chromosome painting for the translocated chromosomes and centromeric probes for sex chromosomes. Hybridisations were carried out according to the procedure described by our team (Oliver-Bonet et al. 2001) with some modifications: prior to postfixation, DAPI was removed from the slides using 4xSSC/0.05% Tween 20 solution (5 min), followed by an ethanol series (70%, 85%, 100%). Five µl of probe mix were added to each slide and co-denaturation was performed on a hotplate heated to 68°C for 2 minutes. Co-incubation was performed overnight at 37°C in a humidified chamber. Then, slides were washed in 0.4xSSC at 70°C for 2 min, followed by 2min in 4xSSC/0.05% Tween20. Finally, slides were counterstained with antifade (Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, USA) containing DAPI at a concentration of 0.032 ng/ml (Sigma; Madrid, Spain).

### **Sperm nuclei extension**

To obtain sperm nuclei, an aliquot of frozen spermatozoa was thawed and washed in NaCl 0.9% to eliminate cryoprotectant. The sample was fixed and decondensed following a protocol described elsewhere (Vidal et al. 1993). Segregation analysis in decondensed sperm heads was achieved using a combination of specific probes for the centromeric and telomeric regions of the chromosomes implied in the reorganisation. Aneuploidy studies using two- and three- colour FISH were performed in order to detect any possible interchromosomal effect. Denaturation and hybridisation were performed following a procedure described elsewhere (Oliver-Bonet et al. 2001), Slides were incubated overnight at 37°C, and then were washed following the manufacturer's instructions, dehydrated and counterstained with

antifade (Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, USA) containing DAPI at a concentration of 0.032 ng/ml (Sigma; Madrid, Spain).

### **Image capture and analysis**

Visualisation of FISH signals was made using an Olympus Ax 70 photomicroscope (Olympus Optical Co.; Hamburg, Germany) equipped with four simple filters for visualising DAPI, FITC, Aqua and Cy3 fluorescence, and a fifth triple filter for DAPI/FITC/PI. The capture and analysis of FISH images were performed using the Cytovision FISH imaging system (Applied Imaging; Sunderland, UK).

## Results

### Chiasma analysis on MI

Regarding S1, all detected configurations involving translocated chromosomes in the MI stage were in a paired quadrivalent form. The majority of them, 91.8%, were arranged in a ring configuration. The rest, 8.2%, were found in a chain configuration, with only three chiasmata and a lack of chiasma formation in 11q (3.3%) or 17p (4.9%). The number of chiasmata found within quadrivalents with a ring configuration ranged from 4 to 6, with at least one chiasma per chromosome arm of each translocated chromosome. Nearly half (44.3%) of the ring quadrivalents contained 4 chiasmata (Figure 2). Configurations with 5 chiasmata were found in 42.6% of the quadrivalents, with the fifth chiasma located in either 11q (26.2%), 17q (9.8%), 11p (3.3%) or in the interstitial region of 17p (1.6%). Quadrivalents with 6 chiasmata represented 4.9% of the total number, and the fifth and sixth chiasmata were situated one in 11q and the other in 17q. These results are summarized in Table 1.

In S2, ring configurations with 4, 5 or 6 chiasmata were found in 96.08% of the quadrivalents. Chain configuration was observed in 3.92% of the spreads. One single interstitial chiasma in chromosome 10 was present in 78.43% of the spreads. Interstitial chiasmata in chromosome 14 ranged from between 0 and 2, and frequencies of quadrivalents with one and two interstitial chiasmata in this chromosome were 70.59% and 23.53%, respectively (Table 2) (Figure 3).

The mean chiasma frequencies were calculated for each arm of the translocated chromosomes, as well as for the interstitial segments, in both translocation carriers (Table 3). Then, these results were compared to data obtained from male subjects



with a normal karyotype (Laurie and Hultén 1985). We have observed a significant increase in chiasma frequencies in 10q ( $p=0.003$ ) and 14q ( $p=0.004$ ) arms.

Chiasmata were also counted for whole bivalents. The mean chiasma frequency recorded per cell in S1 was  $48.94\% \pm 5.05$  (SD), with a range of 40 to 64. This incidence represents a significant decrease compared to control values ( $p=0.001$ ) (Table 3). Although the mean chiasma frequency detected in S2 ( $50.33\% \pm 4.72$  (SD)) was also lower than the observed control measures, the difference was not significant.

The incidence of sex univalents was 13.1% in S1 and 28.8% in S2.

### **Segregation analysis on MII**

A total of 144 MII spreads from the t(11;17) carrier, and 36 MII spreads from the t(10;14) carrier has been analysed. The presence of asymmetric dyads, i.e., chromosomes with both normal and derivative sister chromatids, has been quantified. The number of asymmetric dyads expected to be found in MII can be calculated from the frequency of interstitial chiasmata in MI, and then compared with the frequency observed in MII. In case of double interstitial chiasmata, half of them would result in no net exchange of the translocated segment. We did not find significant differences between the expected and the observed frequencies of asymmetric dyads in the two translocation carriers (Table 4). In S2, the frequencies detected in MII of dimorphic chromosomes were 72.22% and 75.00% for chromosomes 10 and 14, respectively, and in S1, frequencies were 0.7% and 1.4% for chromosomes 11 and 17, respectively. Segregation modes were determined in both subjects. There was no evidence for a 4:0 segregation. Regarding S1, alternate, adjacent 1, adjacent 2 and 3:1 segregation represented 47.2%, 23.6%, 24.3% and 2.8% of the analysed MII,

respectively. A small proportion of MII (2.1%) presented asymmetric dyads, thus precluding the determination of the segregation mode (alternate or adjacent 1). In S2, the proportion of spreads with asymmetric dyads was 88.89%, from which 13.89% could be assigned to adjacent 2 segregation (global frequency 16.67%) and 2.78% to 3:1 segregation. The rest, 72.22%, could have been formed from either alternate or adjacent 1 segregations. An additional 8.33% of the cells were products of alternate segregation. These results are summarised in Table 5.

### **FISH on decondensed sperm nuclei**

In the segregation analysis, a total of 5371 spermatozoa from S1 and 3111 spermatozoa from S2 has been analysed by triple-colour FISH with the DNA probes for CEP 11, tel 11q and tel 17p and CEP 10, tel 10q and tel 14 q, respectively (Table 5). For Subject 1 and 2, the total number of balanced spermatozoa with a normal or balanced phenotype was found to be 40.8% and 44.6%, respectively. Adjacent 1 phenotypes were present in 28.6% of the analysed sperm nuclei of S1. The frequency of this segregation mode was 38.6% in S2. In both carriers, the observed proportions of the two reciprocal types of adjacent 1 products were significantly different. In S1, products containing the long translocated segment were found more frequently ( $p=0.0031$ ), whereas in S2, products containing the short translocated segment had an increased incidence ( $p<0.0221$ ).

All adjacent 2 phenotypes were observed in the two patients, including those resulting from recombination events within interstitial segments. As expected from the interstitial chiasma frequency data obtained in the MI analysis, the proportion of adjacent 2 recombinant phenotypes was higher in S2. Frequencies observed for the global amount of adjacent 2 phenotypes were 25.8% for S1 and 11.8% for S2.

Finally, the eight different 3:1 phenotypes were detected in the two patients. Monosomic nuclei frequency was 4.37% in S1 and 4.05% in S2, which represents a significant increase compared with trisomic nuclei frequency (2.98% in S1, 0.93% in S2).

In the aneuploidy assay, 10137 spermatozoa from S1 and 10125 spermatozoa from S2 have been analysed for chromosomes 6 and 21, and 10141 spermatozoa from S1 and 10044 from S2, for chromosomes X,Y and 18. A total of 20107 and 20560 spermatozoa from controls has been recorded for chromosomes 6 and 21 and for chromosomes X, Y and 18, respectively. Results have been compared with control frequencies, and no significant variations have been found. These results are summarised in Table 6.

## **Discussion**

### **Chiasma analysis**

Closed rings have been the majority quadrivalent form found in the meiotic analysis in MI of the two translocation carriers. No univalents, bivalents or trivalents of the translocated chromosomes have been detected. This is consistent with the observed behaviour of other reciprocal translocations (Armstrong et al. 2000; Goldman and Hultén 1993a; Templado et al. 1990). It has been suggested that a short translocated segment could lead to the formation of open chain configurations, due to a failure either in the pairing process or in the chiasma formation in this region. However, this is not the case for the t(10;14), where the small size of the chromosome 14 translocated segment has not been a limiting factor in the retaining of ring morphology during MI. Other authors have reported similar behaviour in translocation carriers with short exchanges (Chandley et al. 1976; Goldman and Hultén 1993a).

When compared with data obtained from meiotically normal men, the mean chiasma frequency is decreased in S1, but not in S2. A reduction of chiasmata has also been reported in other translocation carriers (Goldman and Hultén 1993a, b).

The frequency of chiasmata within the quadrivalent and compared to control bivalents did not change for chromosomes involved in t(11;17), but was significantly increased in S2, specifically in the long arms of chromosomes 10 and 14. Moreover, the distribution of chiasmata in both long arms was modified in such a way that the increase was mainly localised in the interstitial region. Other authors have reported modifications in chiasma frequency and distribution in translocation carriers (Armstrong et al. 2000; Chandley et al. 1976; Goldman and Hultén 1993a, b; Laurie

et al. 1984), and also in an insertion carrier (Goldman et al. 1992). However, the recombination behaviour within the context of a quadrivalent of a given chromosome is not predictable, since it has been seen that the same chromosome can display different chiasma patterns depending on the translocation. This is the case, for instance, of chromosome 10, which has been analysed in two other different reorganisations (Laurie et al. 1984). Although the breakpoint for chromosome 10 is the same in these two other translocations and also in the translocation  $t(10;14)$  presented in this work, results obtained from their analysis has shown that chiasma incidence in 10q varies significantly among these three reorganisations. Since the frequency of interstitial chiasmata affects the final production of normal gametes, it is important to obtain information about the probability of this phenomenon in order to be able to predict the segregation pattern of reciprocal translocations.

### **Segregation analysis**

As was expected from the different frequencies of interstitial chiasmata found in MI in the two subjects, the incidence of asymmetric dyads was specially high in S2 and sporadic in S1. Thus, and assuming that half of the asymmetric dyads would result in a normal or balanced segregation, the data obtained for S1 indicate that the proportion of balanced and unbalanced gametes produced by this heterozygote translocation carrier would be 43.08% and 56.92%, respectively. So, the genetic risk due to unbalanced gametes would be 56.92%. Data reported for S2 lead to the prediction that the frequencies of balanced and unbalanced gametes, would be 44.45% and 55.55%, respectively. In this case, the genetic risk would be 55.55%. These results are not different from the segregation data obtained in decondensed sperm nuclei (Table 5). It can be assumed, then, that a selection based on

chromosomal unbalances does not occur during spermatogenesis. This conclusion has also been made in another translocation analysis (Armstrong et al. 2000). By studying a subject carrier of the most frequent reciprocal translocation in humans, t(11;22), the authors demonstrated that a high frequency of a 3:1 imbalance mode at birth does not imply a preference towards the production of this segregation, rather a strong postzygotic selection against other unbalanced genotypes.

Significant differences among complementary products of the adjacent 1 segregation mode were detected in sperm head analysis. This has also been observed in other reciprocal translocation analyses (Blanco et al. 1998a; Van Hummelen et al. 1997). It has been proposed that the differences observed could be caused by unresolved chiasmata in MI, especially in the translocated segments, which would lead to either an arrest of the meiotic process or to the production of other abnormal phenotypes. In this case, the phenotypes expected to be found more frequently should have been those carrying the shorter translocated segments, i.e., 17,der(11) and 10,der(14). However, in S1 the phenotypes with the longer translocated segment were seen with significantly increased frequency. Other authors have reported a similar situation (Cifuentes et al. 1999; Estop et al. 1998a; Honda et al. 1999; Oliver-Bonet et al. 2001). Thus, it is probable that other factors could modify the expected 1:1 ratio of reciprocal products. These factors could be related to cellular degeneration caused by the lack or the disomy of some essential spermatogenic genes located in one of the translocated segments, but also to hybridisation failures of some of the fluorescent probes.

### **Aneuploidy analysis**

Results obtained in the aneuploidy analysis performed on the two subjects have not reported any evidence for an interchromosomal effect (Table 6). The two translocation carriers analysed in this study had normal semenograms. It has been suggested that the presence of ICE in translocation carriers could be restricted to those carriers with abnormal semenograms (Pellestor et al. 2001). Moreover, a correlation between poor semen parameters and an increase in the aneuploidy of other chromosomes not related to translocation has been detected in another work (Vegetti et al. 2000).

Centromeric probes for gonosome have been used on MI and MII spreads, making behaviour analysis of the sex chromosomes during the spermatogenesis possible. Surprisingly, the incidence of sex univalents in MI was extremely high, 13.1% in subject 1 and 28.8% in S2. However, this incidence declined progressively in subsequent spermatogenic stages. Thus, in MII, the number of cells bearing a sexual aneuploidy represented 2.78% in S1 and 5.56% in S2, and in sperm nuclei the frequency decreased until reaching the rates shown in Table 6 (0.38% in S1, 0.23% in S2). A reduction of sex aneuploidy has also been observed in a meiotic study performed on a 47,XYY man (Blanco et al. 2001). As mentioned above, selection against cellular chromosome content has not been detected in these two patients. Thus, our results suggest that meiotic arrest processes would be more conditioned by the presence of univalence rather than by chromosomal unbalances.

## **Acknowledgments**

We would like to thank Àngels Niubó for technical assistance.

We acknowledge the financial support given by FIS, (PI020258), CIRIT (2001 SGR-00201).



## References

- Armstrong SJ, Goldman ASH, Speed RM, Hultén MA (2000) Meiotic studies of a human male carrier of the common translocation, t(11;22), suggest postzygotic selection rather than preferential 3:1 MI segregation as the cause of liveborn offspring with an unbalanced translocation. *American Journal of Human Genetics* 67: 601-609
- Armstrong SJ, Hultén MA (1998) Meiotic segregation analysis by FISH investigations in sperm and spermatocytes of translocation heterozygotes. *European Journal of Human Genetics* 6:430-431
- Blanco J, Egozcue J, Clusellas N, Vidal F (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* 83:275-280
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2001) Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47,XXY, mosaic 46,XY/47,XXY and 47,XXY) assessed by fluorescence in-situ hybridization. *Human Reproduction* 16:887-892
- Chandley AC, Seuanez H, Fletcher J (1976) Meiotic behaviour of five human translocation carriers. *Cytogenetics and Cell Genetics* 17:98-111
- Cifuentes P, Navarro J, Blanco J, Vidal F, Míguez L, Egozcue J, Benet J (1999) Cytogenetic analysis of sperm chromosomes and sperm nuclei in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) by in situ hybridisation. *European Journal of Human Genetics* 7:231-8

- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J (2000) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Human Reproduction Update* 6:93-105
- Estop AM, Cieply K, Munné S, Surti U, Wakim A, Feingold E (2000) Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? Sperm FISH studies. *Human Genetics* 106:517-524
- Estop AM, Cieply K, Wakim A, Feingold E (1998) Meiotic products of two reciprocal translocations studied by multicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* 83:193-198
- Evans EP, G B, E FC (1964) An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* 3:289-294
- Goldman ASH, Hultén MA (1993a) Analysis of chiasma frequency and first meiotic segregation in a human male reciprocal translocation heterozygote, t(1;11)(p36.3;q13.1) using fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* 63:16-23
- Goldman ASH, Hultén MA (1993b) 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
- Goldman ASH, Martin RH, Johannisson R, Gould CP, Davison EV, Emslie JE, Burn J, Hultén MA (1992) Meiotic and sperm chromosome analysis in a male carrier of an inverted insertion (3;10)(q13.2;p14p13). *Journal of Medical Genetics* 29:460-464

- Guttenbach M, Engel W, Schmid M (1997) Analysis of structural chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosomes aberrations. A review. *Human Genetics* 100:1-21
- Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin DK, Merrill M, Millie EA, Saker D, Shen J, Zaragoza M (1996) Human aneuploidy: incidence, origin and etiology. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 28:167-175
- Hassold T, Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Review Genetics* 2:280-291
- Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Honda N, Hara T, Ohama K (1999) Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers, t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triple-color fluorescence in situ hybridization. *Human Genetics* 105:428-436
- Jacobs PA (1990) The role of chromosome abnormalities in reproductive failure. *Reprod Nutr Dev Suppl* 1:63s-74s
- Jacobs PA (1992) The chromosome complement of human gametes. In: SR M (ed) *Oxford review of reproductive biology*. Vol 14. Oxford University Press, New York, pp 48-72
- Laurie DA, Hultén MA (1985) Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Annual of Human Genetics* 49:189-201
- Laurie DA, Palmer RW, Hultén MA (1984) Studies on chiasma frequency and distribution in two fertile men carrying reciprocal translocations: one with a t(9;10) karyotype and one with a t(Y;10) karyotype. *Human Genetics* 68:235-247

- Lejeune J (1963) Autosomal disorders. *Pediatrics* 32:326-337
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Carrera M, Egozcue J, Benet J (2001) Meiotic segregation analysis in a t(4;8) carrier: comparison of FISH methods on sperm chromosome metaphases and interphase sperm nuclei. *European Journal of Human Genetics*:395-403
- Pellestor F, Imbert I, Andréo B, Lefort G (2001) Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization and primed in-situ labelling techniques. *Human Reproduction* 16:1155-1164
- Shi Q, Martin RH (2001) Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction*:655-666
- Templado C, Navarro J, Requena R, Benet J, Ballesta F, Egozcue J (1990) Meiotic and sperm chromosome studies in a reciprocal translocation t(1;2)(q32;q36). *Human Genetics* 84:159-162
- Van Hummelen P, Manchester D, Lowe X, Wyrobek AJ (1997) Meiotic segregation, recombination, and gamete aneuploidy assessed in a t(1;10)(p22.1;q22.3) reciprocal translocation carrier by three and four-probe multicolor FISH in sperm. *American Journal of Human Genetics* 61:651-659
- Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I, Van Steirteghem A (2000) Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in situ hybridization in infertile men. *Human Reproduction* 15:351-365

- Vidal F, Moragas M, Català V, Torelló MJ, Santaló J, Calderón G, Jiménez C, Barri PN, Egozcue J, Veiga A (1993) Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in situ hybridization study. *Human Reproduction* 8:1740-1743
- World Health Organization (1999) WHO laboratory manual for the examination of human semen and sper-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge

**Table 1.** Distribution of different configurations for the t(11;17) at MI

Configuration	t(11;17)	
<b>Ring</b>		
4 chiasmata	11pt, 11qt, 17pt, 17qt	27 (44.3%)
	Sub-total	27 (44.3%)
5 chiasmata	11pt, 11q, 11qt, 17pt, 17qt	17 (26.2%)
	11pt, 11p, 11qt, 17pt, 17qt	2 (3.3%)
	11pt, 11qt, 17pt, 17q, 17qt	6 (9.8%)
	11pt, 11qt, 17pt, 17pint, 17qt	1 (1.6%)
	Sub-total	26 (42.6%)
6 chiasmata	11pt, 11p, 11qt, 17pt, 17q, 17qt	3 (4.9%)
	Sub-total	3 (4.9%)
<b>Chain</b>		
3 chiasmata	11tp, 11qt, 17qt	3 (4.9%)
	17qt, 17pt, 11pt	2 (3.3%)
	Sub-total	5 (8.2%)
Total		61 (100%)

**Table 2.** Distribution of different configurations for the t(10;14) at MI

Configuration	t(10;14)	
<b>Ring</b>		
4 chiasmata	10pt, 10qt, 14qint, 14qt	8 (15.69%)
	10qint, 10qt, 14pt, 14qt	1 (1.96%)
	Sub-total	9 (17.6%)
5 chiasmata	10pt, 10qt, 14qint, 14qint, 14qt	1 (1.96%)
	10pt, 10qint, 10qt, 14qint, 14qt	23 (45.10%)
	10pt, 10qint, 10qt, 14pt, 14qt	2 (3.92%)
	10pt, 10qt, 14pt, 14qint, 14qt	1 (1.96%)
	Sub-total	27 (52.94%)
6 chiasmata	10pt, 10qint, 10qt, 14pt, 14qint, 14qt	2 (3.92%)
	10pt, 10qint, 10qt, 14qint, 14qint, 14qt	11 (21.57%)
	Sub-total	13 (25.49%)
<b>Chain</b>		
3 chiasmata	10pt,14qt, 14qint	1 (1.96%)
4 chiasmata	10pt, 10qint, 10qt, 14qint	1 (1.96%)
	Sub-total	2 (3.92%)
	Total	51 (100%)

**Table 3.** Chiasmata frequency per chromosome arm and for all autosomes

Chromosome arm	Mean chiasma frequency			
	t(11;17)		Controls <sup>a</sup>	
	%	Range	%	Range
11p	1.03	1-2	1.02	1-2
11q	1.29	0-2	1.22	1-2
11cen→ q13.1	0.00	0	0.00	0
17p	0.95	0-2	1.00	1
17q	1.15	1-2	1.08	0-2
17cen→ p11.2	0.02	0-1	0	0
All autosomes	48.94***	40-64	51.33	40-60

	t(10;14)		Controls	
	%	Range	%	Range
10p	0.98	0-1	1.00	
10 q	1.74**	1-2	1.48	1-3
10cen→ q24	0.78***	0-1	0.48	0-1
14p	0.12	0-1	0.03	0-1
14q	2.16*	1-3	1.91	1-3
14cen→ q32	1.18***	1-2	0.91	1-2
All autosomes	50.33	42-66	51.33	40-60

a: Data from Laurie and Hultén, 1985

t-student analysis, \* p=0.004, \*\* p= 0.003, \*\*\* p= 0.001



**Table 4.** Frequencies of asymmetric dyads expected and found at MII, for t(10;14) translocation carrier

Interstitial chiasmata in	Number of cells (%)
<b>Chromosome 10</b>	
0	11 (21.57)
1	40 (78.43)
Total	51 (100.00)
Dimorphic expected at MII	-- (78.43)
Dimorphic found at MII	26/36 (72,22)
<b>Chromosome 14</b>	
0	3 (5.88%)
1	36 (70.59)
2	12 (23.53)
Total	51 (100.00)
Dimorphic expected at MII	-- (82,36)
Dimorphic found at MII	27/36 (75.00)

**Table 5** Segregation mode frequencies found at MII and sperm nuclei

Segregation	t(11;17)		t(10;14)	
	No of cells (%)		No of cells (%)	
	MI I	Sperm	MI I	Sperm
Alternate				
a + b	40 (27.78)		3 (8.33)	
der(a) + der(b)	28 (19.44)		0 (0.00)	
Sub-total	68 (47.22)	2193 (40.83%)	3 (8.33)	1387 (44.58)
Adjacent 1				
a + der(b)	13 (9.03)	779 (14.50%)*	0 (0.00)	543 (17.45)**
b + der(a)	21 (14.58)	621 (11.56%)*	0 (0.00)	657 (21.12)**
Sub-total	34 (23.61)	1400 (26.06%)	0 (0.00)	1200 (38.57)
Alternate/Adjacent 1				
a/der(a) + b	0 (0.00)		1 (2.78)	
a/der(a) + der(b)	0 (0.00)		1 (2.78)	
a/der(a) + b/der(b)	1 (0.69)		20 (55.56)	
a + b/der(b)	1 (0.69)		3 (8.33)	
der(a) + b/der(b)	1 (0.69)		1 (2.78)	
Sub-total	3 (2.07)		26 (72.22)	
Σ Alternate/Adjacent 1	105 (72.90)	3593 (66.89)	29 (80.56)	2587 (83.16)
Adjacent 2				
a + der(a)	17 (11.81)	640 (11.92%)	1 (2.78)	85 (2.73)
b + der(b)	18 (12.50)	722 (13.44%)	0 (0.00)	127 (4.08)
a/der(a) + a/der(a)	0 (0.0)	14 (0.26%)	3 (8.33)	75 (2.41)
b/der(b) + b/der(b)	0 (0.0)	8 (0.15%)	2 (5.56)	82 (2.64)
Subtotal	35 (24.31)	1384 (25.77%)	6 (16.67)	369 (11.86)
3:1	4 (2.78)	395 (7.35%)	1 (2.78)	155 (4.98)
Subtotal	4 (2.78)	395 (7.35%)	1 (2.78)	155 (4.98)
Total	144 (100)	5371 (100)	36 (100)	3111 (100)

$\chi^2$  test, \* p=0.0031, \*\* p=0.0221

**Table 6.** Aneuploidy frequencies detected in the two translocation carriers

<b>Translocation</b>	<b>Disomy</b>						<b>Diploidy</b>	
	<b>X</b>	<b>Y</b>	<b>XY</b>	<b>6</b>	<b>18</b>	<b>21</b>	<b>X,Y,18</b>	<b>6,21</b>
<b>t(10;14)(q24;q32)</b>	.05	.09	.09	.09	.06	.12	.28	.24
<b>t(11;17)(q13.1;p11.2)</b>	.07	.14	.15	.09	.04	.24	.24	.15
<b>Controls</b>	.04	.07	.07	.07	.05	.17	.24	.23

### **Legends to Figures**

**Figure 1.** Idiograms for  $t(11;17)(q13.1;p11.2)$  and  $t(10;14)(q24;q32)$

**Figure 2.** Ring configuration in a MI spread of  $t(11;17)(q13.1;p11.2)$

**Figure 3.** Quadrivalent with two interstitial chiasmata in a MI spread of  $t(10;14)(q24;q32)$

Figure 1

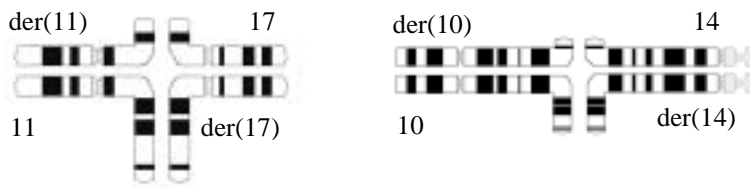


Figure 2

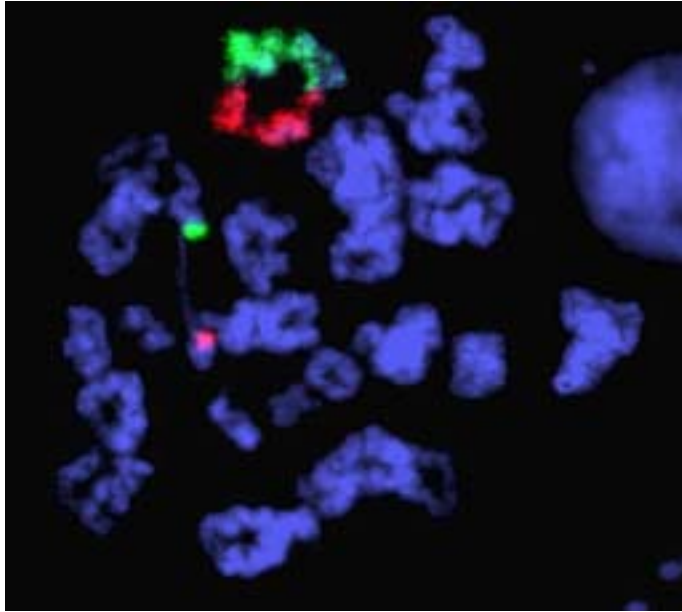
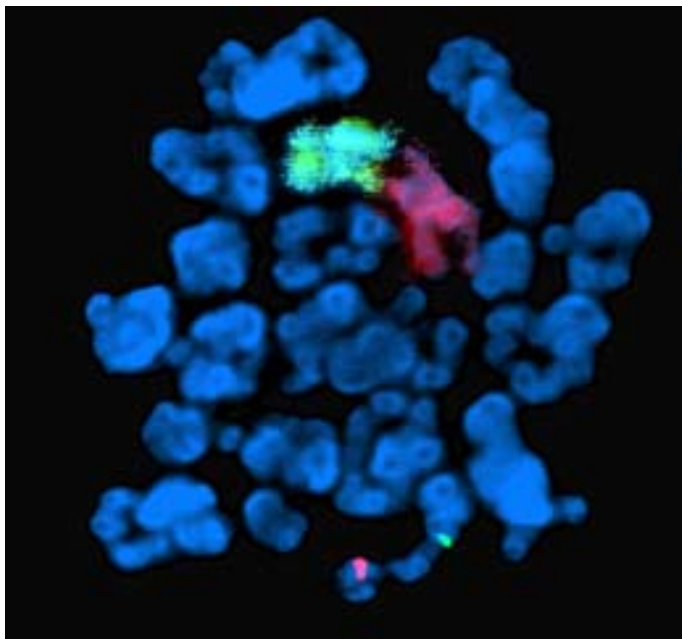


Figure 3









**4.4. ARTICLE 4**

**Títol:** Karyotyping of Human Synaptonemal Complexes by cenM-FISH

**Autors:** Maria Oliver-Bonet, Thomas Liehr, Angela Nietzel, Anita Heller, Heike Starke, Uwe Claussen, Montserrat Codina-Pascual, Aïda Pujol, Carlos Abad, Josep Egozcue, Joaquina Navarro, Jordi Benet

**Publicació:** European Journal of Human Genetics, en premsa

**Index d'impacte:** 3.173





## **5. DISCUSIÓ**



## **5.1 CONTRIBUCIÓ DE LES TRANSLOCACIONS RECÍPROQUES EN L'INCIDÈNCIA DE GÀMETES CROMOSÒMICAMENT DESEQUILIBRATS**

Els pacients portadors de translocacions recíproques produeixen una varietat de fenotips i genotips de gàmetes equilibrats i desequilibrats. Les dades de segregació cromosòmica obtingudes en diferents treballs a partir tant de l'anàlisi de cromosomes d'espermatozoide com de l'anàlisi de nuclis descondensats suggereixen que la proporció d'espermatozoides equilibrats i desequilibrats és variable. Així, tot i que la freqüència mitjana d'ambdós productes és aproximadament d'un 46% i d'un 54% respectivament (Guttenbach et al. 1997), els valors d'espermatozoides fenotípicament normals per cada translocació oscil·len entre el 19 i el 77%.

En una revisió més recent, que inclou estudis realitzats en nuclis descondensats d'espermatozoide, la segregació més freqüent és l'alternant, amb una incidència mitjana propera al 39%, seguida per la segregació adjacent 1, amb un rang d'incidència que se situa entre el 16 i el 41% (Shi and Martin 2001). La segregació adjacent 2 i la segregació 3:1 es troben, de mitjana, en el 9 i en l'11% respectivament dels espermatozoides analitzats (Shi and Martin 2001). En quatre de les cinc translocacions recíproques analitzades en aquest treball, el tipus de segregació predominant és també la segregació alternant. En la cinquena,  $t(1;13)$ , el percentatge de la segregació alternant és també el més freqüent, tot i que és igual al de la segregació adjacent 1 (41.6%). Aquest últim tipus de segregació és també el més freqüent entre els gàmetes desequilibrats de les altres quatre translocacions analitzades, tot i que en tres d'elles,  $t(11;17)$ ,  $t(3;19)$  i  $t(4;8)$ , la presència de la segregació adjacent 2 és també molt significativa (Taula 5).

**Taula 5:** Segregació cromosòmica observada en les cinc translocacions analitzades

Translocació	Segregació (%)							
	Alternant		Adjacent 1		Adjacent 2		3:1	
	a,b	der(a),der(b)	a,der(b)	B,der(a)	a,der(a)	b,der(b)	Monosòmics	Trisòmics
t(1;13)(q41;q22) <sup>1</sup>	24.7	16.9	20.4	21.2	5.9	8.5	0.8	1.6
t(3;19)(p21;p13.3) <sup>1</sup>	18.0	21.1	17.2	18.7	7.8	14.0	2.4	0.8
t(4;8)(q28;p23) <sup>1</sup>	19.3	16.1	16.5	16.8	9.4	10.3	6.5	3.4
t(4;8)(q28;p23) <sup>2</sup>		30.5	15.1	13.4	7.8	12.7	13.2	6.3
t(11;17)(q13.1;p11.2)		40.4	14.4	11.4	12.1	13.4	4.2	3.0
t(10;14)(q24;q32) <sup>2</sup>		44.3	17.3	21.0	5.1	6.7	4	1

1 estudi realitzat en complements cromosòmics d'espermatzoide

2 estudi realitzat en nuclis descondensats d'espermatzoide

a,dera fa referència al primer cromosoma de la fórmula del cariotip

b,derb fa referència al segon cromosoma de la fórmula del cariotip

S'ha suggerit que determinats factors poden afectar el patró de segregació, de manera que fenotips normalment poc freqüents, com és el cas dels corresponents a les segregacions adjacent 2 i 3:1, es troben amb major incidència de l'esperada. Així per exemple, alguns autors proposen que factors com la participació d'un cromosoma acrocèntric en la reorganització o una configuració molt asimètrica del quadrivalent poden afavorir la segregació 3:1 (Jalbert et al. 1980). No obstant, en els dos casos que hem estudiat on hi intervé un cromosoma acrocèntric, la t(1;13) i la t(10;14), l'anàlisi de segregació no indica que s'hagi produït preferencialment una segregació 3:1. Ans el contrari, les freqüències de segregació 3:1 trobades en aquests dos pacients són baixes (Taula 5).

Altres autors sí que han trobat segregacions 3:1 anormalment elevades en portadors de reorganitzacions en les que hi ha involucrat un cromosoma acrocèntric, com és el cas de dos portadors d'una t(11;22)(q23;q11), estudiats mitjançant la tècnica de FISH en nuclis d'espermatzoides descondensats (Estop et al. 1999; Van Assche et al. 1999), o en el portador d'una t(17;22)(q11;q12) també estudiada mitjançant FISH en nuclis d'espermatzoides descondensats (Geneix et al. 2002).

Però aquests resultats són controvertits, ja que en un estudi fet en un altre portador de la  $t(11;22)(q23;q11)$  emprant l'anàlisi de complements de cromosomes d'espermatozoides, s'ha trobat que les freqüències d'adjacent 1, adjacent 2 i 3:1 són molt semblants (Martin 1984). De manera similar, els resultats obtinguts en un estudi recent d'un altre portador d'aquesta mateixa translocació, realitzat mitjançant tant l'anàlisi de CS com l'aplicació de tècniques de FISH sobre espermatozoides en estadis de MI i MII, tampoc no suggereixen l'existència d'una segregació 3:1 preferencial (Armstrong et al. 2000). Segons aquests resultats, la predominància de la segregació 3:1 entre la descendència dels portadors d'aquesta translocació s'explicaria millor per l'existència de selecció post-zigòtica en lloc de preferència vers la segregació 3:1.

També s'ha proposat que la segregació adjacent 2 pot tenir lloc de manera preferencial quan els segments intersticials o els fragments translocats són de mida suficientment petits com per a no permetre la formació de quiasmes en aquestes regions (Rickards 1983). Si es comparen els resultats citogenètics obtinguts a partir de descendència cromosòmicament desequilibrada, amb els valors de segregació observats en 34 portadors de translocacions diferents, s'ha proposat que la producció de gàmetes d'un tipus determinat de segregació està influenciat per l'abast del desequilibri (Faraut et al. 2000). Aquest anàlisi mostra una relació inversa entre la longitud del segment intersticial i la freqüència d'adjacent 2, de manera que com més curt sigui aquest segment, major serà la probabilitat que es produeixi aquesta segregació. En els casos de les translocacions  $t(3;19)$ ,  $t(4;8)$  i  $(11;17)$  estudiades en aquest treball, i d'acord amb el model de Faraut, el fet que els cromosomes 19, 8 i 17



aporten un petit segment intersticial en la figura del quadrivalent, podria explicar els elevats percentatges d'adjacent 2 trobats (Taula 5).

Quan es comparen els resultats de segregacions obtinguts en individus portadors de translocacions que afecten als mateixos cromosomes, s'observa que en alguns casos la freqüència de cada tipus de segregació és molt semblant. Aquest és el cas per a dos pacients portadors d'una  $t(3;9)$  (Honda et al. 1999), per a dos pacients portadors d'una  $t(6;11)$  (Rousseaux et al. 1995) i per als dos pacients portadors de la  $t(11;22)$  comentada (Estop et al. 1999; Van Assche et al. 1999). Però també es dona la situació contrària. Hi ha portadors de translocacions que, tot i afectar als mateixos cromosomes, presenten freqüències de segregació diferents. És el cas, per exemple, de dos individus portadors d'una translocació  $t(5;7)$  (Cifuentes et al. 1999; Estop et al. 1995b). És possible que, en aquest cas, la freqüència dels fenòmens de recombinació es pugui veure alterat a causa de la posició dels punts de trencament, de manera que la causa de les diferències en el patró de segregació sigui la presència o l'absència d'intercanvis cromosòmics. Pel que fa als nostres resultats, els percentatges de segregació del portador de la  $t(11;17)$  que hem estudiat són similars als descrits en un altre portador d'una  $t(11;17)$  (Spriggs et al. 1992).

En conjunt, tot el que s'ha discutit fins ara tant en relació amb la literatura com amb els nostres resultats, confirma el fet que la producció de gàmetes desequilibrats depèn de diversos factors, gran part d'ells, si no tots, relacionats amb les característiques dels cromosomes implicats en la reorganització. Per tant, i donat que cada translocació es comporta de manera única i particular, és necessari realitzar l'estudi meiòtic individualitzat de cada pacient portador d'una reorganització per tal de poder proporcionar consell genètic. El risc d'anomalia cromosòmica en el

moment de la concepció calculat a partir de les freqüències de gàmetes cromosòmicament desequilibrades és de 58,4%, 61,9%, 64,6%, 59,6% i 55,7% per a les  $t(1;13)$ ,  $t(3;19)$ ,  $t(4;8)$ ,  $t(11;17)$  i  $t(10;14)$ , respectivament

Quan es pretén analitzar el risc genètic d'un pacient portador d'una translocació, és important diferenciar entre l'incidència en la descendència i les freqüències d'espermatozoides genèticament desequilibrats observades en l'estudi de la segregació. Cal tenir present que la contribució de les translocacions recíproques al risc de descendència afectada depèn de la severitat de les duplicacions i deficiències (disomies i nulisomies parcials) obtingudes després de la segregació dels cromosomes implicats en la reorganització. De fet, la majoria de les anomalies cromosòmiques que deriven de les segregacions anòmales no són compatibles amb la supervivència del zigot format, de manera que l'incidència real d'anomalies cromosòmiques derivades de la translocació paterna en nounats no coincideix amb la freqüència de gàmetes desequilibrats, sinó que és molt inferior (Boué and Gallano 1984).

No obstant, algunes translocacions tenen un risc major de desequilibri i supervivència, a causa de les característiques dels cromosomes implicats en la reorganització, i tots els fetus supervivents tenen serioses conseqüències que inclouen discapacitats mentals i físiques. Seria el cas, per exemple, de la translocació  $t(1;13)(q41;q22)$ . La segregació en aquesta reorganització produeix espermatozoides parcialment disòmics pel cromosoma 13. Donat que la trisomia 13 és viable, els zigots formats a partir de gàmetes portadores de disomies parcials pel cromosoma 13 podrien avançar en el desenvolupament embrionari. Per això, en aquest cas,

l'incidència de descendència afectada pel síndrome de Patau podria ser propera a la freqüència d'espermatozoides disòmics pel cromosoma 13 (Taula 5).

## **5.2. ANÀLISI DE LA SEGREGACIÓ CROMOSÒMICA. RESULTATS EN LES DIFERENTS**

### **ETAPES DE L'ESPERMATOGÈNESI**

Els primers estudis realitzats mitjançant FISH en nuclis d'espermatozoide descondensats utilitzaven únicament sondes centromèriques, de manera que la distinció entre la segregació adjacent 1 i la segregació alternant no era possible. La posterior aplicació de sondes telomèriques i de seqüència única va fer possible la distinció entre aquest dos tipus de segregació. Actualment, encara tampoc és possible la diferenciació entre les subpoblacions de la segregació alternant, normal o equilibrada, excepte en alguns casos molt concrets, on els punts de trencament de la reorganització fa possible aquesta distinció (Mercier et al. 1998).

Per tal de determinar si els resultats obtinguts aplicant l'anàlisi de segregació en complements cromosòmics d'espermatozoide i en nuclis descondensats d'espermatozoide eren concordants, vàrem aplicar ambdues tècniques a la mateixa mostra de semen d'un individu portador d'una t(4;8). Vàrem determinar que no hi havia diferències estadístiques entre les proporcions trobades d'espermatozoides cromosòmicament equilibrats i desequilibrats. Únicament vàrem trobar diferències significatives entre les proporcions dels productes de segregació 3:1 detectades en els dos estudis. Les possibles causes apunten cap a factors relacionats amb les limitacions pròpies de cada tècnica. En el cas del sistema hámster-humà, a banda de que el número analitzat és petit des del punt de vista estadístic, no es pot descartar el fet que es puguin produir pèrdues d'alguns cromosomes durant el procés de fixació.

Pel que fa a l'anàlisi amb caps descondensats, el punt crític és l'eficiència del protocol de descondensació, ja que aquesta afecta directament a la qualitat del senyal d'hibridació i, consegüentment, a la interpretació del senyal detectat (Egozcue et al. 1997). Així, una descondensació excessiva de la cromatina pot produir un senyal d'hibridació poc definit, que es pot confondre amb una disomia. En canvi, una descondensació insuficient pot provocar que la sonda no s'uneixi al DNA diana, de manera que no es pugui discriminar entre els espermatozoides nul·lisòmics i la manca d'hibridació. Tampoc es pot descartar que en alguns casos es donin superposicions de senyals a causa de la reduïda mida del nucli de l'espermatozoide, amb la consegüent interpretació errònia. L'anàlisi de la t(4;8) el vàrem realitzar únicament amb dos fluorocroms, *spectrum green* i *spectrum orange*, i la barreja d'aquests per obtenir un nou color, el groc. Possiblement, en aquelles cèl·lules on les dues senyals vermelles o verdes coincidien de localització, la interpretació de la segregació va ser incorrecta. Per tal d'evitar aquest problema, els anàlisis posteriors en altres portadors de translocació, t(11;17) i t(10,14), s'han realitzat amb tres fluorocroms d'excitació diferents, *spectrum aqua*, *spectrum green* i *spectrum orange*, de manera que encara que es produeixin superposicions, es poden diferenciar els senyals amb els filtres específics per a cada fluorocrom.

En el mateix sentit, els resultats de les segregacions 3:1 determinades en individus portadors de la mateixa reorganització t(11;22)(q23;q11) són discrepants segons el tipus d'anàlisi realitzat: FISH en nuclis descondensats d'espermatozoide (Estop et al., 1999; Van Assche et al., 1999) i FISH en cromosomes meiótics (Armstrong et al. 2000). Del total dels espermatozoides portadors d'un producte de segregació 3:1 trobats en els estudis de caps descondensats, els espermatozoides

monosòmics eren de vuit a nou vegades més freqüents que els trisòmics. En canvi, els productes de 3:1 determinats en cromosomes meiótics es varen trobar amb una *ratio* propera a la 1:1 esperada. Si considerem el que hem comentat fins ara, les monosomies observades en l'anàlisi de nuclis descondensats d'espermatozoide podrien ser errades en l'hibridació.

L'anàlisi de segregació per a diferents portadors de reorganitzacions va permetre observar tots els possibles productes de la segregació, tant equilibrats com desequilibrats, i evidenciava l'absència d'una selecció cel·lular en base al contingut cromosòmic (Martin 1988). Fins i tot en el cas d'un portador d'una reorganització cromosòmica complexa, que afectava a tres cromosomes, es van poder observar complements d'espermatozoides per a 55 diferents tipus de segregació, tots ells derivats de la resolució de l'hexavalent format. En el cas de les translocacions t(11;17) i t(10;14), on hem pogut observar diferents fases del procés meiótic, les freqüències dels diferents tipus de segregació detectades en nuclis d'espermatozoide no difereixen de les observades a MII (Taula 5 de l'article 3). A més, la freqüència de cromosomes dimòrfics observats a MII, concorda amb la freqüència esperada a partir de la incidència de recombinacions intersticials observada a MI (Taula 4 de l'article 3). Així, aquests resultats confirmen la proposta feta a partir dels anàlisi de cromosomes d'espermatozoide de manca de selecció cel·lular segons el contingut cromosòmic.

### **5.3. RELACIÓ ENTRE PRODUCTES D'UN MATEIX TIPUS DE SEGREGACIÓ**

Per a cada tipus de segregació determinat, ja sigui alternant, adjacent 1, adjacent 2 o 3:1, s'espera que les proporcions dels dos tipus de fenotips recíprocs que

en resulten siguin semblants. No obstant, a vegades es troben aquests productes recíprocs en freqüències significativament diferents. És el cas, per exemple, de les translocacions  $t(4;8)$ ,  $t(11;17)$  i  $t(10;14)$  analitzades en aquest treball. S'ha proposat que aquesta distorsió en la *ratio* sigui causada per la presència de recombinacions no finalitzades a MI (Van Hummelen et al. 1997). El resultat d'aquesta anomalia en el procés de recombinació podria ser un bloqueig del procés meiòtic, o bé l'aparició a MII de bivalents parcials i la subseqüent segregació del cromosoma complet en lloc de la segregació de les cromàtides germanes a anafase II. Segons aquesta hipòtesi, en el cas de la segregació adjacent 1, la freqüència de quiasmes no finalitzats hauria de ser proporcional a la llargada dels segments translocats. Així, com més llargs fossin aquests segments, la probabilitat de quiasmes no finalitzats seria també major, de manera que s'esperaria trobar un increment del fenotip d'adjacent 1 portador dels segments translocats més curts. En canvi, els resultats que hem obtingut en l'anàlisi de la  $t(4;8)$  i de la  $t(11;17)$  indiquen que el fenotip més freqüent en aquest cas és el portador del segment translocat més llarg. Altres autors han trobat resultats similars (Cifuentes et al. 1999; Estop et al. 1998a; Honda et al. 1999). Aquestes dades semblen indicar que, a banda de possibles quiasmes no finalitzats, hi pugui haver altres factors que estiguin afectant a la segregació del quadrivalent.

Entre aquests possibles factors s'hi podria incloure el paper que juguen les cohesines durant els processos meiòtics. En els darrers anys, s'ha anat descrivint un complex de cohesines que colocalitza amb els cromosomes meiòtics i els complexos sinaptonemals (Eijpe et al. 2000), el qual és imprescindible per a la correcta formació dels elements axials i per a la correcta segregació dels cromosomes (Buonomo et al. 2000; Pelttari et al. 2001). Aquest complex de cohesines reclutaria les proteïnes de

recombinació, i promouria la sinapsi entre els cromosomes homòlegs, fins i tot en absència de la proteïna SCP3, component principal dels elements axials (Klein et al. 1999). Si aquest complex de cohesines no es formés correctament, hi hauria una pèrdua de cohesió entre les cromàtides germanes, abans de la MI, o entre els centròmers, abans de la anafase I. Conseqüentment, apareixerien errors en la segregació dels bivalents, els quals podrien ocasionar bloqueig i fenòmens de no disjuncions meiótiques a MI o a MII, o bé a separacions primerenques de les cromàtides germanes (Van Heemst and Heyting 2000).

#### 5.4 ANÀLISI DE QUIASMES

En l'anàlisi de quiasmes realitzat en els portadors de translocació  $t(11;17)$  i  $t(10;14)$ , s'ha observat una reducció en el nombre de quiasmes global. Altres autors han trobat resultats similars (Goldman and Hultén 1993a). En canvi, la freqüència dels quiasmes en la regió intersticial del quadrivalent de la  $t(10;14)$  estava incrementada, al mateix temps que s'observava una modificació en la posició dels punts de recombinació, respecte de les posicions observades en estudis control (Laurie and Hultén 1985). Modificacions en el número i posició dels quiasmes en el quadrivalent poden afectar a la configuració en anell o en cadena que aquest adopta durant l'etapa de diacinesi. S'ha proposat que les configuracions en anell es resolguin preferentment cap a segregacions 2:2, mentre que les configuracions en cadena afavoririen la segregació 3:1. En aquest sentit, en un anàlisi de la segregació per a una segregació  $t(1;2)$ , feta en complements cromosòmics d'espermatozoide i en MI, s'ha trobat una concordància entre les freqüències de segregacions 2:2 i 3:1 i les freqüències de tetravalent en anell i en cadena, respectivament (Templado et al.

1990). No obstant, un altre estudi realitzat en un portador d'una  $t(15;20)$ , no mostrava tal concordància (Goldman and Hultén 1993b). Els resultats que hem obtingut en l'estudi de cromosomes meiòtics podrien indicar que, encara que les disposicions en cadena o en anell poden ser un determinant, altres factors com ara la presència de quiasmes intersticials dins una configuració en cadena podrien afavorir la segregació 2:2 enlloc de la 3:1.

### **5.5. PRESENCIA D'EFECTES INTERCROMOSÒMICS**

Mitjançant la tècnica de FISH en nuclis d'espermatozoide, un total de 323.931 espermatozoides de 29 portadors de translocacions recíproques han estat analitzats per determinar la presència d'efectes intercromosòmics. Les comparacions de les freqüències d'espermatozoides disòmics per aquells cromosomes no relacionats amb la reorganització mostren com, en un 58% dels casos, hi ha un increment de la freqüència per al manco un cromosoma. El 38% dels casos analitzats presenten una freqüència que se situa dins del rang control. El valor d'aquest increment en la freqüència d'aneuploïdia varia molt, depenent dels cromosomes estudiats. Per exemple, en nou dels 22 individus portadors d'una reorganització cromosòmica s'ha observat un increment en la freqüència d'aneuploïdia pel cromosoma 21, el qual oscil·la entre 1.4 i 6.6 vegades el valor trobat en individus control. En canvi, pels cromosomes 6, 12, 15 i 17 no s'ha detectat cap increment en la freqüència d'aneuploïdia que indiqui un efecte intercromosòmic (Shi and Martin 2001). D'aquests resultats es pot concloure que la segregació meiòtica d'alguns cromosomes, com ara el cromosoma 21, es més sensible a la presència d'una reorganització.



Pel que fa als portadors estudiats en aquest treball, s'han detectat lleugers increments en la disomia dels cromosomes sexuals en els portadors de la t(3;19) i la t(4;8), i en la disomia del cromosoma 18 en el portador de la t(4;8) (Taula 6). Aquest fet podria ser conseqüència de l'assimetria dels quadrivalents d'aquestes dues reorganitzacions, deguda a la participació d'un fragment translocat de petita mida. Si aquest fragment és massa petit, podria dificultar la formació de l'intercanvi terminal entre els homòlegs, de manera que aparegués una regió desaparellada després de la resolució del quadrivalent cap a una configuració tipus cadena a MI (Blanco et al. 2000). Aquestes regions desaparellades podrien ser detectades pels punts de control (*checkpoint*) que actuen durant la metafase I, i això afectaria a la segregació d'altres bivalents, produint-se diferents graus d'alteracions meiòtiques, des de bloqueig de la meiosi fins a la generació d'aneuploidies (Egozcue et al. 2000).

**Taula 6** Freqüències d'aneuploidies observades en les translocacions analitzades

Translocació	Disomia						Diploidia	
	X	Y	XY	6	18	21	X,Y,18	6,21
<b>t(1;13)(q41;q22)</b>	.11	.15	.14	.09	.07	.21	.36	.38
<b>t(3;19)(p21;p13.3)</b>	.13	.14	.26	.12	.05	.23	.20	.16
<b>t(4;8)(q28;p23)</b>	.62	.46	.14	.10	.40	.55	.36	.41
<b>t(10;14)(q24;q32)</b>	.05	.09	.09	.09	.06	.12	.28	.24
<b>t(11;17)(q13.1;p11.2)</b>	.07	.14	.15	.09	.04	.24	.24	.15
<b>Controls</b>	.04	.07	.07	.07	.05	.17	.24	.23

Els pacients portadors de reorganitzacions cromosòmiques presenten diferents paràmetres seminals, des de normal fins a oligoastenoteratozoospermia. Aquesta gran variabilitat podria dependre dels cromosomes implicats en la reorganització i dels punts de trencament. Els resultats d'alguns autors (Pellestor et al. 2001; Vegetti et al. 2000) indiquen que la incidència de ICE es podria restringir a aquells pacients

portadors de translocació que tinguessin un seminograma alterat. Segons aquests autors, l'associació de paràmetres seminals pobres amb un increment en la incidència d'aneuploidies, conjuntament amb l'existència d'una reorganització estructural, seria un reflex de l'existència d'anomalies meiótiques importants. Altres autors proposen que l'increment d'errors meiótics podria ser un reflex d'un ambient testicular endocrí anòmal (Mroz et al. 1998).

## **5.6. ELS COMPLEXES SINAPTONEMALS COM A ESTRUCTURA INFORMATIVA DEL PROCÉS SINÀPTIC**

Un gran número de treballs on s'analitza el procés sinàptic en individus infèrtils mitjançant tècniques de tinció amb nitrat de plata i observació amb microscòpia òptica i electrònica, han demostrat que els CS són uns marcadors excel·lents a l'hora d'identificar la majoria de les anomalies sinàptiques (Solari 1998), proporcionant informació quant a l'etiologia de la infertilitat humana. Això es deu a que els CS són una representació lineal exacta del bivalent, i el seu comportament va lligat al procés d'aparellament dels cromosomes homòlegs. A més, els CS han permès visualitzar les figures meiótiques que formen els cromosomes implicats en les reorganitzacions cromosòmiques, així com analitzar el comportament sinàptic de la resta dels bivalents.

L'ús de tècniques d'immunocitogenètica aplicades sobre extensions de CS permet la detecció específica tant de proteïnes implicades en la formació de la seva estructura (SCP3, SCP2, SCP1) com de proteïnes relacionades amb els processos de recombinació (Rad51, Mlh1). Així per exemple, l'ús combinat d'anticossos fluorescents contra les proteïnes Mlh1 i SCP3 permet observar el patró singular de

punts de recombinació al llarg de tot el CS (Barlow and Hultén 1998). Aquesta metodologia és més específica, ràpida i senzilla que les tècniques emprades fins ara i, a més, té el gran avantatge de preservar la cromatina, possibilitant la identificació cromosòmica mitjançant l'anàlisi de FISH. Darrerament, aplicant la combinació d'aquestes dues tècniques en espermatoïcits humans, alguns autors han determinat el número i la posició dels punts de recombinació per alguns cromosomes específics (Lynn et al. 2002; Tease et al. 2002). Fins al moment, s'han aplicat sondes de pintat cromosòmic, centromèriques, telomèriques i de seqüència única, i ha estat possible la detecció simultània de fins a quatre cromosomes (Tease et al. 2002).

Els resultats del nostre treball mostren per primera vegada que, gràcies a l'aplicació conjunta de la immunocitogenètica i la tècnica de cenM-FISH, és possible identificar en humans, en una sola ronda d'hibridació, tots els bivalents d'una extensió de CS.

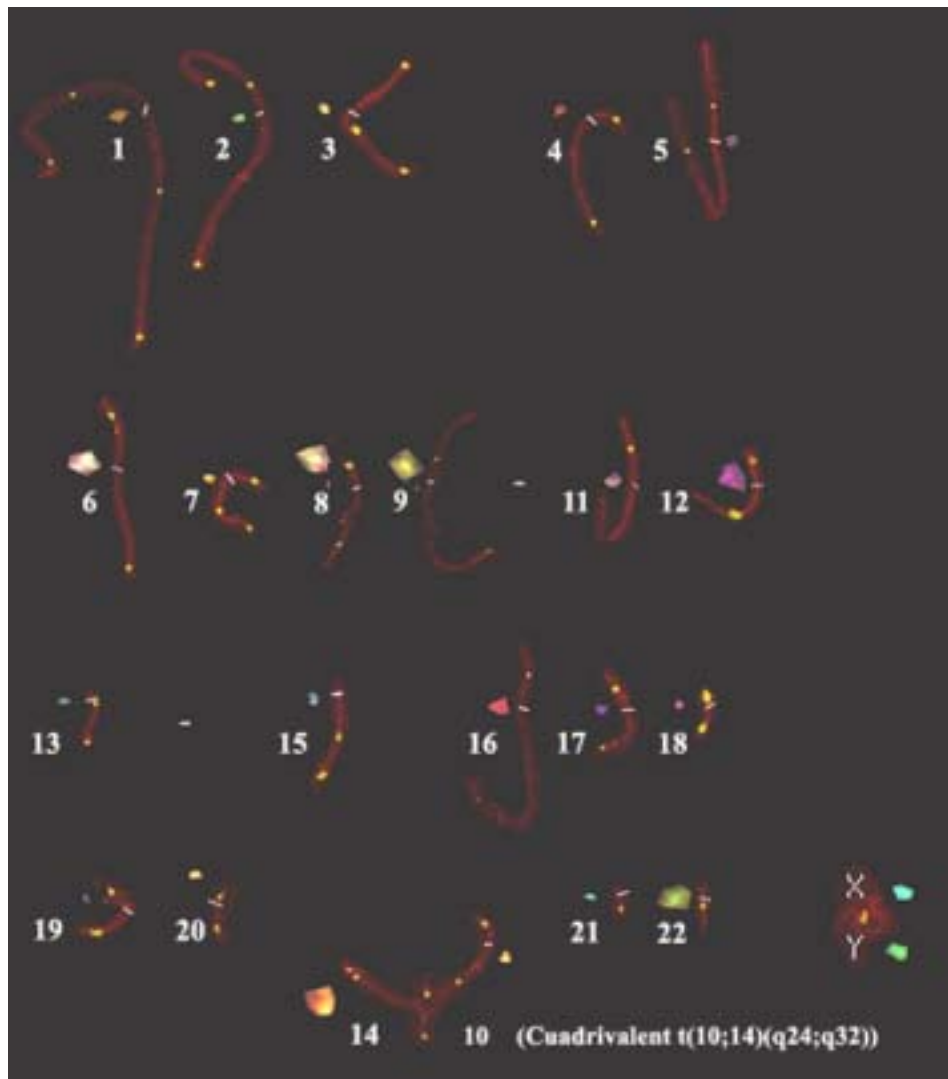
En l'anàlisi que hem realitzat emprant el cenM-FISH, hem pogut observar que els DNA centromèrics apareixen marcats amb senyals difuses de mida variable (Figura 2a, article 3), que se situen en un o en ambdós costats del CS, amb el seu origen situat en el CS corresponent. Aquesta aparença difusa dels senyals es deu a l'especial morfologia i condensació que adopten els bivalents després de la fixació amb formaldehid, independentment del tipus i número de sondes utilitzades. Cada sonda centromèrica hibrida amb els dos centròmers homòlegs de cada bivalent, i la seva dimensió depèn de les característiques de la regió del DNA diana. El senyal serà més gran, per exemple, en el cromosoma 1, ja que la regió que reconeix la sonda per aquest cromosoma és la 1q12 (regió heterocromàtica). A causa de l'elevada homologia del DNA de la regió alfa- satèl·lit dels cromosomes 13 i 21 (99.7%)

(Maratou et al. 1999), aquests dos cromosomes comparteixen la mateixa combinació de colors, de manera que no es poden diferenciar l'un de l'altre. Però això, en extensions de CS, no representa cap problema perquè, tal i com apunten alguns autors (Tease et al. 2002), la diferenciació entre els cromosomes 13 i 21 es pot fer respecte a la longitud del CS.

Tal i com ja apuntaren altres autors (Barlow and Hultén 1996), l'aplicació de tècniques de FISH sobre espermatòcits prèviament analitzats amb tècniques immunocitogenètiques provoca una pèrdua parcial de la intensitat fluorescent dels senyals dels anticossos. Malgrat tot, aquesta pèrdua d'intensitat no impedeix la detecció dels CS, de manera que els bivalents poden ser caracteritzats.

Un dels avantatges de la tècnica de cenM-FISH és la identificació de tots els bivalents en una única ronda d'hibridació de DNA. Recentment, un estudi realitzat en espermatòcits de ratolí ha permès la identificació de tots els bivalents en estadi de paquitè (Froenicke et al. 2002). En el seu cas, els autors han aplicat dues rondes successives d'hibridació emprant sondes de pintat cromosòmic. L'ús d'altres tècniques de multi-FISH basades amb pintats cromosòmics, com l'M-FISH o l'SKY, no seria adequat sobre extensions de CS humans, principalment perquè la seva aplicació resultaria en un halo de senyals superposades que impedirien la correcta identificació de cada bivalent. El cenM-FISH és una alternativa que evita aquest problema, i la seva aplicació sobre extensions de CS donarà un impuls molt important als anàlisis de recombinació meiótica. A més, l'identificació de tots els bivalents permet l'elaboració de cariotips de CS (Figura 8).

**Figura 8.** Cariotip de CS del portador de la  $t(10;14)(q24;q32)$



Mitjançant la tècnica de cenM-FISH, hem observat que alguns CS mostren una longitud física diferent de l'esperada. Aquest fenomen ja havia estat observat per alguns autors en humans i en altres organismes (Hultén 1974; Quevedo et al. 1997; Tease et al. 2002). Recentment, s'han comparat CS amb característiques morfològiques similars però densitat gènica diferent (cromosomes 21 i 22), i CS amb característiques morfològiques diferents però densitat gènica similar (cromosomes 16 i 19). S'ha observat una covariació en la longitud del CS, que demostra que la

longitud del CS reflecteix la longitud gènica enlloc de la longitud física d'un cromosoma determinat (Lynn et al. 2002). Fins ara, els CS s'ordenaven en idiogrames tenint en compte la llargada física de cada CS i l'índex centromèric (Solari 1980). El cenM-FISH permet elaborar el cariotip prescindint de la longitud dels complexos. Per tant, l'aplicació conjunta de la immunocitogenètica amb la tècnica de cenM-FISH permetrà construir idiogrames més ajustats, imprescindibles per fer l'anàlisi dels punts calents de recombinació.

En extensions de CS de portadors de translocacions recíproques, la cenM-FISH identifica els cromosomes implicats en la reorganització en la figura del quadrivalent. L'ús combinat de les tècniques d'immunocitogenètica i el cenM-FISH en extensions meiòtiques possibilitarà l'anàlisi de recombinació en controls i en pacients infèrtils, i ajudarà a entendre millor alguns dels mecanismes implicats en el procés meiòtic, incloent aquells que porten a la generació d'anomalies cromosòmiques.









## **6. CONCLUSIONS**



- 1.** Els portadors de translocacions recíproques equilibrades analitzats en aquest treball mostren un percentatge de gàmetes equilibrades que oscil·len entre el 30.5% i el 44.3% del total. La segregació més freqüentment observada és l'alternant. Les segregacions adjacent 1, adjacent 2 i 3:1 es detecten amb freqüències variables que depenen de factors propis per a cada translocació, com ara les longituds dels segments translocats i intersticials.
  
- 2.** El risc d'alteracions citogenètiques en el moment de la concepció determinat per a cada un dels pacients varia en funció, principalment, del comportament del tetravalent durant la seva segregació, i en menor mesura de l'existència de segregacions anòmales en la resta de bivalents.
  
- 3.** Els resultats de la segregació cromosòmica que hem obtingut en l'anàlisi d'una mateixa mostra del portador de la translocació recíproca t(4;8), emprant dues metodologies diferents no són significativament diferents.
  
- 4.** Dos dels cinc pacients estudiats, t(4;8) i t(3;19) presenten un increment d'aneuploidies per algun dels cromosomes analitzats respecte de valors controls. Així doncs, l'existència d'efectes intercromosòmics no és generalitzable per a tots els portadors de translocacions.
  
- 5.** La concordància observada en les freqüències de cada tipus de segregació detectades en les diferents etapes de l'espermatogènesi dels portadors t(10;14) i

t(11;17), indica que, al llarg d'aquest procés, no es produeix selecció cel·lular deguda a desequilibri cromosòmic.

**6.** La discordància trobada entre l'elevada freqüència d'univalents sexuals a MI i la baixa incidència d'aneuploidies sexuals tant a MII com a nuclis d'espermatozoide dels portadors t(10;14) i t(11;17), es pot explicar per un bloqueig del procés meiótic a causa de la presència d'aquests univalents.

**7.** La freqüència global de quiasmes en els portador t(11;17) és inferior a la freqüència detectada en individus controls. A més, s'observa una modificació en la distribució i una alteració en la incidència de quiasmes en la regió intersticial del quadrivalent del portador t(10;14).

**8.** La combinació de cenM-FISH amb tècniques d'immunocitogenètica, aplicada sobre extensions de complexos sinaptonemals, és una metodologia molt adequada per a la identificació dels bivalents en etapa de paquí. Aquesta nova aproximació és una eina que té una gran potencialitat que permetrà aprofundir en el coneixement del procés sinàptic i de la recombinació meiótica de cada bivalent.





## **7. BIBLIOGRAFIA**





**A**

---

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular biology of the cell*, 4th edition. Garland Science Publishing. London
- Alvarez R, Tusell L, Genescà A, Miró R, Benet J, Caballín MR, Egozcue J (1996) Chromosome aberrations in human spermatozoa treated with Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187. *Molecular Human Reproduction* 2: 481-484
- Alvarez R, Tusell L, Miró R, Genescà A, Caballín MR, Ribas M, Barquinero JF, Egozcue J (1997) Dose-response relationship for the induction of chromosomal abnormalities in gamma-irradiated human spermatozoa. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29: 357-366
- Anderson LK, Reeves A, Webb LM, Ashley T (1999) Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 Protein. *Genetics* 151: 1569-1579
- Andolz P, Bielsa M, Genescà A, Benet J, Egozcue J (1987) Improvement of sperm quality in abnormal samples using a modified swim-up procedure. *Human Reproduction* 2: 99-101
- Armstrong SJ, Goldman ASH, Speed RM, Hultén MA (2000) Meiotic studies of a human male carrier of the common translocation, t(11;22), suggest postzygotic selection rather than preferential 3:1 MI segregation as the cause of liveborn offspring with an unbalanced translocation. *American Journal of Human Genetics* 67: 601-609
- Armstrong SJ, Hultén MA (1998) Meiotic segregation analysis by FISH investigations in sperm and spermatocytes of translocation heterozygotes. *European Journal of Human Genetics* 6: 430-431

Assada M, Grffin D, Millie EA, Sheean L, Hassold T (2000) The effects of age and abnormal sperm count on the nondisjunction of spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction Genetics* 17: 51-59

## **B**

---

Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie DM, Monell C, Arnheim N, Bradley A, Ashley T, Liskay RM (1996) Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nature Genetics* 13: 336-342

Barlow AL, Hultén MA (1996) Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human spermatocytes. *Chromosome Research* 4: 562-573

Barlow AL, Hultén MA (1998) Crossing over analysis at pachytene in man. *European Journal of Human Genetics* 6: 350-8

Baumgartner A, Van Hummelen P, Lowe X, Adler I-D, Wyrobek AJ (1999) Numerical and structural chromosomal abnormalities detected in human sperm with a combination of multicolor FISH assays. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 33: 49-58

Benet J, Genescà A, Navarro J, Egozcue J, Templado C (1986) G-banding of human sperm chromosomes. *Human Genetics* 73: 181-2

Benet J, Genescà A, Navarro J, Egozcue J, Templado C (1992) Cytogenetic studies in motile sperm from normal men. *Human Genetics* 89: 176-180

Benet J, Martin RH (1988) Sperm chromosome complements in a 47, XYY man. *Human Genetics* 78: 313-315

- Benet J, Navarro J, Genescà A, Egozcue J, Templado C (1991) Chromosome abnormalities in human spermatozoa after albumin or TEST-yolk capacitation. *Human. Reproduction* 3: 369-375
- Benkhalifa M, Malet P, Qumsiyeh MB, Boucher D, Bellec V, Menezo Y (1994) Chromosome aberrations in normal and translocated human sperm: role in reproduction pathology. *Rev Fr Gynecol Obstet* 2: 288-296
- Blanco J, Egozcue J, Clusellas N, Vidal F (1998a) FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and interchromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenetics and Cell Genetics* 83: 275-280
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2000) Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Human Genetics* 106: 500-505
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2001) Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47,XXY, mosaic 46,XY/47,XXY and 47,XXY) assessed by fluorescence in-situ hybridization. *Human Reproduction* 16: 887-892
- Blanco J, Gabau E, Gomez D, Baena N, Guitart M, Egozcue J, Vidal F (1998b) Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in a population with a high prevalence of Down syndrome: increased incidence in cases of paternal origin. *American Journal of Human Genetics* 63: 1067-1072
- Blanco J, Gabau E, Gómez D, Baena N, Guitart M, Egozcue J, Vidal F (1998c) Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with

trisomy 21 in a population with high prevalence of Down's syndrome. Increased incidence in cases of paternal origin. *American Journal of Human Genetics* 63: 1067-1072

Boué H, Gallano P (1984) A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses. *Prenatal Diagnosis* 4: 45-67

Brandriff BF, Gordon LA, Ashworth L, Watchmaker G, Carrano AV, Wyrobeck A (1984) Chromosomal abnormalities in human sperm: comparison among four healthy men. *Human Genetics* 66: 193-201

Brandriff BF, Gordon LA, Ashworth L, Watchmaker G, Moore II D, Wyrobek AJ, Carrano AV (1985) Chromosomes of human sperm: variability among normal individuals. *Human Genetics* 70: 18-24

Brandriff BF, Gordon LA, Moore II DH, Carrano AV (1988) An analysis of structural aberrations in human sperm chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 47: 29-36

Buonomo SB, Clyne RK, Fuchs J, Loidl J, Uhlmann F, Nasmyth K (2000) Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* 103: 387-398

## **C**

---

Carrell D, Emery BR, Liu K (1999) Characterization of aneuploidy rates, protamine levels, ultrastructure, and functional ability of round-headed sperm from two siblings and implications for intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 71: 511-516

Chandley AC (1984) Infertility and chromosome abnormalities. *Oxford Rev Reprod Biol* 6: 1-46

Chandley AC, Goetz P, Hargreave TB, Joseph AM, Speed RM (1984) On the nature and extent of XY pairing at meiotic prophase in man. *Cytogenetics and Cell Genetics* 38: 241-247

Chandley AC, Seuanez H, Fletcher J (1976) Meiotic behaviour of five human translocation carriers. *Cytogenetics and Cell Genetics* 17: 98-111

Chernos J, Martin RH (1989) A cytogenetic investigation of the effects of cryopreservation on human sperm. *American Journal of Human Genetics* 45: 766-777

Cifuentes P, Navarro J, Blanco J, Vidal F, Míguez L, Egozcue J, Benet J (1999) Cytogenetic analysis of sperm chromosomes and sperm nuclei in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) by in situ hybridisation. *European Journal of Human Genetics* 7: 231-8

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

Colls P, Templado C, Martínez-Pasarell O, Darroudi F, Natarajan AT (1997) Sequential G-banding FISH on human sperm chromosomes. *Chromosome Research* 5: 457-461

## **D**

---

De Braekeleer M, Dao TN (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Human Reproduction* 2: 245-250

**E**

- Egozcue J, Blanco J, Vidal F (1997) Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Human Reproduction Update* 3: 441-452
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J (2000) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Human Reproduction Update* 6: 93-105
- Eijpe M, Heyting C, Gross B, Jessberger R (2000) Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *Journal of Cell Science* 113: 673-682
- Estop AM, Cieply K, Aston CE (1997) The meiotic segregation pattern of a reciprocal translocation  $t(10;12)(q26.2;p13.3)$  by fluorescence *in situ* hybridization sperm analysis. *European Journal of Histochemistry* 5: 78-82
- Estop AM, Cieply K, Munné S, Feingold E (1999) Multicolor fluorescence *in situ* hybridization analysis of the spermatozoa of a male heterozygous for a reciprocal translocation  $t(11;22)(q23;q11)$ . *Human Genetics* 104: 412-417
- Estop AM, Cieply K, Munné S, Surti U, Wakim A, Feingold E (2000) Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? Sperm FISH studies. *Human Genetics* 106: 517-524
- Estop AM, Cieply K, Vankirk V, Munné S, Garvek K (1991) Cytogenetic studies in human sperm. *Human Genetics* 87: 447-451

- Estop AM, Cieply K, Wakim A, Feingold E (1998a) Meiotic products of two reciprocal translocations studied by multicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* 83: 193-198
- Estop AM, Márquez C, Munné S, Navarro J, Cieply K, Van Kirk V, Martorell MR, Benet J, Templado C (1995a) An analysis of human sperm chromosome break-points. *American Journal of Human Genetics* 56: 452-460
- Estop AM, Munné S, Cieply K, Vandermark KK, Lamb AN, Fisch H (1998b) Meiotic products of a Klinefelter 47,XXY males as determined by sperm fluorescence *in situ* hybridization analysis. *Human Reproduction* 13: 124-127
- Estop AM, Van Kirk V, Cieply K (1995b) 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: 80-87
- Evans EP, G B, E FC (1964) An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* 3: 289-294

## **F**

---

- Faraut T, Mermet MA, Demongeot J, Cohen O (2000) Cooperation of selection and meiotic mechanisms in the production of imbalances in reciprocal translocations. *Cytogenetics and Cell Genetics* 88: 15-21
- Froenicke L, Anderson LK, Wienberg J, Ashley T (2002) Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting. *American Journal of Human Genetics* 71: 1358-1368



**G**

---

- Garcia M, Dietrich AJJ, Freixa L, Vink ACG, Ponsà M, Egozcue J (1987) Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light and electron microscopy. *Human Genetics* 77: 223-232
- Geneix A, Schubert B, Force A, Rodet K, Briançon G, Boucher D (2002) Sperm analysis by FISH in a case of t(17;22)(q11;q12) balanced translocation. *Human Reproduction* 17: 325-331
- Goldman ASH, Hultén MA (1992) 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
- Goldman ASH, Hultén MA (1993a) Analysis of chiasma frequency and first meiotic segregation in a human male reciprocal translocation heterozygote, t(1;11)(p36.3;q13.1) using fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* 63: 16-23
- Goldman ASH, Hultén MA (1993b) 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
- Goldman ASH, Martin RH, Johannisson R, Gould CP, Davison EV, Emslie JE, Burn J, Hultén MA (1992) Meiotic and sperm chromosome analysis in a male carrier of an inverted insertion (3;10)(q13.2;p14p13). *Journal of Medical Genetics* 29: 460-464

Guttenbach M, Engel W, Schmid M (1997) Analysis of structural chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosomes aberrations. A review. *Human Genetics* 100: 1-21

## **H**

---

Harkonen K, Viitanen T, Larsen S, Bonde J, Lahdetie J (1999) Aneuploidy in sperm and exposure to fungicides and lifestyle factors. ASCLEPIOS. A European concerned action on occupational hazards to male reproductive capability. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34: 39-46

Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin DK, Merrill M, Millie EA, Saker D, Shen J, Zaragoza M (1996) Human aneuploidy: incidence, origin and etiology. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 28: 167-175

Hassold T, Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Review Genetics* 2: 280-291

Hassold T, Sherman S, Hunt P (2000) Counting cross-overs: characterizing meiotic recombination in mammals. *Human Molecular Genetics* 9: 2409-19

Holmes JM, Martin RH (1993) Aneuploidy detection in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization. *Human Genetics* 91: 20-24

Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Honda N, Hara T, Ohama K (1999) Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers, t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triple-color fluorescence in situ hybridization. *Human Genetics* 105: 428-436

Hultén MA (1974) Chiasma distribution at diakinesis in the normal human male. *Hereditas* 76: 55-78

Hultén MA, Solari AJ, Skakkebaek NE (1974) Abnormal synaptonemal complex in an oligo-chiasmatic man with spermatogenic arrest. *Hereditas* 78: 105-116

## **J**

---

Jacobs PA (1990) The role of chromosome abnormalities in reproductive failure. *Reprod Nutr Dev Suppl* 1: 63s-74s

Jacobs PA (1992) The chromosome complement of human gametes. In: SR M (ed) *Oxford review of reproductive biology*, vol 14. Oxford University Press, New York, pp 48-72

Jalbert P, Sèle B, Jalbert H (1980) Reciprocal translocations: a way to predict the model of imbalanced segregation by pachytene diagram drawing. *Human Genetics* 55: 209-222

Jenderny J, Jacobi ML, Rüger A, Röhrborn G (1992) Chromosome aberrations in 450 sperm complements from eight controls and a lack of increase after chemotherapy in two patients. *Human Genetics* 10: 151-154

Jenderny J, Röhrborn G (1987) Chromosome analysis of human sperm. I. First results with a modified method. *Human Genetics* 76: 385-388

## **K**

---

Kamiguchi Y, Mikamo K (1986) An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. *American Journal of Human Genetics* 38: 724-740

Klein FP, Mahr P, Galova M, Buonomo SB, Michaelis C, Nairz K, Nasmyth K (1999) A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* 98: 91-103

Koehler KE, Cherry JP, Lynn A, Hunt P, Hassold T (2002) Genetic control of mammalian meiotic recombination. I. Variation in exchange frequencies among males from inbred mouse strains. *Genetics* 162: 297-306

## **L**

---

Lammers JHM, Offenbergh HH, van Aalderen M, Vink ACG, Dietrich AJJ, Heyting C (1994) The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to the X-linked lymphocyte-regulated genes. *Molecular Cell Biology* 14: 1137-1146

Laurie DA, Hultén MA (1985) Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Annual of Human Genetics* 49: 189-201

Laurie DA, Palmer RW, Hultén MA (1984) Studies on chiasma frequency and distribution in two fertile men carrying reciprocal translocations: one with a t(9;10) karyotype and one with a t(Y;10) karyotype. *Human Genetics* 68: 235-247

Lejeune J (1963) Autosomal disorders. *Pediatrics* 32: 326-337

Li P, Hoshiai H (1998) Detection of numerical chromosome abnormalities in human spermatozoa by three-color fluorescence in situ hybridization. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 24: 385-392

Liehr T, Claussen U (2002) Review: Multicolor-FISH approaches for the characterization of human chromosomes in clinical genetics and tumor cytogenetics. *Current Genomics* 3: 213-235

Liehr T, Nietzel A, Starke H, Heller A, Weise A, Mrasek K, Claussen U (2002) Characterization of small human marker chromosomes by centromere-

specific multicolor FISH (cenM-FISH) and high resolution multicolor banding (MCB). *Eca-newsletter* 10: 3-8

Lynn A, Koehler KE, Judis L, Chan ER, Cherry JP, Schwartz S, Seftel A, Hunt PA, Hassold TJ (2002) Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science* 296: 2222-2225

## **M**

---

Maratou K, Siddique Y, Kessling A, Davies G (1999) Novel methodology for the detection of chromosome 21-specific alpha-satellite DNA sequences. *Genomics* 57: 429-432

Martin RH (1984) Analysis of human sperm chromosome complements from a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Clinical Genetics* 25: 357-361

Martin RH (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: 48-51

Martin RH (1999) Sperm chromosome analysis in a man heterozygous for a paracentric inversion of chromosome 14(q24.1q32.1). *American Journal of Human Genetics* 64: 1480-1484

Martin RH, Balkan W, Burns K, Rademaker A, Linn CC, Rudd NL (1983) The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa. *Human Genetics* 63: 305-309

Martin RH, Ernst S, Rademaker A, Barclay L, Ko E, Summers N (1997) Chromosomal abnormalities in sperm from testicular cancer patients before and after chemotherapy. *Human Genetics* 99: 214-218

- Martin RH, Linn CC, Balkan W, Burns K (1982) Direct chromosomal analysis of human spermatozoa: preliminary results from 18 normal men. *American Journal of Human Genetics* 34: 459-468
- Martin RH, McInnes B, Rademaker A (1999) Analysis of aneuploidy for chromosomes 13, 21, X and Y by multicolour fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in a 47,XYY male. *Zygote* 7: 131-134
- Martin RH, Rademaker A (1990) The frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6821 human sperm chromosome complements. *Cytogenetics and Cell Genetics* 53: 103-107
- Martin RH, Rademaker A (1999) Non-disjunction in human sperm: comparison of frequencies in acrocentric chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 86: 43-45
- Martin RH, Rademaker A, Hildebrand K, Long-Simpson L, Peterson D, Yamamoto J (1987) Variation in the frequency and type of sperm chromosomal abnormalities among normal men. *Human Genetics* 77: 108-114
- Martínez-Pasarell O, Nogués C, Bosch M, Egozcue J, Templado C (1999) Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients. *Human Genetics* 104: 345-349
- Martini E, von Bergh A, Coonen E, de Die-Smulders C, Hopman A, Ramaekers F, Geraedts J (1998) Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3;11)(q27.3;q24.3) by triple FISH. *Human Genetics* 102: 157-165
- McInnes B, Rademaker A, Martin RH (1998) Donor age and the frequency of disomy for chromosomes 1, 13, 21 and structural abnormalities in human

spermatozoa using multicolour fluorescence in-situ hybridization. *Human Reproduction* 13: 2489-2494

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

Moses MJ (1956) Chromosome structures in crayfish spermatocytes. *Journal of Biophysics and Biochemical Cytologi* 2: 215-218

Mroz K, Hassold TJ, Hunt PA (1998) Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors. *Human Reproduction* 14: 1151-1156

## **N**

---

Navarro J, Benet J, Martorell MR, Templado C, Egozcue J (1993) Segregation analysis in a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 7 (p13;q36) by sperm chromosome studies. *American Journal of Human Genetics* 53: 214-219

Navarro J, Vidal F, Benet J, Templado C, Marina S, Egozcue J (1991) XY-trivalent association and synaptic anomalies in a male carrier of a Robertsonian t(13;14) translocation. *Human Reproduction* 6: 376-381

Navarro J, Vidal F, Guitart M, Egozcue J (1981) A method for the sequential study of synaptonemal complexes by light and electron microscopy. *Human Genetics* 59: 419-421

- Navarro J, Vidal F, Templado C, Benet J, Pomerol JM, Marina S, Egozcue J (1986) A new synaptic anomaly: irregular synaptonemal complexes. *Human Genetics* 72: 272-274
- Nietzel A, Heller A, Starke H, Liehr T (2002) Centromere-specific multicolor FISH (cenM-FISH). *FISH-Technology. Springer-labmanual*, Springer, Berlin, pp pp 425-431
- Nietzel A, Rocchi M, Starke H, Heller A, Fiedler W, Wlodarska I, Loncarevic IF, Beensen V, Claussen U, Liehr T (2001) A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Human Genetics* 108: 199-204
- Nishikawa N, Murakami I, Ikuta K, Suzumori K (2000) Sex chromosomal analysis of spermatozoa from infertile men using fluorescence in situ hybridization. *Journal of Assisted Reproduction Genetics* 17: 97-102

## **O**

---

- Ogawa S, Araki S, Araki Y, Ohno M, Sato I (2000) Chromosome analysis of human spermatozoa from an oligoasthenozoospermic carrier for a 13;14 Robertsonian translocation by their injection into mouse oocytes. *Human Reproduction* 15: 1136-1139
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Carrera M, Egozcue J, Benet J (2001) Meiotic segregation analysis in a t(4;8) carrier: comparison of FISH methods on sperm chromosome metaphases and interphase sperm nuclei. *European Journal of Human Genetics*: 395-403



**P**

---

- Padungtod C, Hassold T, Millie EA, Ryan LM, Savitz DA, Christiani DC, Xu X (1999) Sperm aneuploidy among Chinese pesticide factory workers: scoring by the FISH method. *American Journal Of Ind Medicine* 36: 230-238
- Pang M, Hoegerman S, Cuticchia A, Moon S, Doncel G, Acosta A, Kearns W (1999) Detection of aneuploidy for chromosomes 4,6,7,8,9,10,11,12,13,17,18,21,X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 14: 1266-1273
- Pellestor F (1991) Differential distribution of aneuploidy in human gametes according to their sex. *Human Reproduction* 6: 1252-1258
- Pellestor F, Girardet A, Coignet L, Andréo B, Lefort G, Charlieu JP (1997) Cytogenetic analysis of meiotic segregation in sperm from two males heterozygous for reciprocal translocations using PRINS and hamster techniques. *Cytogenetics and Cell Genetics* 78: 202-206
- Pellestor F, Imbert I, Andréo B, Lefort G (2001) Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization and primed in-situ labelling techniques. *Human Reproduction* 16: 1155-1164
- Pelttari J, Hoja M-R, Yuan L, Liu J-G, Brundell E, Moens PB, Santucci-Darmanin S, Jessberger R, Barbero JL, Heyting C, Höög C (2001) A meiotic chromosomal core consisting of cohesion complex recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Molecular and Cellular Biology* 21: 5667-5677

Petes TD (2001) Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nature Review Genetics* 2: 360-369

Petronczki M, Siomos MF, Nasmyth K (2003) Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112: 423-440

Plug AW, Peters AHF, Keegan KS, Hoekstra MF, de Boer P, Ashley T (1998) Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. *Journal of Cell Science* 111: 413-423

## Q

---

Quevedo C, del Cerro AL, Santos JL, Jones GH (1997) Correlated variation of chiasma frequency and synaptonemal complex length in *Locusta migratoria*. *Heredity* 78: 515-518

## R

---

Rickards G (1983) Orientation behaviour of chromosome multiples interchange (reciprocal translocation) heterozygotes. *Annual Review of Genetics* 17: 443-498

Rives N, Langlois G, Bordes A, Siméon N, Macé B (2002) Cytogenetic analysis of spermatozoa from males aged between 47 and 71 years. *Journal of Medical Genetics* 39: e63

Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Devillard F, Lespinasse J, Sèle B (1995) Meiotic segregation in males heterozygotes for reciprocal translocations: analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* 71: 240-246

Rousseaux S, Hazzouri M, Pelletier R, Monteil M, Usson Y, Sèle B (1998) Disomy rates for chromosomes 14 and 21 studied by fluorescent in-situ hybridization

in spermatozoa from three men over 60 years of age. *Molecular Human Reproduction* 4: 695-699

Rubes J, Lowe X, Moore II D, Perreault S, Slott V, Evenson D, Selevan SG, Wyrobek AJ (1998) Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. *Fertility and Sterility* 70: 715-723

Rudak R, Jacobs PA, Yanagimachi R (1978) Direct analysis of the chromosomes constitution of human spermatozoa. *Nature* 274: 911-913

## **S**

---

Schalk JAC, Dietrich AJJ, Vink ACG, Offenbergh HH, van Aalderen M, Heyting C (1998) Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Chromosoma* 107: 540-8

Senger G, Chudoba I, Plesch A (1998) Multicolor-FISH - the identification of chromosome aberrations by 24 colors. *Bioforum* 9: 499-503

Shi Q, Martin RH (2000) Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. *Cytogenetics and Cell Genetics* 90: 219-226

Shi Q, Martin RH (2001) Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction*: 655-666

Sloter ED, Lowe XR, Moore II DH, Nath J, Wyrobek AJ (2000) Multicolor FISH analysis of chromosomal breaks, duplications, deletions and numerical abnormalities in the sperm of healthy men. *American Journal of Human Genetics* 67: 862-872

- Soares SR, Vidal F, Bosch M, Martínez-Pasarell O, Nogués C, Egozcue J, Templado C (2001) Acrocentric chromosome disomy is increased in spermatozoa from fathers of Turner syndrome patients. *Human Genetics* 108: 499-503
- Solari AJ (1980) Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma* 81: 315-337
- Solari AJ (1998) Structural analysis of meiotic chromosomes and synaptonemal complexes in higher vertebrates. *Methods of Cell Biology* 53: 235-56
- Spriggs E, Martin RH (1994) Analysis of segregation in a human male reciprocal translocation carrier, t(1;11)(p36.3;q13.1), by two-colour fluorescence *in situ* hybridization. *Molecular Reproduction and Development* 38: 247-250
- Spriggs E, Martin RH, Hultén MA (1992) Sperm chromosome complements from two reciprocal translocation heterozygotes. *Human Genetics* 88: 447-452

## **T**

---

- Tease C, Hartshorne GM, Hultén MA (2002) Patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes. *American Journal of Human Genetics* 70: 1469-1479
- Templado C, Márquez C, Munné S, Colls P, Martorell MR, Ciepły K, Benet J, Van Kirk V, Navarro J, Estop AM (1996) An analysis of human sperm chromosome aneuploidy. *Cytogenetics and Cell Genetics* 74: 194-200
- Templado C, Navarro J, Requena R, Benet J, Ballesta F, Egozcue J (1990) Meiotic and sperm chromosome studies in a reciprocal translocation t(1;2)(q32;q36). *Human Genetics* 84: 159-162

**U**

---

Ushijima I C, Kumasako Y, Kihale PE, Hirotsuru K, Utsunomiya T (2000) Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence in-situ hybridization. *Human Reproduction* 15: 1107-1111

**V**

---

Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, Bonduelle M, Vandervorst M, Van Steirteghem A, Liebaers I (1999) Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence *in situ* hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Molecular Human Reproduction* 5: 682-690

Van Heemst D, Heyting C (2000) Sister chromatid cohesion and recombination in meiosis. *Chromosoma* 109: 10-26

Van Hummelen P, Lowe XR, Wyrobek AJ (1996) Simultaneous detection of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of healthy men by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Human Genetics* 98: 608-615

Van Hummelen P, Manchester D, Lowe X, Wyrobek AJ (1997) Meiotic segregation, recombination, and gamete aneuploidy assessed in a t(1;10)(p22.1;q22.3) reciprocal translocation carrier by three and four-probe multicolor FISH in sperm. *American Journal of Human Genetics* 61: 651-659

Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I, Van Steirteghem A (2000) Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in situ hybridization in infertile men. *Human Reproduction* 15: 351-365

- Vidal F, Moragas M, Català V, Torelló MJ, Santaló J, Calderón G, Jiménez C, Barri PN, Egozcue J, Veiga A (1993) Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in situ hybridization study. *Human Reproduction* 8: 1740-1743
- Vidal F, Navarro J, Templado C, Marina S, Egozcue J (1984) Development and behaviour of synaptonemal complexes in human spermatocytes by light and electron microscopy. *Human Genetics* 68: 142-147
- Vidal F, Templado C, Navarro J, Brusadin S, Marina S, Egozcue J (1982) Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males. *Human Genetics* 60: 301-304
- Von Eggeling F, Hoppe C, Bartz U, Starke H, Houge G, Claussen U, Ernst G, Kotzot D, Liehr T (2002) Maternal uniparental disomy 12 in a healthy girl with a 47,XX,+der(12)(:p11;q11:)/46,XX karyotype. *Journal of Medical Genetics* 39: 519-521

## **W**

---

- World Health Organization (1999) WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge
- Wyrobek AJ, Alhborn T, Balhorn R, Stanker L, Pinkel D (1990) Fluorescence in situ hybridization to Y chromosome in descondensed human sperm nuclei. *Molecular Reproduction and Development* 27: 200-208