

TESI DOCTORAL

# Anomalies cromosòmiques en l'espermatogènesi del pacient infèrtil

Zaida Sarrate Navas

JUNY 2010





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

# **Anomalies cromosòmiques en l'espermatogènesi del pacient infèrtil**

Memòria presentada per

**Zaida Sarrate Navas**

Per optar al **Grau de Doctor**  
per la **Universitat Autònoma de Barcelona**

Bellaterra, juny 2010

Directors:

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



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

**CERTIFIQUEN:**

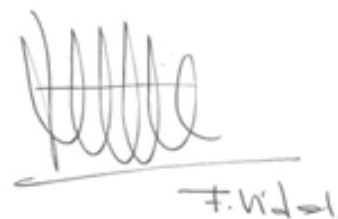
Que **Zaida Sarrate Navas** ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació titulat "**Anomalies cromosòmiques en l'espermatogènesi del pacient infèrtil**" per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

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

I per a que així consti, firmen el present certificat.



Dr. Joan Blanco Rodríguez



Dra. Francesca Vidal Domínguez

Bellaterra, 3 de maig de 2010



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

Generalitat de Catalunya 2001SGR-00202 / 2005SGR-00437

Ministerio de Ciencia y Tecnología (DGI) SAF2003-04312





Al meu pare,  
per ensenyar-me com d'important és trobar respostes.

A la meva mare,  
per ensenyar-me a somriure i a ser positiva.



Al David,  
per caminar al meu costat en aquest increïble passeig per la vida.



A la Mercè,  
per la seva inestimable ajuda.



Als meus germans,  
per ser com són.













# ÍNDEX

<b>1. Introducció.....</b>	<b>1</b>
1.1. Infertilitat masculina d'origen genètic.....	3
1.1.1. Anomalies cromosòmiques constitucionals.....	3
A. Numèriques.....	3
B. Estructurals.....	5
1.1.2. Anomalies gèniques.....	5
A. Gens del cromosoma Y.....	5
B. Gens del cromosoma X.....	5
C. Gens autosòmics.....	6
1.1.3. Anomalies confinades a la línia germinal.....	7
A. Procés meiótic.....	7
B. Punts de control de l'espermatogènesi.....	10
C. Tipus d'anomalies.....	12
1.2. Tècniques d'anàlisi citogenètica.....	13
1.2.1. Estudis meiótics.....	13
1.2.2. Estudis de FISH en espermatozoides.....	15
<b>2. Objectius.....</b>	<b>19</b>
<b>3. Material i mètodes.....</b>	<b>23</b>
3.1. Mostres biològiques.....	25
3.1.1. Mostres de teixit testicular.....	25
3.1.2. Mostres de semen.....	26
3.2. Protocols.....	27
3.2.1. Mostres de teixit testicular.....	27
A. Fixació cel·lular.....	28
B. Tinció uniforme.....	29
C. Valoració al microscopi òptic.....	29
D. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent múltiple ( <i>Multiplex-FISH</i> ).....	31
E. Valoració al microscopi de fluorescència.....	33
3.2.2. Mostres de semen.....	36
A. Fixació cel·lular.....	36
B. Descondensació de la cromatina espermàtica.....	37
C. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH).....	38
D. Valoració al microscopi de fluorescència.....	39

3.3. Anàlisi estadística.....	42
3.3.1. Mostres de teixit testicular: Recompte de quiasmes.....	42
A. Anàlisi de clústers.....	42
B. Modelitzacions segons clústers, cariotip i seminograma.....	42
3.3.2. Mostres de teixit testicular: Relació de proximitat al bivalent sexual...	44
A. Anàlisi de bivalents individuals.....	44
B. Anàlisi de grups de bivalents.....	44
3.3.3. Mostres de semen.....	45
A. Anàlisi individual.....	45
B. Anàlisi poblacional.....	45
C. Correlació entre anomalies cromosòmiques i paràmetres seminals.....	45
D. Correlació entre anomalies cromosòmiques i edat.....	45
<b>4. Resultats.....</b>	<b>47</b>
4.1. Estudis en biòpsia testicular.....	49
4.1.1. Anàlisi dels cromosomes a l'estadi de metafase I.....	49
A. Anàlisi de clústers.....	55
B. Modelització segons clústers.....	57
C. Modelitzacions segons cariotip i seminograma.....	58
D. Anàlisi d'integració de variables.....	59
4.1.2. Relació de proximitat al bivalent sexual.....	60
A. Anàlisi de bivalents individuals.....	60
B. Anàlisi de grups de bivalents.....	61
4.1.3. Anàlisi dels cromosomes a l'estadi de metafase II.....	62
4.2. Estudis de FISH en espermatozoides.....	67
A. Anàlisi individual.....	67
B. Anàlisi poblacional.....	69
<b>5. Discussió.....</b>	<b>73</b>
5.1. Metafase I.....	75
5.1.1. Anomalies observades.....	75
5.1.2. Característiques de les anomalies: variabilitat i cromosomes implicats	76
5.1.3. Relació amb variables descriptives.....	79
A. Seminograma.....	79
B. Cariotip.....	79
5.1.4. Relació de proximitat al bivalent sexual.....	80
5.2. Metafase II.....	81

5.3. Espermatòzoides.....	83
5.3.1. Característiques de les anomalies: cromosomes implicats.....	83
5.3.2. Relació amb variables descriptives.....	84
A. Seminograma.....	84
B. Cariotip.....	85
C. Cariotip meiótic.....	86
D. Edat.....	87
5.4. Directrius per a l'estudi clínic.....	87
5.4.1. Estudi meiótic.....	88
A. Indicació.....	88
B. Protocol d'estudi.....	88
C. Interpretació dels resultats.....	88
5.4.2. Estudi de FISH en espermatòzoides.....	89
A. Indicació.....	89
B. Protocol d'estudi.....	89
C. Interpretació dels resultats.....	89
<b>6. Conclusions.....</b>	<b>91</b>
<b>7. Annexes.....</b>	<b>97</b>
7.1. Articles d'investigació.....	99
7.1.1. Article 1: Identification of meiotic anomalies with multiplex fluorescence in situ hybridization: preliminary results.....	99
7.1.2. Article 2: FISH studies of chromosome abnormalities in germ cells and its relevance in reproductive counseling.....	107
7.1.3. Article 3: Fluorescence in situ hybridization (FISH) Protocol in Human Sperm.....	119
7.1.4. Article 4: Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance.....	123
7.2. Informe del Servei d'Estadística de la Universitat Autònoma de Barcelona.....	137
7.2.1. Anàlisi de clústers.....	141
A. Considerant tots els individus.....	141
B. Sense considerar l'individu 361.....	142
C. Anàlisi multivariant i caracterització dels grups.....	143
7.2.2. Anàlisi de quiasmes.....	145
A. Anàlisi segons clúster.....	146

B. Anàlisi segons cariotip.....	149
C. Anàlisi segons seminograma.....	151
D. Anàlisi d'integració de variables.....	154
7.2.3. Anàlisi de proximitat.....	157
A. Tots els bivalents.....	157
B. Bivalents agrupats.....	160
C. Anàlisi multivariant.....	162

**8. Bibliografia..... 167**





# 1. Introducció



## 1.1. Infertilitat masculina d'origen genètic

La infertilitat afecta aproximadament a un 15% de les parelles en edat reproductiva (De Kretser 1997). De forma genèrica, les causes associades a la infertilitat masculina són responsables del 30-50% dels casos (Ferlin et al 2007a) i s'agrupen en quatre blocs: endocrinopaties, anomalies gèniques, anomalies en la diferenciació/determinació sexual i anomalies en la producció/funció espermàtica (Maduro et al 2003). Així doncs, estem davant d'un trastorn complex en el que poden intervenir diferents factors, tant congènits com adquirits (Skakkebaek et al 1994, Poongothai et al 2009), i per tant, la seva etiologia sovint es fa difícil de concretar. L'origen genètic s'ha pogut identificar en un 15% dels casos (Ferlin et al 2007a), tot i que aquest percentatge probablement sigui major. De fet, la recent incorporació de tècniques d'anàlisi, com la genòmica, la proteòmica o la metabolòmica, està aportant noves dades sobre l'origen genètic de la infertilitat (revisat per O'Flynn O'Brien et al 2010).

### 1.1.1. Anomalies cromosòmiques constitucionals

Les anomalies cromosòmiques somàtiques expliquen entre un 2 i un 8% dels casos d'infertilitat masculina. Aquest percentatge s'incrementa fins a un 15% en la població d'individus azoospermics (Ferlin et al 2007a). Tot i que les anomalies numèriques dels cromosomes sexuals són les més freqüents, també presenten incidències significatives les variants i les anomalies cromosòmiques estructurals (Mau-Holzmann 2005). En general, la presència d'una línia cel·lular anormal es relaciona amb una reducció en la producció d'espermatozoides i amb percentatges variables de gàmetes desequilibrats que poden donar lloc a avortaments espontanis o a nadons amb cromosomopaties.

#### A. Numèriques

Els individus amb la Síndrome de Klinefelter es caracteritzen per presentar línies cel·lulars 47,XXY; ja sigui en forma pura, és a dir afectant a totes les cèl·lules dels portadors, o en forma de mosaic, amb la coexistència de línies cel·lulars 46,XY. Aquesta síndrome és l'aneuploidia dels cromosomes sexuals més freqüent en els individus que consulten per problemes de fertilitat (taula 1.1.). La incidència és superior en individus infèrtils (1,7%) que en la població general (0,1-0,2%), i arriba al 9-10% en individus azoospermics (Foresta et al 2005, Mau-Holzmann 2005).

Els pacients Klinefelter sovint presenten un bloqueig de l'espermatogènesi en els estadis inicials de la meiosi (Georgiou et al 2006), tot i que s'ha descrit que el 25% dels casos poden presentar un percentatge discret d'espermatozoides en el seu ejaculat (Ferlin et al 2007a).

La majoria d'individus Klinefelter mostren freqüències incrementades de disomies per als cromosomes sexuals en els espermatozoides (Sarrate et al 2005 (annex 7.1.2.), revisat a Sarrate et al 2008). Aquests valors oscil·len entre 0-25% en els individus aparentment no

mosaics, i entre 0-7% en individus 46,XY/47,XXY; essent les mitjanes d'un 6% i un 3% respectivament.

L'origen d'aquestes anomalies continua essent controvertit, mentre que els primers estudis suggerien que les cèl·lules 47,XXY podien iniciar el procés meiótic (Skakkebaek et al 1969, Vidal et al 1984), estudis posteriors varen demostrar la incapacitat meiótica d'aquestes cèl·lules (Mroz et al 1998, Blanco et al 2001). En aquests cas, es considera que tots els espermatozoides deriven de línies cel·lulars euploides 46,XY. La presència d'un microambient testicular anormal, probablement relacionat amb un increment de l'hormona fol·liculostimulant (FSH), afectaria la segregació cromosòmica d'aquestes cèl·lules (Mroz et al 1998).

Anomalies cromosòmiques constitucionals	Seminograma	Incidència (%)			
		Població general	Població infèrtil	Individus azoospermics	Individus oligozoospermics
<b>Numeriques</b>					
Síndrome de Klinefelter 47,XXY	Az, O severa	0,1-0,2	1,7	9-10	0,5-5
	Az-N	0,06-0,1	0,3	0,1	0,3
<b>Estructurals</b>					
Translocacions Robertsonianes	Az-N	0,09-0,1	0,8-0,9	0,09-0,2	1,5-1,6
Translocacions recíproques	Az-N	0,1	0,7	0,5	0,7
Inversions no polimòrfiques	Az-N	0,01-0,07	0,2	rarament	0,2-0,3

**Taula 1.1.** Anomalies cromosòmiques constitucionals més freqüents en poblacions d'individus infèrtils.

Az: Azoospermia, N: Normozoospermia, O: Oligozoospermia.

(de la Chapelle et al 1974, Kaiser 1984, De Braekeleer i Dao 1991, Mau-Holzmann 2005, Ferlin et al 2007a, Foresta et al 2005, Walsh et al 2009, O'Flynn O'Brien et al 2010)

Els individus amb un cariotip 47,XXY representen la segona aneuploidia més freqüent en pacients infèrtils (taula 1.1.), amb una incidència del 0,3%; que és entre 3 i 5 vegades superior a la descrita en la població general (Mau-Holzmann 2005). Els individus 47,XXY presenten seminogrames que van des de la normozoospermia fins a l'azoospermia (taula 1.1.). En la majoria d'aquests individus la fertilitat no es veu compromesa (Gardner i Sutherland 2004), però d'altres presenten un quadre sever d'anormalitat (Mau-Holzmann 2005).

Tot i que alguns estudis han proposat que un dels dos cromosomes Y es perd en els primers estadis de l'espermatogènesi (revisat per Rives et al 2003a), altres treballs evidencien la capacitat de les cèl·lules aneuploides per iniciar i completar la meiosi donant lloc a gàmetes disòmics (Speed et al 1991, Blanco et al 1997, 2001). La majoria dels individus amb un cariotip 47,XXY presenten freqüències incrementades d'espermatozoides amb aneuploidies dels cromosomes sexuals (Sarrate et al 2005 (annex 7.1.2.), revisat a Sarrate et al 2008).

## B. Estructurals

Les anomalies cromosòmiques estructurals més representades en humans són les translocacions Robertsonianes, les translocacions recíproques i les inversions. La presència de cromosomes reorganitzats modifica l'aparellament i la segregació dels cromosomes homòlegs durant la meiosi (Vidal et al 1982a, Saadallah i Hultén 1986, Guichaoua et al 1992, Siffroi et al 1997). Com a conseqüència, es produeixen espermatozoides portadors d'anomalies cromosòmiques i generalment té lloc una reducció del nombre de gàmetes en l'ejaculat (taula 1.1.).

En general, els individus portadors d'un mateix tipus de reorganització cromosòmica presenten un comportament meiòtic semblant i per tant els percentatges de gàmetes amb anomalies cromosòmiques són similars. En aquest sentit, estudis de segregació realitzats en individus amb translocacions Robertsonianes han descrit una freqüència mitjana d'espermatozoides desequilibrats del 16% (revisat Anton et al 2010). Aquest percentatge és del 55% en individus portadors de translocacions recíproques (revisat per Anton 2008a). Pel que fa a les inversions, la incidència oscil·la entre el 0 i el 38% depenent de la proporció del segment invertit en relació al cromosoma portador de la inversió (revisat per Anton et al 2005).

### 1.1.2. Anomalies gèniques

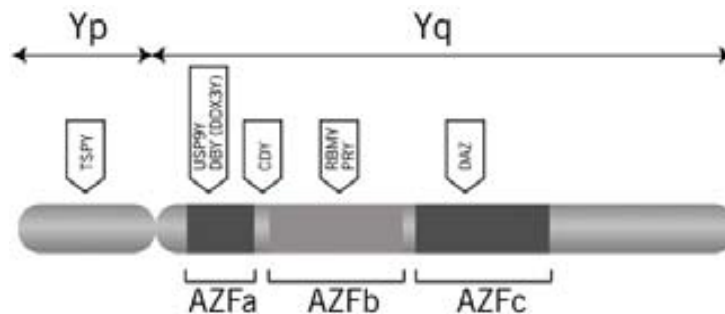
#### A. Gens del cromosoma Y

El cromosoma Y conté gens crítics per a la correcta progressió de l'espermatogènesi i el desenvolupament de les gònades masculines (revisat per O'Flynn O'Brien et al 2010). Delecions d'aquests gens són la causa principal d'azoospermia o d'oligozoospermia severa, amb una incidència d'un 3-15% i d'un 5-10%, respectivament (Foresta et al 2001, Dohle et al 2002, Walsh et al 2009). Aquestes delecions es donen majoritàriament en el braç llarg del cromosoma Y (Yq) (figura 1.1.), en concret en una regió coneguda amb el nom de AZF (factor d'azoospermia) que conté tres subregions: AZFa, AZFb i AZFc (Vogt 2005). La delecio més comú implica les subregions AZFb i la AZFc (Ferlin et al 2007b). Delecions completes de la regió AZFa es relacionen amb l'absència de cèl·lules germinals (Síndrome de *Sertoli cell-only*) (Vogt 2005, Nuti i Krausz 2008) i les delecions de la regió AZFb provoquen un bloqueig de l'espermatogènesi en els espermatoïcits primaris (Vogt 2005). Pel que fa a la regió AZFc, els fenotips són més variables (Navarro-Costa et al 2010), tot i que molts d'ells s'associen amb un baix recompte espermàtic a causa d'una espermatogènesi alterada (Vogt 2005).

#### B. Gens del cromosoma X

Alguns gens del cromosoma X s'expressen en el teixit testicular (Wang et al 2001) i estan relacionats amb l'espermatogènesi (Nuti i Krausz 2008, Stouffs et al 2009). Un d'aquests gens és el receptor d'andrògens (AR). El seu producte juga un paper important en la progressió meiòtica dels espermatoïcits i, probablement, en la formació de les espermàtides rodones (De Gendt et al

2004). Mutacions d'AR donen lloc a azoospermia (revisat per Walsh et al 2009), afectant al 2% de la població de pacients infèrtils (Ferlin et al 2006, revisat per O'Flynn O'Brien et al 2010).



Gen	Funció i relació amb la infertilitat masculina
TSPY	Regula l'entrada a meiosi dels espermatogonis; més nombre de còpies en pacients infèrtils.
USP9Y	Implicat en l'eficiència de l'espermatogènesi; delecions o mutacions poden provocar azoospermia, oligozoospermia, o oligoastenoospermia.
DBY	Implicat en el desenvolupament de cèl·lules germinals premeiòtiques.
CDY	Implicat en la substitució d'histones.
RBMY	Factor de <i>splicing</i> específic de testicle expressat a espermatogoni, espermatòcit i espermatida rodona; la seva expressió es troba reduïda en individus amb azoospermia.
PRY	Regulació de l'apoptosi.
DAZ	Regulació de traducció, control de la meiosi i manteniment de la població d'espermatogonis; codifica per proteïnes d'unió al RNA específiques de cèl·lules germinals; la seva expressió es troba reduïda en individus amb azoospermia; delecions parcials es relacionen amb oligozoospermia.

**Figura 1.1.** Esquema del cromosoma Y on s'han marcat les regions AZFa, AZFb i AZFc i alguns gens associats a infertilitat.  
(esquema modificat de O'Flynn O'Brien et al 2010)

### C. Gens autosòmics

S'han descrit alteracions de gens continguts en autosomes que afecten la fertilitat masculina (revisat per O'Flynn O'Brien et al 2010). Tot i que la llista és molt extensa, les mutacions més freqüents en individus que consulten problemes de fertilitat són les que afecten al gen regulador de la conductància transmembranal de la fibrosi quística (CFTR). Aquest gen, localitzat en el cromosoma 7 (Riordan et al 1989), es troba mutat en el 60-90% dels pacients amb absència bilateral congènita dels vasos deferents (McCallum et al 2001, Georgiou et al 2006, Ferlin et al 2007a). Aquesta alteració es relaciona amb una azoospermia obstructiva.

Altres síndromes o anomalies gèniques menys comunes, però que també s'associen a infertilitat, són la distròfia miotònica de tipus I, la síndrome de Noonan, la talassèmia, la síndrome de Young i la síndrome de Kallmann (revisat per Matzuk i Lamb 2008).

### 1.1.3. Anomalies confinades a la línia germinal

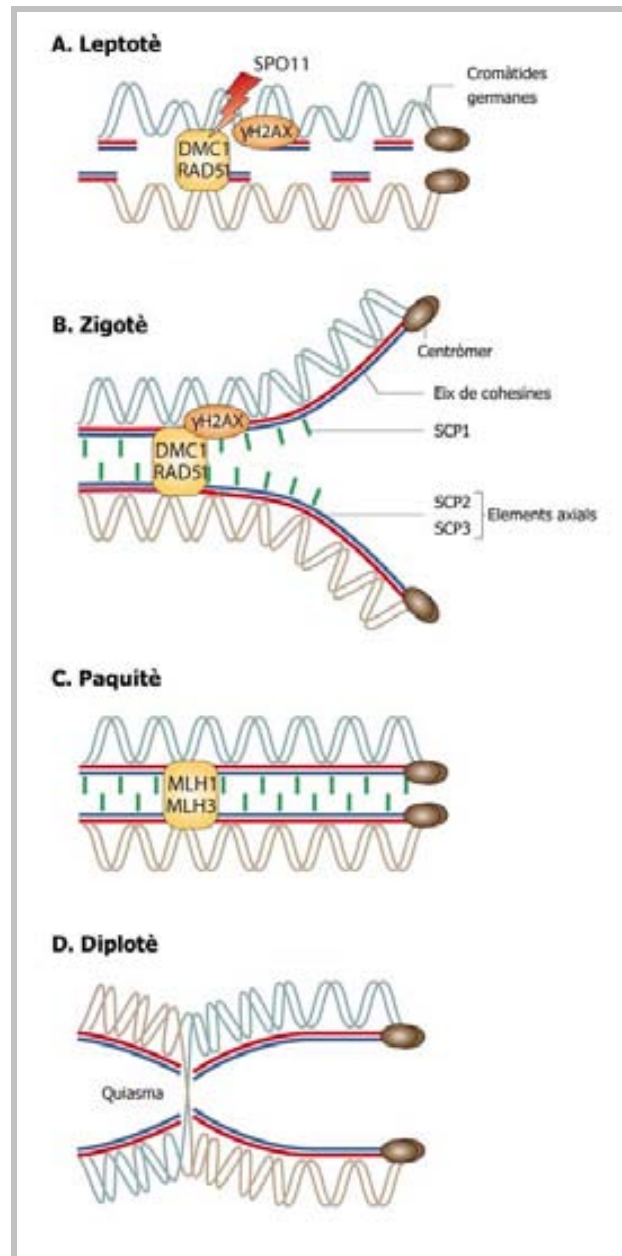
Un percentatge notable d'individus infèrtils amb cariotip somàtic normal i absència de delecions del cromosoma Y presenten anomalies cromosòmiques confinades a la línia germinal. Aquestes anomalies succeeixen en línies cel·lulars normals i s'identifiquen a mode de recombinacions meiótiques aberrants a primera divisió meiótica i/o en forma d'increments d'anomalies cromosòmiques numèriques en cèl·lules germinals/espermatozoides (revisat per Egozcue et al 2000a).

#### A. Procés meiótic

La meiosi és una part essencial de l'espermatogènesi, es troba altament conservada evolutivament i té com a finalitat la formació de gàmetes amb contingut genètic haploide. En aquest procés, la replicació del DNA va seguida de dues divisions cel·lulars consecutives que redueixen el nombre de cromosomes a la meitat. La primera divisió meiótica és reduccional i implica la segregació sintèlica dels cromosomes homòlegs, mentre que en la segona es produeix la segregació amfitèlica de cromàtides germanes. El procés meiótic garanteix la diploidia del zigot i la variabilitat genètica de l'espècie. Per a una revisió exhaustiva de la meiosi es poden consultar diverses publicacions (Keeney 2001, Gerton i Hawley 2005, Keeney i Neale 2006, Ding et al 2009, Longhese et al 2009, Simchen 2009, Handel i Schimenti 2010, Maiato i Lince-Faria 2010, Székvölgyi i Nicolas 2010).

L'estudi de la profase de la primera divisió meiótica ha despertat un interès especial ja que inclou processos d'una elevada complexitat: l'aparellament i sinapsi dels cromosomes homòlegs i la recombinació meiótica (revisat per Ding et al 2009, Székvölgyi i Nicolas 2010). Diversos treballs relacionen alteracions en aquesta etapa amb la generació d'anomalies numèriques en gàmetes (revisat per Egozcue et al 2000a). La profase I es subdivideix en quatre etapes: leptotè, zigotè, paquitè i diplotè.

Durant l'etapa de leptotè, les cohesines s'agreguen i es forma una estructura proteica al llarg de l'eix longitudinal del cromosoma. Aquesta estructura és essencial per a la formació i manteniment dels elements axials que posteriorment acabaran constituint el complex sinaptinomal (CS) (Klein et al 1999). La proteïna SPO11 indueix trencaments de doble cadena en el DNA (DSBs) (Keeney i Neale 2006) i s'inicia el procés de reparació: la histona H2AX és fosforilada ( $\gamma$ H2AX) i l'activitat exonucleasa del complex proteic MRN (MRE11/RAD50/NBS) deixa exposats extrems 3'-OH de les cadenes senzilles de DNA (ssDNA). Posteriorment, les proteïnes RAD51/DMC1 s'uneixen a les ssDNA i promouen la interacció amb seqüències del cromosoma homòleg creant associacions axials primerenques (figura 1.2.A., figura 1.3.).

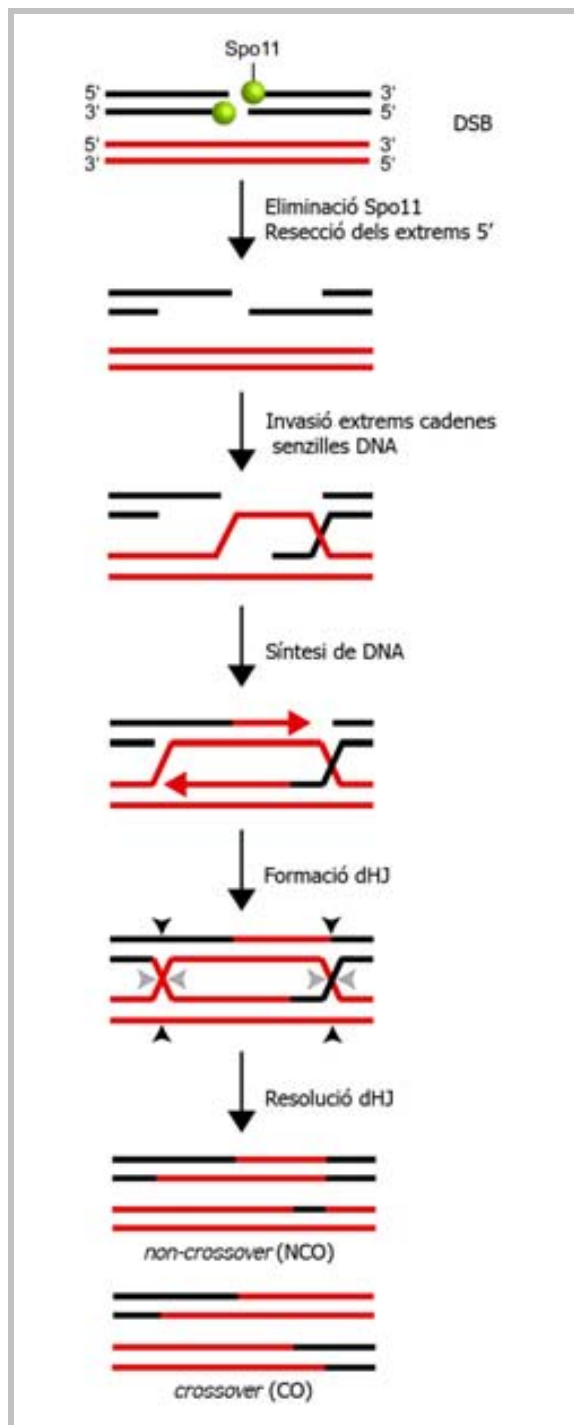


**Figura 1.2.** Esquema dels processos d'aparellament, sinapsi i recombinació entre cromosomes homòlegs que tenen lloc durant la profase I meiótica.  
(esquema modificat de Handel i Schimenti 2010)

Durant el zigotè, s'inicia la sinapsi que es caracteritza per una aposició íntima dels cromosomes regulada per la formació del complex sinaptonemal (figura 1.2.B.). En aquesta estructura, els elements axials constituïts per les proteïnes SCP2 (*Synaptonemal Complex Protein 2*) i SCP3 (*Synaptonemal Complex Protein 3*), esdevenen els elements laterals del CS, i al centre es construeix un eix format principalment per proteïnes SCP1 (*Synaptonemal Complex Protein 1*). En aquest estadi, la proteïna RPA (*replication protein A*) s'uneix en els llocs on hi ha RAD51/DMC1 i regula el metabolisme del DNA, participant en processos de replicació, reparació



i recombinació entre cromosomes homòlegs (Binz et al 2004). Durant aquest procés, les ssDNA envaeixen la doble hèlix del cromosoma homòleg (Hunter i Kleckner 2001) i es formen els nòduls de recombinació primerencs (figura 1.3.). Aquest procés implica la síntesi i la unió dels extrems lliures de les cadenes de DNA per formar les estructures conegudes amb el nom de dobles unions de Holliday (dHJs). Per a que posteriorment pugui actuar el sistema de reparació de *mismatch*, l'heterodímer proteic format per MSH4/MSH5 s'unirà a les dHJs (Snowden et al 2008).



**Figura 1.3.** Model de reparació del trencament de doble cadena (DSB) en la recombinació meiótica. (esquema modificat de Longhese et al 2009)

A l'etapa de paquitè, la sinapsi és completa i els complexos sinaptinemals estan totalment formats (figura 1.2.C.). Durant aquesta etapa es resolen les dHJs i finalitza el procés de reparació dels trencaments de DNA (figura 1.3.). La majoria de trencaments es repararan sense que es produeixi intercanvi de material genètic (*non-crossover*, NCO), i només en alguns punts hi actuarà el sistema de reparació de *mismatch* propiciant la recombinació entre cromàtides homòlogues (*crossover*, CO). Aquests punts esdevindran els nòduls de recombinació tardans. En el sistema de reparació de *mismatch* hi actuen proteïnes com la MLH3, que s'uneix als heterodímers de MSH4/MSH5, o la MLH1, que formarà heterodímer amb la MLH3. La majoria dels punts de recombinació es localitzen en regions determinades del DNA, anomenades *hot spots* (Arnheim et al 2007, Paigen i Petkov 2010).

L'etapa de diplotè es caracteritza per la desestructuració dels complexos sinaptinemals, la separació dels cromosomes homòlegs, i per la condensació de la cromatina. Durant el diplotè, les cromàtides germanes estan unides per les cohesines (Petronczki et al 2003) i els cromosomes homòlegs s'observen units pels quiasmes (figura 1.2.D.), que són el reflex dels llocs on s'ha produït intercanvi de material genètic.

Un cop finalitzada la profase de la primera divisió meiótica, les cèl·lules assolixen l'estadi de metafase I (MI). En aquesta fase els bivalents presenten una condensació màxima i es disposen a la regió equatorial de la cèl·lula. L'embolcall nuclear es desorganitza i s'estructura el fus. La presència de quiasmes entre cromosomes homòlegs manté la tensió entre ells i per tant ajuda a la correcta orientació dels bivalents a la placa metafàsica (Page i Hawley 2003).

Durant l'anafase I, els cromosomes homòlegs segreguen de forma sintèlica, mantenint les cromàtides germanes unides per cohesines pericentromèriques. Finalment, té lloc la telofase, etapa en la que s'agrupen els cromosomes que han segregat a cadascun dels pols i es produeix la divisió del citoplasma formant dues cèl·lules filles.

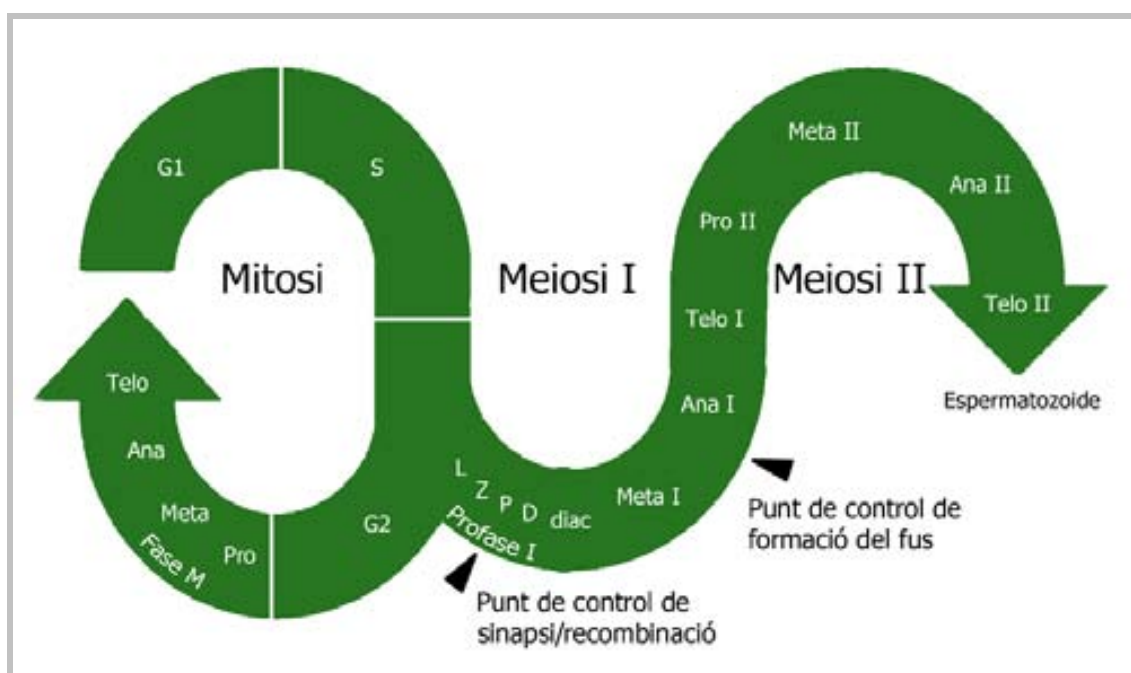
La segona divisió meiótica és anàloga a una divisió mitòtica, es perd la cohesió entre cromàtides germanes per permetre la disjunció cromosòmica i es formen cèl·lules haploides amb una cromàtide (Shintomi i Hirano 2010).

### B. Punts de control de l'espermatogènesi

La meiosi és un procés altament regulat en el que intervenen diferents mecanismes de control. La presència d'errors en alguna de les fases del procés, activa els mecanismes de reparació cel·lular. Si l'anomalia persisteix, la meiosi s'aturarà i es desencadenaran processos apoptòtics (revisat per Roeder i Baillies 2000). S'han descrit bàsicament dos punts de control meiótics (figura 1.4.).

El primer actua a l'etapa de paquitè, evitant que les cèl·lules superin aquesta fase si la sinapsi entre cromosomes homòlegs no és completa i/o si s'han produït anomalies en els processos de recombinació meiótica (Roeder 1997). Diferents estudis descriuen defectes en la recombinació i/o sinapsi dels cromosomes homòlegs relacionats amb una aturada de l'espermatogènesi en aquesta etapa (revisat per Li et al 2009).

En espermatòcits de mamífers, i de fet en la majoria dels organismes amb cromosomes sexuals heteromòrfics, les regions asinàptiques del bivalent sexual a l'estadi de paquitè activen un mecanisme conegut amb el nom de MSCI (*meiotic sex chromosome inactivation*). Aquest mecanisme desencadena la formació d'heterocromatina i, per tant, dona lloc al silenciament transcripcional de gens dels cromosomes sexuals (Turner 2007), amb la conseqüent formació de la vesícula sexual (VS). La resposta MSCI depen de la proteïna supressora de tumors BRCA1 que s'acumula a les regions asinàptiques dels cromosomes sexuals (Mahadevaiah et al 2008, Turner et al 2005) i recluta la proteïna quinasa ATR que fosforila la histona H2AX. El vincle entre aquesta histona i la formació de la VS és desconegut. Anomalies en l'activació de MSCI es relacionen amb processos apoptòtics en aquestes cèl·lules (Burgoyne et al 2009, Turner et al 2005). Recentment, s'ha proposat que MSCI és una manifestació específica d'un mecanisme general de silenciament que podria actuar també sobre cromosomes autosòmics asinàptics presents a l'estadi de paquitè, tant en la meiosi masculina com en la femenina, i que es coneix amb el nom de MSUC (*meiotic silencing of unsynapsed chromatin*) (Baarends et al 2005, Schimenti 2005, Turner et al 2005, Burgoyne et al 2009). Sembla doncs, que aquest mecanisme tindria un paper important en l'activació del punt de control a paquitè (revisat per Burgoyne et al 2009).



**Figura 1.4.** Punts de control de l'espermatogènesi. (esquema modificat de Morelli i Cohen 2005)

El segon punt de control regula el pas de metafase I a anafase I, i actua retenint les cèl·lules a l'estadi de metafase fins que tots els bivalents s'hagin orientat correctament en el fus (revisat per Vogt et al 2008). Aquest punt de control rep el nom específic de punt de control de formació del fus (*spindle assembly checkpoint*, SAC). La presència de cromosomes desalineats a la placa metafàsica o una estructuració defectuosa del fus, podria ser detectat com una descompensació de les forces de tensió que exerceixen els microtúbuls sobre els cromosomes i derivar amb l'activació d'aquest mecanisme de control. La regulació d'aquest punt de control depèn de les proteïnes MAD (*mitotic arrest deficient*) i BUB (*budding uninhibited by benzimidazole*) que actuen inactivant APC (*anaphase-promoting complex*) i per tant bloquejant la progressió de la meiosi. La transmissió de senyals d'aturada del cicle cel·lular es produeix gràcies a la intervenció de proteïnes quinases i motores (revisat per Vogt et al 2008).

### C. Tipus d'anomalies

Quan es produeixen alteracions en els processos d'aparellament, sinapsi, recombinació i/o segregació dels cromosomes i errades en els mecanismes de control, s'originen anomalies. Aquestes poden manifestar-se de dues maneres no excloents: recombinacions aberrants, enteses com un canvi en el nombre o en la localització dels quiasmes, o espermatozoides amb anomalies numèriques.

El 6-8% dels individus infèrtils de cariotip somàtic normal, presenten anomalies meiòtiques (Egozcue et al 1983a, De Braekeleer i Dao 1991, Egozcue et al 2005) i el percentatge és del 17,6% en pacients amb oligoastenozoospermia severa (Vendrell et al 1999). Per tal de descriure aquests comportaments meiòtics anòmals s'han emprat els termes d'asinapsi i de desinapsi. L'asinapsi es caracteritza per l'aparellament anormal dels bivalents des de l'inici de la profase amb absència de vesícula sexual, anomalies en els CS i una gran reducció del nombre de quiasmes a metafase I (Hultén et al 1970, Egozcue 1983b). En la desinapsi s'observa un aparellament aparentment normal dels bivalents a profase amb presència de vesícula sexual, però anomalies en els CS i un baix nombre de quiasmes a metafase I (Pearson et al 1970, Egozcue 1983b). Les anomalies sinàptiques poden afectar a un, a diversos o a la majoria dels bivalents, i observar-se bivalents asinàptics o bivalents parcialment asinàptics. Aquestes anomalies poden afectar a totes les cèl·lules analitzades o coexistir en diferents proporcions cèl·lules normals i cèl·lules amb anomalies (revisat per Egozcue et al 2005).

Els individus infèrtils de cariotip somàtic normal també poden presentar espermatozoides amb aneuploidies i/o diploidies. El percentatge d'individus amb increments és molt variable entre les sèries publicades (Rives et al 1999, Vegetti et al 2000, Calogero et al 2001, Martin et al 2003a). L'observació d'espermatozoides cromosòmicament anormals evidencia que els mecanismes de control que actuen durant la meiosi no són del tot eficients i algunes de les cèl·lules amb

anomalies poden arribar a superar els punts de control i produir gàmetes anormals. La poca eficiència dels mecanismes de control, podria explicar-se per errors en la identificació de les cèl·lules amb anomalies, per un mal funcionament del procés d'eliminació, o fins i tot, perquè el nombre de cèl·lules anormals fos massa gran per ser totalment eliminades pels sistemes de control.

Una conseqüència directe de l'actuació dels punts de control en el procés d'eliminació de les cèl·lules amb anomalies, és que el nombre de cèl·lules que finalitzen el procés espermatogènic és menor al que va iniciar-lo. Per això no és d'estranyar que molts dels individus infèrtils, sigui quina sigui l'etiologia de la seva infertilitat, sovint presentin azoospermia o oligozoospermia més o menys severa. La relació entre la presència d'anomalies sinàptiques i de recombinació, el bloqueig del procés espermatogènic i recomptes baixos d'espermatozoides, ha estat descrita per diferents autors (Hultén et al 1970, Navarro et al 1990, Vendrell et al 1999, Egozcue et al 2000a).

## 1.2. Tècniques d'anàlisi citogenètica

### 1.2.1. Estudis meiòtics





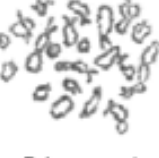


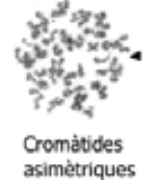

En l'àmbit de la recerca i en el del diagnòstic clínic, ha existit un interès lògic per conèixer la progressió de l'espermatogènesi en els individus amb problemes de fertilitat. S'han emprat diverses tècniques d'estudi sobre mostres de teixit testicular que han permès avaluar les anomalies meiòtiques en diferents fases del procés. Bàsicament s'han fet servir tècniques d'estudi dels CS i tècniques d'anàlisi dels cromosomes meiòtics (revisat per Egozcue et al 2005).

Els estudis dels CS amb tinció amb nitrat de plata (Solari 1980, Navarro et al 1981) van permetre caracteritzar algunes anomalies sinàptiques (Solari 1980, Vidal et al 1982b, Navarro et al 1986), i també avaluar la configuració dels cromosomes implicats en reorganitzacions cromosòmiques equilibrades (Templado et al 1984, Navarro et al 1991). Un avenç important en els estudis dels complexes va ser la incorporació de tècniques d'immunocitofluorescència. Aquestes tècniques permeten marcar específicament les proteïnes dels nòduls de recombinació tardans i les proteïnes dels CS (Barlow i Hultén 1996). Combinades amb protocols d'hibridació *in situ* fluorescent, fan possible la identificació individual de cada CS i per tant han ajudat a comprendre millor el procés sinàptic i les seves anomalies (Oliver-Bonet et al 2003, Codina-Pascual et al 2004, Sun et al 2004).

Els estudis dels cromosomes meiòtics utilitzant protocols citogenètics clàssics (Evans et al 1964) permeten analitzar les cèl·lules espermatogèniques en diferents fases del procés. Amb aquesta tècnica es poden valorar les aturades meiòtiques, en funció dels percentatges observats de cada una de les fases; la presència de la vesícula sexual a profase I, analitzar les figures meiòtiques

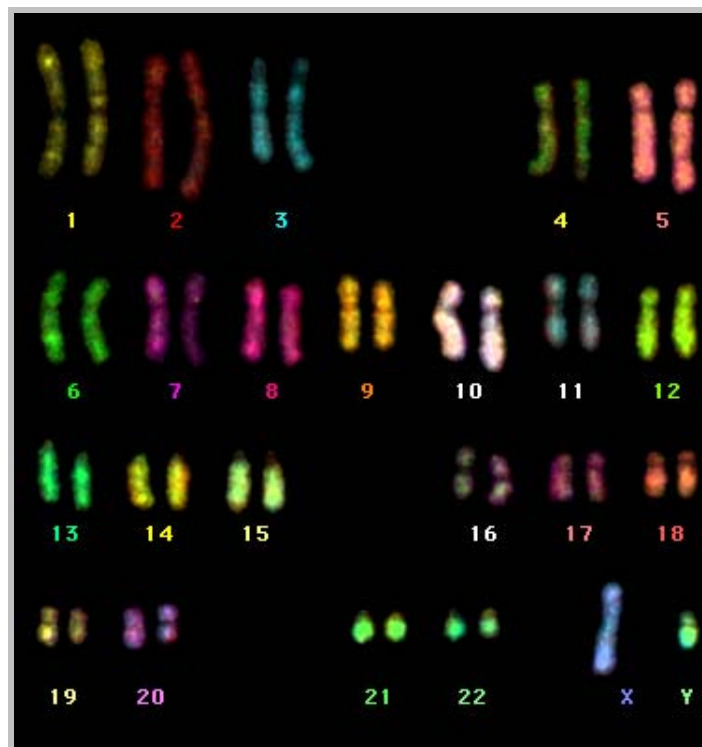
en l'etapa de diacinesi/metafase I i els cromosomes a metafase II (MII) (figura 1.5.). Tenint en compte que la morfologia característica dels bivalents ve determinada pel nombre de quiasmes, aquest tipus d'anàlisi s'ha utilitzat per descriure el nombre i la localització dels llocs de recombinació en els bivalents dels espermatòcits (Hultén et al 1970, Hultén et al 1974, Templado et al 1976, Laurie i Hultén 1985a, 1985b).

La tècnica és econòmica i metodològicament simple, i la seva incorporació en l'àmbit de l'estudi clínic s'ha utilitzat per diagnosticar pacients amb diferents anomalies meiótiques (Egozcue et al 1983a, 2000b). No obstant, la incorporació no ha estat generalitzada, probablement perquè les característiques de les mostres estudiades sovint es tradueix en limitacions en el seu estudi, ja sigui per l'escàs material del que es disposa, per les poques cèl·lules en divisió que s'observen o, en cas d'aturades parcials durant la profase I, les poques metafases I i II que es poden avaluar. A més a més, la morfologia dels cromosomes meiótics a metafase I dificulta la identificació dels bivalents desinàptics o asinàptics. Així doncs, en el millor dels casos, només es pot determinar el grup al qual pertany el bivalent, tot i que en alguns casos l'aplicació de bandes G i C (Templado 1981a) havia donat bons resultats. D'altra banda, la morfologia característica dels cromosomes a metafase II, fa molt difícil el recompte i la identificació dels cromosomes en aquesta fase.

	Normal	Anormal	
Paquitè			
Metafase I			
Metafase II			

**Figura 1.5.** Fases meiótiques obtingudes amb tècniques citogenètiques clàssiques.  
VS: vesícula sexual.

L'aplicació sobre cromosomes meiótics de tècniques d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH), tals com la M-FISH (Speicher et al 1996) o el *spectral karyotyping* (Schröck et al 1996) que permeten identificar tots els cromosomes simultàniament (figura 1.6.), hauria d'ajudar a superar les limitacions relacionades amb la identificació cromosòmica dels estudis meiótics amb tècniques citogenètiques clàssiques. La tècnica, fent possible l'anàlisi simultani de tots els cromosomes a metafase I i metafase II, hauria de permetre identificar els cromosomes implicats en comportaments meiótics anòmals. Amb això s'obriria la possibilitat d'estudiar la freqüència d'aquestes anomalies i sobretot si afecten reiterativament els mateixos cromosomes o, pel contrari, es produeixen a l'atzar. De fet, aquestes tècniques ja s'havien aplicat amb èxit en estudis citogenètics de neoplàsies (Teixeira 2002), per a l'estudi d'aneuploidies en oòcits (Sandalinas et al 2002) o per avaluar l'efecte de les radiacions com a inductores d'anomalies cromosòmiques (Cornforth 2001).



**Figura 1.6.** Cariotip d'una metafase somàtica on s'observen els 24 patrons de color diferent obtinguts mitjançant la tècnica de M-FISH.

### 1.2.2. Estudis de FISH en espermatozoides

La primera tècnica que va permetre avaluar la constitució cromosòmica dels espermatozoides aprofitava la capacitat de l'espermatozoide humà per penetrar oòcits de hámster sense zona pel·lúcida i permetia obtenir preparacions de cromosomes d'espermatozoide (Rudak et al 1978). Aquest mètode va ser estandarditzat per Martin et al (1982), no obstant, és una tècnica complexa i es va incorporar en pocs laboratoris com a eina d'estudi en l'àmbit clínic.

La utilització de sondes de DNA específiques, inicialment marcades amb components radioactius (Joseph et al 1984) o amb fluorocroms (Guttenbach i Schmid 1990, Pieters et al 1990), i molt especialment la combinació de varies sondes (Wyrobek et al 1994) va obrir la possibilitat d'estudiar la constitució cromosòmica d'un gran nombre d'espermatozoides mitjançant la FISH sobre nuclis interfàsics. La tècnica requereix un tractament previ de descondensació de la cromatina per fer-la més accessible a les sondes (Wyrobek et al 1990). Tot i que no és possible estudiar tots els cromosomes a l'hora, ja que el nombre de fluorocroms disponibles i les dimensions del nucli espermàtic no ho permeten, va representar un avenç notable en l'estudi de la dotació cromosòmica de l'espermatozoide (revisat per Egozcue et al 1997). De fet, va ser incorporada ràpida i àmpliament com a eina d'estudi del pacient amb problemes de fertilitat, i molt especialment en els candidats a tècniques de reproducció assistida (Egozcue et al 2003).

En aquest sentit, diversos autors han posat de manifest alteracions del seminograma (Nellella et al 2006) associades a increments d'anomalies cromosòmiques en els espermatozoides (Burrello et al 2005, Machev et al 2005a, Miharū 2005, Rives 2005, Sarrate et al 2005 (annex 7.1.2.)). Així doncs, el fenotip de l'individu infèril, ja sigui de cariotip somàtic normal o anormal, presenta, amb freqüència, un seminograma anormal i una major incidència d'aneuploidies en els seus espermatozoides, i per tant un risc incrementat de transmissió d'anomalies cromosòmiques a la descendència.

Des de fa alguns anys s'intenta establir en quin grup de pacients són rellevants els estudis de FISH en espermatozoides. Aquesta tasca es fa difícil ja que els treballs publicats mostren molta variabilitat, ja sigui pel nombre d'individus analitzats, pels criteris de classificació dels pacients, per les característiques de la població control emprada, pels criteris de valoració de les mostres, o fins i tot, per les comparacions estadístiques realitzades (Tempest i Griffin 2004a); fins al punt que s'ha arribat a qüestionar la seva validesa com a eina diagnòstica (Foresta et al 2002).

Un altre aspecte dels estudis de FISH en espermatozoides que també desperta interès en el camp del diagnòstic clínic, és la determinació del nombre de cromosomes a analitzar i establir els més indicats per garantir un consell reproductiu adequat. Fins al moment, els cromosomes més estudiats han estat els cromosomes X, Y 13, 18 i 21 ja que les aneuploidies més viables corresponen a aquests cromosomes (Gardner i Sutherland 2004). En els últims anys, un nombre considerable de centres han anat incorporant més cromosomes a l'estudi amb la idea de que amb més informació, major precisió en el diagnòstic. Tot això ha generat dubtes a l'hora de triar una estratègia d'anàlisi coherent i equilibrada en relació als paràmetres de temps, cost econòmic i resultats obtinguts.



En qualsevol cas, la gran majoria dels estudis coincideixen en descriure una clara i estreta relació entre aneuploidies i infertilitat masculina. A més a més, també coincideixen en que els increments significatius de les aneuploidies observades solen ser moderats. No obstant, la interpretació diagnòstica d'aquests increments i l'assessorament genètic posterior no sempre són coincidents.



## 2. Objectius



Per a la elaboració d'aquest treball es van plantejar els següent objectius:

### 1er

Optimitzar un protocol seqüencial d'identificació i anàlisi dels cromosomes meiótics d'espermatòcits humans a metafase I i a metafase II, utilitzant les tècniques de tinció uniforme i d'hibridació *in situ* fluorescent Múltiplex (M-FISH).

### 2n

Determinar la incidència d'anomalies cromosòmiques en els espermatòcits a metafase I i a metafase II d'una sèrie d'individus infèrtils.

### 3er

Anалitzar la proximitat dels bivalents autosòmics al bivalent sexual a metafase I.

### 4rt

Determinar la incidència d'anomalies cromosòmiques dels cromosomes X, Y, 13, 18 i 21 en els espermatozoides d'una sèrie d'individus infèrtils.

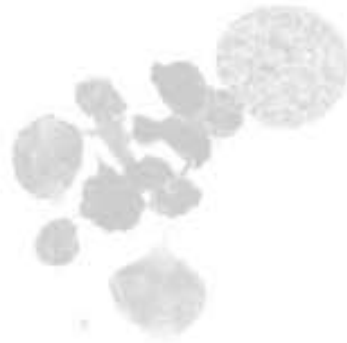
### 5è

Relacionar les anomalies cromosòmiques observades en els espermatòcits i en els espermatozoides amb el seminograma, el cariotip i l'edat dels individus.

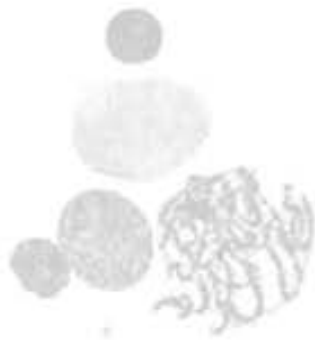
### 6è

Establir directrius per a la utilització dels estudis meiótics i dels estudis de FISH en espermatozoides en el context de l'estudi clínic del pacient infèril.





### 3. Material i mètodes







### 3.1. Mostres biològiques

Per a l'elaboració d'aquest treball es van analitzar mostres biològiques procedents de 362 individus. La valoració del procés meiótic es va realitzar en 37 mostres de teixit testicular i l'anàlisi dels espermatozoides es va dur a terme en 325 mostres de semen. En tots els casos els individus van ser informats dels protocols d'estudi a aplicar.

#### 3.1.1. Mostres de teixit testicular

Es van obtenir biòpsies de teixit testicular de 37 individus que havien consultat per problemes de fertilitat en diferents centres de reproducció assistida: Centre de Reproducció Assistida Fecunmed, Fundació Puigvert, Institut Marquès, Institut Universitari Dexeus i Instituto de Reproducción CEFER. Les mostres es van obtenir mitjançant intervenció quirúrgica amb anestèsia local i es van mantenir en una solució isotònica a 4°C fins al moment de la seva utilització. En cap cas van transcórrer més de 24 hores entre l'obtenció de la mostra i el seu processat. La mida de les biòpsies analitzades va ser de 4-5 mm<sup>3</sup>.

La taula 3.1 detalla, per a cadascun dels individus analitzats, el cariotip somàtic i la classificació seminal segons les característiques de recompte, motilitat i morfologia espermàtica.

Codi	Classificació	Codi	Classificació		
Pacient	Cariotip	Pacient	Cariotip		
	seminal*		seminal*		
072	46,XY	T	314	46,XY	N
118	46,XY	OA	315	46,XYqh+,inv9(p12q12)	Az
140	46,XY	AT	321	46,XY	N
142	46,XY	AT	323	46,XY	A
282	46,XY	AT	328	46,XY	OAT
284	46,XY	Az	331	46,XY	OAT
285	46,XY,14ps+,15ps+	Az	360	46,XY	OAT
287	46,XYqh+	N	361	46,XY	OAT
289	46,XY	A	392	46,XY	OAT
291	46,XY	AT	6837	46,XY	OAT
299	46,XY,inv9(p11q12)	N	6854	46,XY	OAT
300	46,XY	A	6858	46,XY	OAT
301	46,XY	A	6859	46,XY	OAT
302	46,XY	N	6866	46,XY	OAT
307	46,XY	A	6867	46,XY	OAT
308	46,XY	OAT	8345	46,XY	OAT
309	46,XY	OAT	8362	46,XY	OAT
310	46,XY	OA	8514	46,XY	OAT
312	No avaluat	Az			

**Taula 3.1.** Cariotip somàtic i classificació seminal dels pacients.

A: Astenozoospermia, AT: Astenoteratozoospermia, Az: Azoospermia, N: Normozoospermia, OA: Oligoastenozoospermia, OAT: Oligoastenoteratozoospermia, T: Teratozoospermia.

\*Classificació realitzada d'acord amb els criteris de la Organització Mundial de la Salut (World Health Organization 1999).

### 3.1.2. Mostres de semen

Es van analitzar un total de 325 mostres de semen obtingudes per masturbació i recollides en recipients estèrils de polietilè.

#### - Individus control:

La població control es va establir a partir de mostres de semen de 6 individus normozoospermics amb cariotip 46,XY. La mitjana d'edat d'aquest grup va ser de  $27,5 \pm 4,4$  anys (rang: 26-36 anys).

#### - Individus amb problemes de fertilitat:

Es van analitzar mostres de semen de 319 individus que consultaven per problemes de fertilitat. Les mostres provenien de sis centres de reproducció assistida: Fundació Puigvert, Institut Marquès, Institut Universitari Dexeus, Instituto Bernabeu, Instituto de Reproducción CEFER i Instituto Valenciano de Infertilidad. Aquest grup presentava una mitjana d'edat de  $35,4 \pm 5,0$  anys (rang: 21-53 anys).

Els individus estudiats es van classificar segons els paràmetres de recompte espermàtic, motilitat i morfologia, seguint els criteris de la Organització Mundial de la Salut (OMS) (World Health Organization 1999) (taula 3.2.).

L'historial clínic reproductiu dels pacients incloïa el cariotip somàtic en 266 pacients (taula 3.3.), el cariotip meiòtic en 113 (taula 3.4.) i es disposava dels dos resultats en 98 casos.

Classificació seminal	Nº de pacients (%)	Edat (anys)		
		Mitjana	DE	Rang
A	67 (21,0%)	36,2	5,1	27-49
AT	71 (22,3%)	36,3	5,9	27-53
N	34 (10,7%)	36,3	4,7	28-52
O	4 (1,3%)	34,5	1,9	33-37
OA	51 (16,0%)	35,4	4,0	28-48
OAT	62 (19,4%)	34,4	4,8	21-46
OT	13 (4,1%)	33,2	4,7	26-41
T	17 (5,2%)	36,4	5,3	30-52
<b>Total</b>	<b>319 (100%)</b>	<b>35,4</b>	<b>5,0</b>	<b>21-53</b>

**Taula 3.2.** Classificació dels pacients segons els paràmetres seminals.

A: Astenozoospermia, AT: Astenoteratozoospermia, N: Normozoospermia, O: Oligozoospermia, OA: Oligoastenozoospermia, OAT: Oligoastenoteratozoospermia, OT: Oligoteratozoospermia, T: Teratozoospermia.

Cariotip somàtic	Nº de pacients (%)	Edat (anys)		
		Mitjana	DE	Rang
Normal 46,XY	245 (92,1%)	35,6	5,0	21-52
Polimòrfic 46,XY,1qh+ 46,XY,inv9(p11q12) 46,XY,inv9(p11q12) 46,XY,inv9(p11q12) 46,XY,inv9(p11q12) 46,XY,inv9(p11q13) 46,XY,inv9(p11q12) 46,XY,inv9(p11q12) 46,XY,inv9(p11q12) 46,XY,inv9(p11q12) 46,XY,16qht 46,XY,22s+ 46,X,invY(p11.1q11.2)	13 (4,9%)	35,3	4,5	29-45
Anormal 46,XY,t(3;16)(p21;q13) 46,XY,t(5;19)(12;p13.3) 45,XY,der(13;14)(q10;q10) 45,XY,der(13;14)(q10;q10) 45,XY,der(13;14)(q10;q10) 46,X,invY(p11.1q11.23),inv4(p14p15.3) 47,XXY(50%)/46,XY(50%) 47,XY,mar+	8 (3,0%)	32,5	4,9	27-40
<b>Total</b>	<b>266 (100%)</b>	<b>35,5</b>	<b>5,0</b>	<b>21-52</b>

**Taula 3.3.** Classificació dels pacients segons el resultat del cariotip somàtic.

Estudi meiòtic	Nº de pacients (%)	Edat (anys)			
		Mitjana	DE	Rang	
Normal	36 (31,9%)	34,4	5,0	27-49	
Alterat	Desinapsi	55 (48,7%)	35,1	5,4	26-52
	Bloqueig	11 (9,7%)	35,9	5,1	29-44
	Desinapsi i bloqueig	2 (1,8%)	33,5	0,7	33,34
No informatiu	9 (7,9%)	34,8	4,3	27-42	
<b>Total</b>	<b>113 (100%)</b>	<b>34,9</b>	<b>5,1</b>	<b>26-52</b>	

**Taula 3.4.** Classificació dels pacients segons el resultat de l'estudi meiòtic.

## 3.2. Protocols

### 3.2.1. Mostres de teixit testicular

Per a la valoració dels espermatòcits primaris a metafase I i dels espermatòcits secundaris a metafase II es va desenvolupar un protocol d'anàlisi seqüencial que constava dels passos següents: A) fixació cel·lular, B) tinció uniforme dels cromosomes, C) valoració al microscopi òptic, D) hibridació *in situ* fluorescent múltiple (M-FISH) (Sarrate et al 2004 (annex 7.1.1.)) i E) valoració al microscopi de fluorescència.

### A. Fixació cel·lular

- Transferir el fragment de teixit testicular a un tub amb solució hipotònica (KCl 0,075M) escalfada a 37°C.

- Incubar el fragment de teixit a 37°C durant 15 minuts.

El tractament amb solució hipotònica afavorirà l'absorció d'aigua i augmentarà el volum cel·lular, facilitant la dispersió dels bivalents i dels cromosomes en el moment de fer les extensions.

- Transferir el fragment a un vidre de rellotge i disgregar-lo amb unes tisores de punta corba, tot alliberant les cèl·lules contingudes en els túbuls seminífers.
- Recuperar la suspensió cel·lular en un tub de centrifuga i aspirar i deixar anar la suspensió diverses vegades amb una pipeta Pasteur per alliberar el major nombre de cèl·lules.
- Deixar reposar durant 3 minuts perquè els agregats cel·lulars sedimentin i transferir el sobrenedant a un altre tub.
- Centrifugar a 400g durant 5 minuts a 4°C.

Les baixes temperatures redueixen l'activitat cel·lular preservant millor les cèl·lules.

- Descartar el sobrenedant per decantació.
- Resuspendre el botó amb fixador de Carnoy (metanol:àcid acètic en la proporció 3:1). Afegir-ne 8 ml, gota a gota i en agitació per tal d'evitar la formació d'agregats cel·lulars.

El fixador ajudarà a preservar l'augment de volum de les cèl·lules i contribuirà a la eliminació de lípids i a la desnaturalització de proteïnes, deixant la membrana de la cèl·lula fràgil. Aquest fet afavorirà la dispersió dels cromosomes en el moment de fer les extensions.

Per a que el fixador no perdi les seves propietats cal que aquest es prepari just abans de la seva utilització. El metanol s'evapora amb facilitat i això incrementaria l'acidesa de la solució. A més a més, caldrà guardar el fixador al congelador mentre no s'utilitzi ja que si es deixa a temperatura ambient, aquest absorbirà aigua i variarà el seu pH.

- Mantenir la suspensió cel·lular amb fixador durant 30 minuts a 4°C.
- Repetir els rentats amb Carnoy tantes vegades com sigui necessari, fins a obtenir el botó cel·lular totalment blanc.
- Resuspendre el botó obtingut afegint fixador gota a gota. Ajustar el volum final a la concentració adequada per a obtenir bones extensions cel·lulars.

La superposició cel·lular dificulta la valoració. Per contra, extensions amb el material massa dispers allarguen innecessàriament el procés d'estudi.

- Deixar caure una gota de la suspensió en un portaobjectes prèviament desengreixat.

Els portaobjectes es guarden en metanol a -20°C i s'eixuguen amb paper absorbent just abans de la seva utilització. Netejar els portaobjectes amb alcohols facilita la uniformitat de l'extensió, incrementa la qualitat de les metafases obtingudes i també la qualitat de la tinció posterior.

- Verificar la correcta dispersió del material cel·lular avaluant les extensions al microscopi invertit de contrast de fases.
- El material fixat sobrant i les extensions obtingudes s'emmagatzemen a -20°C fins al moment de la seva utilització.

### B. Tinció uniforme

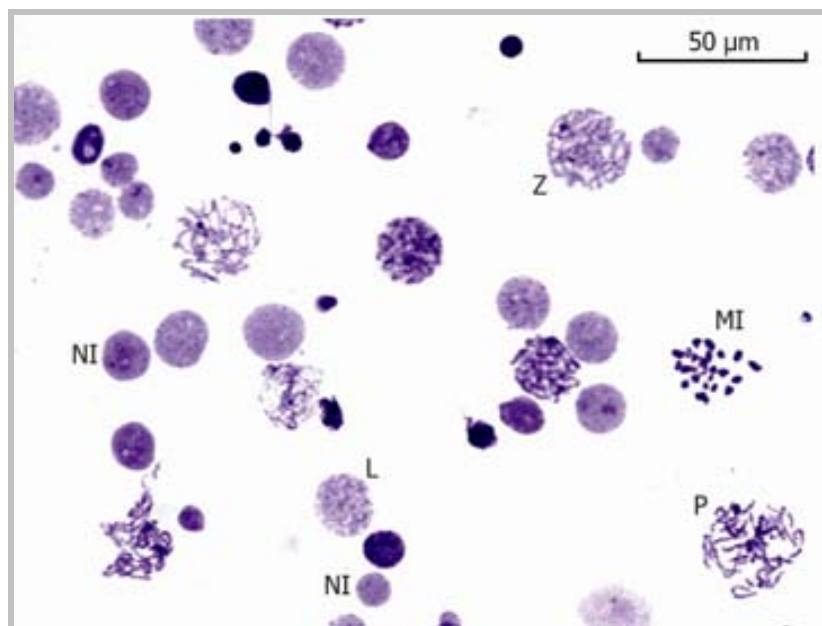
- Deixar el portaobjectes a temperatura ambient fins a la seva descongelació.
- Cobrir la regió on hi ha el material cel·lular durant 8-10 minuts amb colorant de Leishman diluït al 20% amb una solució tampó preparada segons Weise a pH: 6,8.

Aquest colorant combina el blau de metilè amb l'eosina, i la seva utilització dóna lloc a la tinció homogènia dels nuclis interfàsics i de les fases meiótiques.

- Rentar amb aigua per eliminar les restes de colorant.
- Eixugar suaument el portaobjectes amb paper de filtre.

### C. Valoració al microscopi òptic

- Rastrear el portaobjectes utilitzant un microscopi òptic de camp clar equipat amb un sistema de captura i anàlisi d'imatges. En aquest estudi es va utilitzar un microscopi Olympus BX-60 (Olympus Optical España, S.A.) equipat amb el sistema de captura i anàlisi d'imatges CytoVysion 3.6 (Applied Imaging, Newcastle, UK) (figura 3.1.).



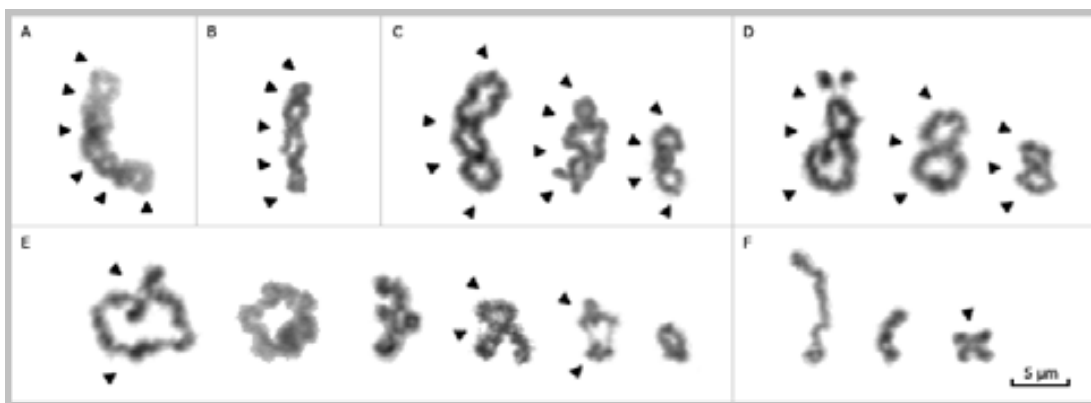
**Figura 3.1.** Imatge d'una preparació meiótica teñida amb colorant de Leishman. NI: nucli interfàsic d'una cèl·lula germinal, L: leptotè, Z: zigotè, P: paquitè, MI: metafase I.

- Capturar imatges utilitzant l'objectiu d'immersió de 100 augments i anotar les coordenades dels espermatòcits primaris a metafase I i dels espermatòcits secundaris a metafase II.

- Avaluar detalladament el nombre i la morfologia dels bivalents (metafase I) i dels cromosomes (metafase II) amb l'ajuda del sistema d'anàlisi d'imatges (CytoVysion 3.6; Applied Imaging, Newcastle, UK).

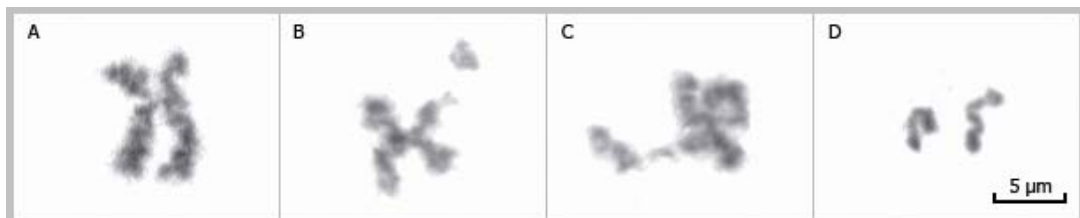
Criteris d'anàlisi:

- Metafase I:
  - Anotar el nombre d'unitats cromosòmiques observades.
  - Determinar el nombre de quiasmes per cadascun dels bivalents a partir de l'estudi de la seva morfologia (figura 3.2.). L'absència de quiasmes dona lloc a l'observació d'univalents.



**Figura 3.2.** Bivalents amb diferent nombre de quiasmes (marcats amb la punta de fletxa). (A) Sis quiasmes (B) Cinc quiasmes (C) Quatre quiasmes (D) Tres quiasmes (E) Dos quiasmes (F) Un quiasma.

- Metafase II:
  - Anotar el nombre d'unitats cromosòmiques observades.
  - Valorar la forma de les unitats cromosòmiques i classificar-les segons: forma normal, trencaments de cromàtide, cromàtides asimètriques o cromàtides separades (figura 3.3.).



**Figura 3.3.** Cromosomes a metafase II amb diferents morfologies. (A) Normal (B) Trencament de cromàtide (C) Cromàtides asimètriques (D) Cromàtides separades.

- Marcar amb un llapis de diamant la regió del portaobjectes on es localitzen les metafases per acotar la regió a hibridar.

- Eliminar immediatament les restes d'oli d'immersió submergint el portaobjectes durant 1 minut en Xilol.

Si queden restes d'oli els resultats de la FISH posterior no seran els òptims.

- Destenyir el portaobjectes submergint-lo en una sèrie de solucions d'etanol en aigua destil·lada (70%, 80% i 90%) durant 1 minut en cadascuna. Primer en sentit creixent i després en sentit decreixent acabant amb un últim rentat, també d'un minut, en aigua destil·lada.
- Deixar assecar el portaobjectes a temperatura ambient.
- El portaobjectes es pot tornar a guardar a -20°C fins al moment de ser utilitzat.

#### D. Hibridació *in situ* fluorescent múltiple (Múltiplex-FISH)

- Deixar el portaobjectes a temperatura ambient fins a la seva descongelació.
- Afegir solució enzimàtica de Ribonucleasa A (RNasa A), preparada seguint les indicacions de la casa comercial (Spectra Vysion™ Assay Protocol, Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA), a la regió del portaobjectes on hi ha el material cel·lular. Tapar amb un cobreobjectes de plàstic i incubar en una cambra humida a 37°C durant 30 minuts.

La RNasa A és una endoribonucleasa que catalitza la hidròlisi de l'àcid ribonucleic (RNA). El tractament amb aquest enzim ajudarà a reduir els senyals inespecífics que podrien dificultar la valoració al final del protocol de M-FISH.

- Retirar el cobreobjectes i fer dos rentats en una solució de 2 x *saline sodium citrate* (2xSSC) durant 5 minuts cada un.
- Incubar el portaobjectes durant 5 minuts en una solució de pepsina preparada seguint les indicacions de la casa comercial (Spectra Vysion™ Assay Protocol, Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA), pre-escalfada a 37°C.

El tractament amb aquesta proteasa millora l'accessibilitat als cromosomes.

- Rentar dues vegades en una solució de 2xSSC durant 5 minuts cada un.
- Fixar el material en una solució de formaldehid preparada seguint les indicacions de la casa comercial (Spectra Vysion™ Assay Protocol, Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) durant 2 minuts i a temperatura ambient.

Per a què el fixador no perdi les seves propietats cal que aquest es prepari just abans de la seva utilització.

- Rentar dues vegades en una solució de 2xSSC durant 5 minuts cada un.
- Deixar assecar el portaobjectes a temperatura ambient.
- Incubar la preparació en una solució de desnaturalització (70% formamida/2xSSC) durant 2 minuts a 72°C.

La formamida és un agent desnaturalitzant que permet disminuir la temperatura de desnaturalització a 72°C. Aquesta reducció de la temperatura ajuda a preservar millor la morfologia cromosòmica.

- Deshidratar el portaobjectes utilitzant una sèrie de solucions d'etanol en aigua destil·lada (70%, 85% i 100%) durant 1 minut en cadascuna d'elles
- Deixar assecar el portaobjectes a temperatura ambient.
- Desnaturalitzar la sonda Spectra Vysion™ (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) en un tub Eppendorf al bany a 72°C durant 5 minuts.

Aquesta sonda utilitza una combinació de 52 cadenes senzilles de DNA, complementàries a seqüències diana del DNA dels cromosomes humans, que estan marcades amb 5 fluorocroms diferents (SpectrumAqua®, SpectrumFRed®, SpectrumGold®, SpectrumGreen®, SpectrumRed®) (taula. 3.5.). La utilització d'un sistema de captura i anàlisi d'imatges permet observar cadascun dels cromosomes d'un color diferent, i per tant, identificar simultàniament els 24 cromosomes del cariotip.

La desnaturalització de la sonda és possible gràcies a l'acció de la formamida inclosa en la solució tampó on estan diluïdes les sondes i a l'efecte de la temperatura (72°C).

- Afegir la sonda a la regió del portaobjectes a hibridar, tapar amb un cobreobjectes de vidre i segellar amb cola.
- Incubar les preparacions en una cambra humida a 37°C durant 16-18 hores per tal de que les sondes hibridin sobre les regions específiques del DNA de la mostra.

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

**Taula 3.5.** Combinació de fluorocroms que marquen cadascun dels 24 cromosomes humans (Spectra Vysion™, Vysis Inc. Downers Grove, IL, USA).



- Treure el cobreobjectes desplaçant-lo lateralment.
- Rentar la preparació amb una solució salina 0,4xSSC/0,3% *nonyl phenoxy/polyethoxylethanol* (NP-40) escalfada a 73°C durant 2 minuts.
- Transferir el portaobjectes a la solució de rentat 2xSSC/0,1%NP-40 a temperatura ambient durant 1 minut.

Els dos rentats amb SSC i NP40 ajuden a eliminar les sondes no hibridades o les que ho hagin fet inespecíficament.

- Deixar assecar el portaobjectes a temperatura ambient.
- Tenyir els nuclis interfàsics i de les fases meiòtiques amb una solució de *4',6-diamidino-2-phenylindole II* (DAPI II) i *Antifade* en la proporció 1:1 (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) i tapar amb un cobreobjectes de vidre.

El DAPI és un fluorocrom que s'uneix a la cromatina i permet visualitzar-la de color blau mitjançant un microscopi de fluorescència. L'*Antifade* evita la pèrdua d'intensitat del senyal fluorescent.

- Segellar el cobreobjectes amb esmalt d'ungles.
- Guardar els portaobjectes, preservats de la llum a -20°C, fins al moment de la seva valoració.

#### E. Valoració al microscopi de fluorescència

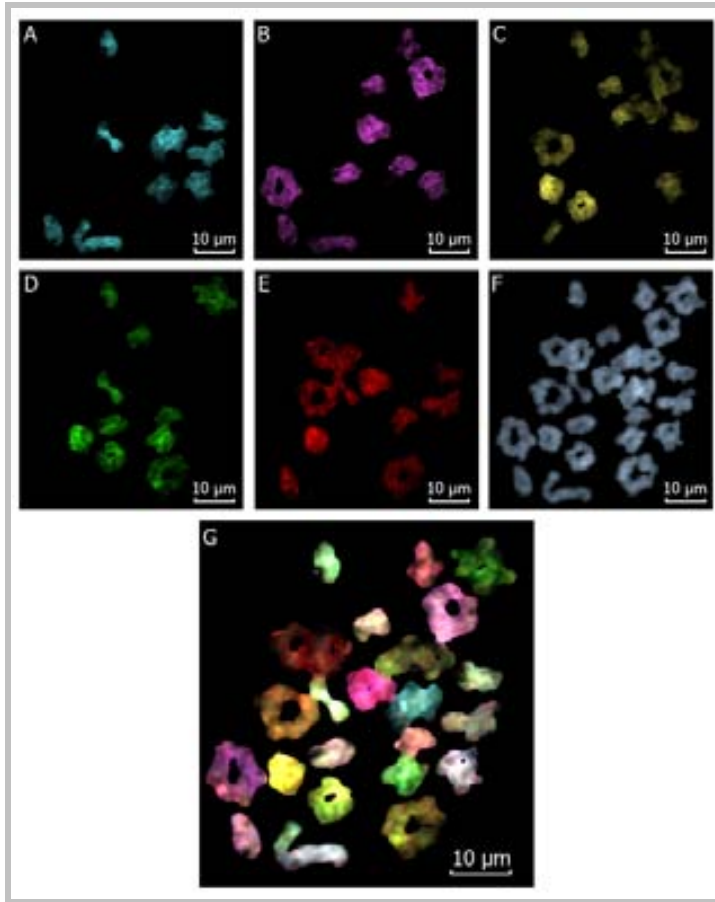
- Relocalitzar les metafases I i metafases II utilitzant un microscopi de fluorescència equipat amb un sistema de captura i anàlisi d'imatges. En aquest estudi es va utilitzar un microscopi Olympus BX-60 (Olympus Optical España, S.A.) equipat amb el sistema de captura i anàlisi d'imatges CytoVysion 3.6 (Applied Imaging, Newcastle, UK).
- Capturar sis imatges de cada metafase, una per cadascun dels fluorocroms utilitzats, mitjançant sis filtres de banda única.

Cada fluorocrom és excitat amb una llum d'una longitud d'ona determinada per emetre llum a una longitud d'ona superior (taula 3.6.). Els filtres de banda única permeten el pas de la llum d'excitació i d'emissió de forma específica per a cada fluorocrom.

Fluorocrom	Pic d'excitació (nm)	Pic d'emissió (nm)
SpectrumAqua	433	480
SpectrumFRed	655	675
SpectrumGold	530	555
SpectrumGreen	497	524
SpectrumRed	592	612
DAPI	367	452

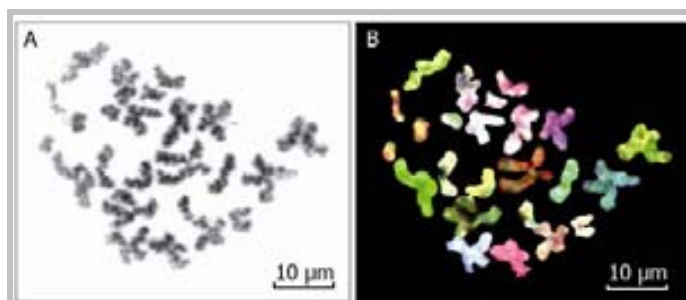
**Taula 3.6.** Longitud d'ona d'excitació i d'emissió dels fluorocroms utilitzats (Spectra Vysion™, Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA).

El programa de captura assigna un color a cada fluorocrom i superposa les imatges obtingudes obtenint una imatge amb 24 colors diferents, un per cada bivalent o cromosoma (figura 3.4.).



**Figura 3.4.** Imatges d'una metafase I obtingudes amb cadascun dels 6 filtres específics. (A) SpectrumAqua, (B) SpectrumFRed, (C) SpectrumGold, (D) SpectrumGreen, (E) SpectrumRed (F) DAPI (G) imatge-composició resultant.

- Avaluar les imatges, tant de les metafases I com de les metafase II, comparant les obtingudes després d'aplicar el protocol de M-FISH amb les capturades prèviament amb tinció uniforme (figura 3.5.).



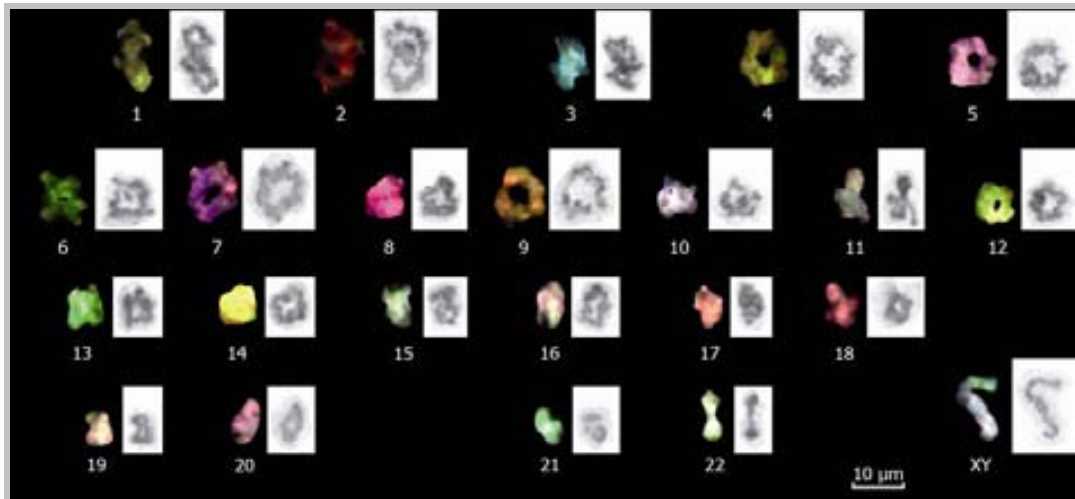
**Figura 3.5.** Metafase II (A) Tinció uniforme (B) M-FISH.

Criteris d'anàlisi:

• Metafase I:

- Identificar a quin cromosoma del cariotip pertanyen les unitats cromosòmiques observades amb tinció uniforme (figura 3.6.).

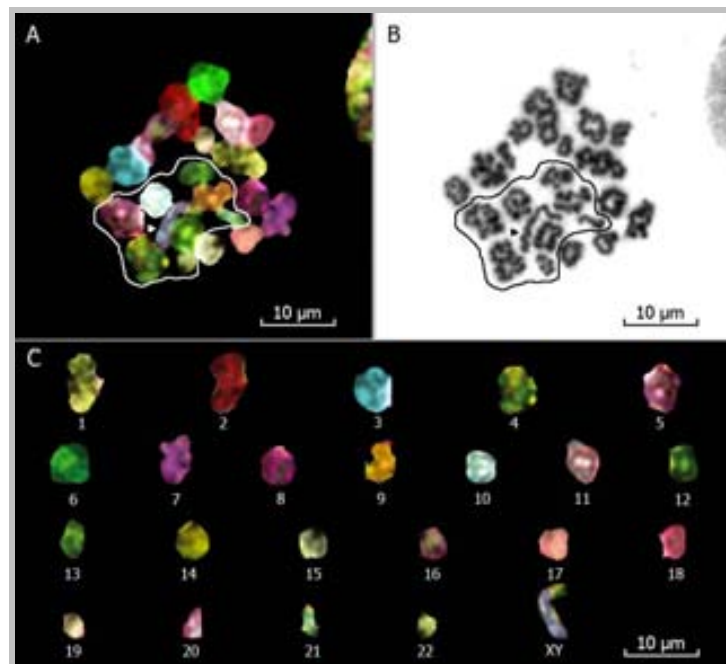
Aquesta identificació va permetre assignar el nombre de quiasmes per bivalent de forma específica.



**Figura 3.6.** Cariotip d'una metafase I obtingut a partir de les imatges amb tinció uniforme i M-FISH.

- Determinar els bivalents que estan propers al bivalent sexual.

Es consideraran bivalents propers, aquells que formin part de la primera corona al voltant del bivalent sexual, independentment de la distància a la que es trobin. (figura 3.7.).

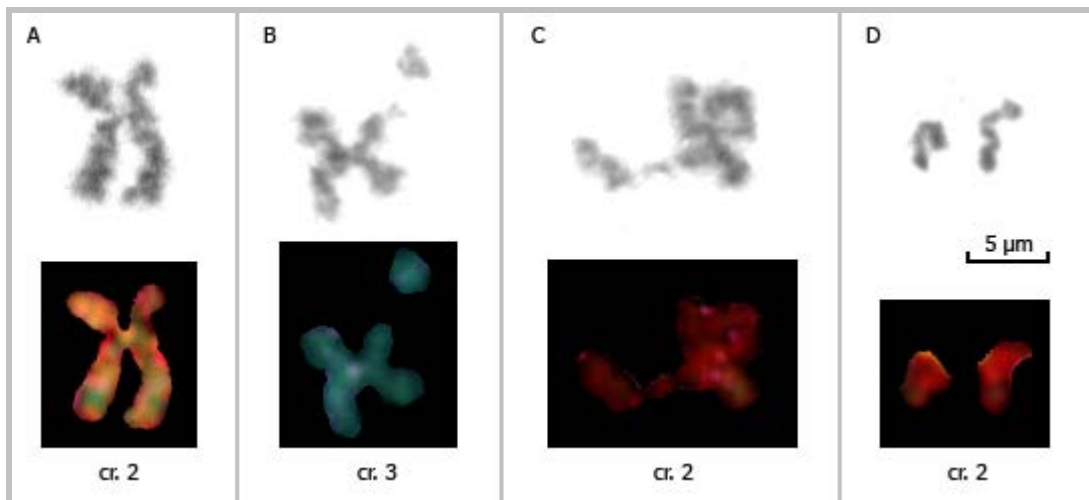


**Figura 3.7.** Metafase I on s'han identificat els bivalents considerats propers al bivalent sexual (marcat amb la punta de fletxa). (A) metafase després d'aplicar el protocol de M-FISH (B) metafase amb tinció uniforme (C) cariotip.

- Metafase II:

- Identificar a quin cromosoma del cariotip pertanyen les unitats cromosòmiques observades amb tinció uniforme (figura 3.8.).

Aquesta identificació va permetre especificar quins eren els cromosomes que presentaven morfologies no esperades: trencaments de cromàtide, cromàtides asimètriques o cromàtides separades i també identificar els cromosomes implicats en anomalies numèriques.



**Figura 3.8.** Identificació de cromosomes a metafase II mitjançant M-FISH. (A) Cromosoma 2 normal (B) Cromosoma 3 amb trencament de cromàtide (C) Cromosoma 2 amb cromàtides asimètriques (D) Cromosoma 2 amb les cromàtides separades.

cr.: cromosoma

### 3.2.2. Mostres de semen

Per a l'anàlisi dels espermatozoides ejaculats es va aplicar el protocol d'hibridació *in situ* fluorescent en nuclis descondensats d'espermatozoides estandarditzat al nostre laboratori (Sarrate i Anton 2009 (annex 7.1.3.)). Aquest protocol constava dels següents passos: A) fixació cel·lular, B) descondensació de la cromatina espermàtica, C) hibridació *in situ* fluorescent i D) valoració al microscopi de fluorescència.

#### A. Fixació cel·lular

- Deixar la mostra de semen durant 20 minuts a temperatura ambient fins a la seva liqüefacció.  
La fibrinolisisina, enzim alliberat per la pròstata i contingut en el semen ejaculat, actuarà solubilitzant la xarxa de fibrina responsable de la coagulació del semen.
- Centrifugar la mostra a 1000g durant 5 minuts per tal de separar la fracció cel·lular del plasma seminal.
- Descartar el sobrenedant, que correspon al plasma seminal, amb una pipeta Pasteur.

- Afegir solució hipotònica (KCl 0,075M) escalfada a 37°C, gota a gota i en agitació, fins a un volum final de 10 ml.
- Incubar la suspensió cel·lular a 37°C durant 25 minuts.
  - El tractament amb solució hipotònica afavorirà l'absorció d'aigua i augmentarà el seu volum, deixant el nucli més accessible.
- Centrifugar 1000g durant 5 minuts.
- Descartar el sobrenedant per decantació.
- Resuspendre el botó amb fixador de Carnoy (metanol:àcid acètic en la proporció 3:1) acabat de preparar. Afegir 8 ml del fixador, gota a gota i en agitació per tal d'evitar la formació d'agregats d'espermatozoides.
  - El fixador ajudarà a preservar l'augment de volum dels espermatozoides, fet que contribuirà a l'obtenció de bones extensions.
- Repetir els rentats amb el fixador, tantes vegades com sigui necessari, fins a obtenir el botó cel·lular totalment blanc.
- Resuspendre el botó obtingut afegint fixador de Carnoy gota a gota. Ajustar el volum final a la concentració d'espermatozoides adequada per a obtenir bones extensions cel·lulars.
- Deixar caure una gota de la suspensió en un portaobjectes prèviament desengreixat.
  - Els portaobjectes es guarden en metanol a -20°C i s'eixuguen amb paper absorbent just abans de la seva utilització. D'aquesta manera es millora la qualitat de l'extensió resultant.
- Verificar la dispersió dels nuclis dels espermatozoides avaluant les extensions al microscopi invertit de contrast de fases i marcar la regió on hi ha els nuclis.
- El material fixat sobrant i les extensions obtingudes s'emmagatzemen a -20°C fins al moment de la seva utilització.

#### B. Descondensació de la cromatina espermàtica

- Deixar el portaobjectes a temperatura ambient fins a la seva descongelació.
- Rentar la preparació dues vegades consecutives en una solució de 2xSSC durant 3 minuts cada un.
- Deshidratar el portaobjectes en una sèrie creixent d'etanol en aigua destil·lada (70%, 90% i 100%) durant 1 minut en cadascun d'ells.
- Deixar assecar el portaobjectes a temperatura ambient.
- Incubar la preparació a 37°C en una solució de descondensació de la cromatina (5mM *1,4-dithiothreitol* (DTT), 1% Triton X-100 i 50mM Tris (*2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol*)). El temps d'incubació s'ha d'ajustar en funció de la reactivitat de cada mostra a la solució de descondensació i al tipus de sonda que s'utilitzi. Aquest temps varia entre 1 i 10 minuts.
  - El DTT trenca els ponts disulfur de les protamines que empaqueten la cromatina del nucli dels espermatozoides.

- Rentar el portaobjectes, dues vegades, en una solució de 2xSSC durant 3 minuts cada un i deshidratar les preparacions en una sèrie creixent d'etanol en aigua destil·lada (70%, 90% i 100%).
- Deixar assecar el portaobjectes a temperatura ambient.

### C. Hibridació *in situ* fluorescent (FISH)

- Incubar la preparació en una solució de desnaturalització (70% formamida/2xSSC) durant 5 minuts a 73°C.

La formamida és un agent desnaturalitzant que permet disminuir la temperatura de desnaturalització a 72°C. Aquesta reducció de la temperatura, ajuda a preservar millor la morfologia cromosòmica.

- Deshidratar el portaobjectes utilitzant una sèrie de solucions d'etanol en aigua destil·lada (70%, 85% i 100%) durant 1 minut en cadascuna d'elles.
- Deixar assecar el portaobjectes a temperatura ambient.
- Afegir la sonda (CEP18/X/Y o LSI 13/21, *AneuVysion® multicolor DNA Probe kit*, Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA), col·locar un cobreobjectes i segellar amb cola.

Aquestes sondes estan predesnaturalitzades i per tant s'utilitzen directament sense un tractament previ de desnaturalització.

Les sondes *AneuVysion® multicolor DNA Probe kit* permeten analitzar la presència d'anomalies numèriques pels cromosomes X, Y, 13, 18 i 21 utilitzant dues combinacions diferents de sondes sobre dos portaobjectes diferents. El tipus de DNA que reconeixen les sondes, les regions de cada cromosoma on hibriden i el fluorocrom que les marca es detallen a la taula 3.7.

Combinació de sondes	Tipus de DNA	Regió del cromosoma	Fluorocrom
CEP X, Y i 18	α-satèl·lit	18p11.1-q11.1	SpectrumAqua
	α-satèl·lit	Xp11.1-q11.1	SpectrumGreen
	α-satèl·lit	Yp11.1-q11.1	SpectrumOrange
LSI 13 i 21	seqüència única	13q14	SpectrumGreen
	seqüència única	21q22.13-q22.2	SpectrumOrange

**Taula 3.7.** Característiques de les sondes *AneuVysion® multicolor DNA Probe kit* (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA).

- Incubar les preparacions en una cambra humida a 37°C entre 16-20 hores per tal de que les sondes hibridin sobre les regions específiques del DNA de la mostra.
- Treure el cobreobjectes desplaçant-lo lateralment.

- Rentar el portaobjectes amb solució de 0,4xSSC/0,3%NP-40 escalfada a 73°C durant 2 minuts.
- Transferir el portaobjectes a la solució de rentat 2xSSC/0,1%NP-40 a temperatura ambient durant 1 minut.

Els dos rentats amb SSC i NP40 ajuden a eliminar les sondes no hibridades o les que ho hagin fet inespecíficament.

- Deixar assecar el portaobjectes a temperatura ambient.
- Tenyir la cromatina dels nuclis dels espermatozoides amb DAPI (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) i tapar amb un cobreobjectes de vidre.

El DAPI és un fluorocrom que marca la cromatina del nucli de color blau.

- Segellar el cobreobjectes amb esmalt d'ungles.
- Guardar els portaobjectes preservats de la llum a -20°C fins al moment de la seva valoració.

#### D. Valoració al microscopi de fluorescència

- Analitzar les preparacions amb un microscopi de fluorescència equipat amb un filtre triple per DAPI/Green/Orange i filtres de banda única per SpectrumAqua, SpectrumGreen i SpectrumOrange. En aquest estudi es va utilitzar un microscopi Olympus BX60 (Olympus Optical España, S.A.).

El filtre de banda triple permet la visualització simultània dels senyals d'hibridació dels fluorocroms SpectrumGreen, SpectrumOrange i DAPI, mentre que els 3 filtres de banda única permeten visualitzar individualment els fluorocroms SpectrumAqua, SpectrumGreen o SpectrumOrange (taula 3.8.).

Fluorocrom	Pic d'excitació (nm)	Pic d'emissió (nm)
SpectrumAqua	433	480
SpectrumGreen	497	524
SpectrumOrange	559	588
DAPI	367	452

**Taula 3.8.** Longitud d'ona d'excitació i d'emissió dels fluorocroms (*AneuVysion® multicolor DNA Probe kit*; Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA).

- Classificar els nuclis d'espermatozoides segons la combinació de senyals que presentin en: haploides, disòmics, nul·lisòmics i diploides (taula 3.9.; figura 3.9.).

Criteris d'anàlisi:

















Per a l'avaluació de cada nucli d'espermatozoide caldrà tenir en compte els criteris d'anàlisi següents (Blanco et al 1996):

1) Criteris morfològics; només es valoraran els nuclis que:

- no estiguin sobreposats
- tinguin els contorns ben definits
- presentin una morfologia ovalada

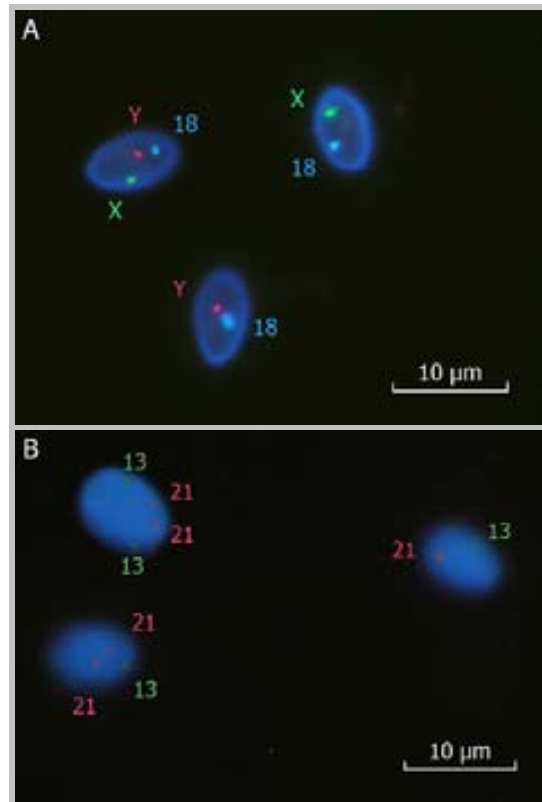
2) Criteris d'hibridació; es valoraran els nuclis que:

- presentin com a mínim un senyal d'hibridació. Quan presentin dos o més senyals d'hibridació del mateix color, es consideraran senyals independents sempre que:
  - tinguin la mateixa mida
  - presentin la mateixa intensitat
  - la distància entre ells sigui igual o superior al diàmetre del senyal.

Combinació de sondes	Combinació de senyals	Cromosomes	Genotip
CEP X, Y i 18		18 X	Haploide
		18 Y	
		18 X Y	Disòmic pels cromosomes sexuals
		18 X X	
		18 Y Y	
		18 18 X	Disòmic pel cromosoma 18
		18 18 Y	
		18	Nul·lisòmic
		X	
		Y	
LSI 13 i 21		13 21	Haploide
		13 13 21	Disòmic pel cromosoma 13
		13 21 21	Disòmic pel cromosoma 21
		13	Nul·lisòmic
		21	
		13 13 21 21	Diploide

**Taula 3.9.** Determinació del genotip dels espermatozoides en funció de la combinació de senyals observada.





**Figura 3.9.** (A) Nuclis d'espermatozoides hibridats amb les sondes CEP X SpectrumGreen, CEP Y SpectrumOrange i CEP 18 SpectrumAqua (AneuVysion<sup>®</sup> Assay). S'observen dos espermatozoides haploides (un portador del cromosoma X i l'altre portador del cromosoma Y) i un espermatozoide disòmic pels cromosomes sexuals. (B) Nuclis d'espermatozoides hibridats amb les sondes LSI 13 SpectrumGreen i LSI 21 SpectrumOrange (AneuVysion<sup>®</sup> Assay). S'observa un espermatozoide haploide, un espermatozoide amb una disomia del cromosoma 21 i un espermatozoide diploide.

- Valorar un mínim de 500 espermatozoides per hibridació i per pacient. En el cas dels individus control es van analitzar 10.000 espermatozoides.

El nombre d'espermatozoides estudiats determinarà el nivell de precisió assolit. Així, i segons la fórmula del model estadístic de determinació de la mida de la mostra (figura 3.10.), avaluant 500 espermatozoides s'assumiria un error d'un 4%, i analitzant-ne 10.000 l'error seria de l'1%.

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

**n** = mida de la mostra

**K** = coeficient obtingut a partir del nivell de confiança que s'estableixi (per un nivell de confiança del 95% el valor de K és 1,96)

**p<sub>0</sub>** = proporció esperada d'observacions que presentaran la característica que valorem (situació de màxima incertesa: p=0,5)

**q<sub>0</sub>** = 1- p<sub>0</sub>

**e** = precisió amb la que es vol estimar un paràmetre

**Figura 3.10.** Fórmula del model estadístic de determinació de la mida de la mostra.

### 3.3. Anàlisi estadística

L'anàlisi estadística dels resultats es va realitzar amb el suport especialitzat del Servei d'estadística de la Universitat Autònoma de Barcelona (annex 7.2.). El software utilitzat ha estat el SPSS (versió 15.0.1.1, Chicago, IL), SAS v9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) i el SPAD v4.5 (Centre International de Statistiques et d'Informatique Appliquées, Saint Mandé, France). El nivell de significació estadística establert va ser de 0,05.

#### 3.3.1. Mostres de teixit testicular: Recompte de quiasmes

A partir dels recomptes de quiasmes de tots els bivalents estudiats es van calcular els estadístics mitjana, moda, desviació estàndard, i el rang del nombre de quiasmes per cadascun dels 23 bivalents i per a cada pacient. També es va establir la mitjana de quiasmes per metafase de cadascun dels individus sumant les mitjanes obtingudes per cada bivalent.

Es van comparar les mitjanes de recomptes de quiasmes per metafase calculades a partir de tots els bivalents informatius i les calculades només tenint en compte les metafases en les que s'havien identificat totes les unitats cromosòmiques i s'havien pogut comptar el nombre de quiasmes en tots els bivalents, mitjançant el test de *t-student*.

#### A. Anàlisi de clústers

Amb l'objectiu de detectar pacients amb característiques similars pel que fa als recomptes de quiasmes es va realitzar una anàlisi de clústers jeràrquic (Lebart et al 2000). Les variables utilitzades van ser les mitjanes dels recomptes de cada individu. Es van estandarditzar les variables i es va considerar el mètode de Ward per calcular les distàncies. Les agrupacions entre individus es van representar mitjançant un dendrograma, és a dir un diagrama en forma d'arbre que mostra les relacions de proximitat entre els diversos pacients.

#### B. Modelitzacions segons clústers, cariotip i seminograma

Per tal d'analitzar si el fet de pertànyer a un clúster o de presentar determinades característiques del cariotip o del seminograma afectava el recompte de quiasmes per metafase, es va avaluar la variable resposta "recompte de quiasmes" segons aquestes tres variables explicatives. Es van definir dues categories pel cariotip: "46,XY" i "46,XY (polimorfisme)", i tres categories pel seminograma: "normal", "anormal no OAT" i "anormal OAT" (taula 3.10.).

Donada la naturalesa de la variable resposta "recompte de quiasmes" (un comptatge) va ser necessari establir models de regressió de Poisson (Cameron i Trivedi 1998). Es van considerar mesures repetides (en cada pacient es mesuren diferents cèl·lules i en cada cèl·lula els 23 bivalents), i es va corregir el problema de la baixa variabilitat (*underdispersion*, variabilitat inferior a la mitjana degut a que el recompte de quiasmes sempre està entre 0 i 6).

Codi	Recodificació		Seminograma	Recodificació
	Pacient	Cariotip		
072	46,XY	46,XY	T	Anormal no OAT
118	46,XY	46,XY	OA	Anormal no OAT
140	46,XY	46,XY	AT	Anormal no OAT
142	46,XY	46,XY	AT	Anormal no OAT
282	46,XY	46,XY	AT	Anormal no OAT
284	46,XY	46,XY	Az	Anormal no OAT
285	46,XY,14ps+,15ps+	46,XY (polimorfisme)	Az	Anormal no OAT
287	46,XYqh+	46,XY (polimorfisme)	N	Normal
289	46,XY	46,XY	A	Anormal no OAT
291	46,XY	46,XY	AT	Anormal no OAT
299	46,XY,inv9(p11q12)	46,XY (polimorfisme)	N	Normal
300	46,XY	46,XY	A	Anormal no OAT
301	46,XY	46,XY	A	Anormal no OAT
302	46,XY	46,XY	N	Normal
307	46,XY	46,XY	A	Anormal no OAT
308	46,XY	46,XY	OAT	Anormal OAT
309	46,XY	46,XY	OAT	Anormal OAT
310	46,XY	46,XY	OA	Anormal no OAT
312	No s'ha avaluat	-	Az	Anormal no OAT
314	46,XY	46,XY	N	Normal
315	46,XYqh+,inv9(p12q12)	46,XY (polimorfisme)	Az	Anormal no OAT
321	46,XY	46,XY	N	Normal
323	46,XY	46,XY	A	Anormal no OAT
328	46,XY	46,XY	OAT	Anormal OAT
331	46,XY	46,XY	OAT	Anormal OAT
360	46,XY	46,XY	OAT	Anormal OAT
361	46,XY	46,XY	OAT	Anormal OAT
392	46,XY	46,XY	OAT	Anormal OAT
6837	46,XY	46,XY	OAT	Anormal OAT
6854	46,XY	46,XY	OAT	Anormal OAT
6858	46,XY	46,XY	OAT	Anormal OAT
6859	46,XY	46,XY	OAT	Anormal OAT
6866	46,XY	46,XY	OAT	Anormal OAT
6867	46,XY	46,XY	OAT	Anormal OAT
8345	46,XY	46,XY	OAT	Anormal OAT
8362	46,XY	46,XY	OAT	Anormal OAT
8514	46,XY	46,XY	OAT	Anormal OAT

**Taula 3.10.** Recodificació dels pacients segons el cariotip somàtic i els paràmetres seminals.

A: Astenozoospermia, AT: Astenoteratozoospermia, Az: Azoospermia, N: Normozoospermia, OA: Oligoastenozoospermia, OAT: Oligoastenoteratozoospermia, T: Teratozoospermia.

Es va establir un model per a tots els individus amb cadascuna de les variables per separat, i un model per a cadascun dels clústers amb les variables cariotip, seminograma i la interacció entre les dues variables. A partir dels models establerts, es van calcular els valors esperats de recomptes de quiasmes per metafase en cadascuna de les categories de les variables resposta i es van analitzar i quantificar les possibles diferències entre elles. La quantificació d'aquestes diferències es va obtenir a partir del Risc Relatiu (RR) calculat a partir dels resultats el model; entenent per RR la probabilitat de presentar més o menys quiasmes d'una categoria respecte de l'altra.

### 3.3.2. Mostres de teixit testicular: Relació de proximitat al bivalent sexual

Per tal d'analitzar si alguns bivalents es trobaven més freqüentment propers al bivalent sexual que d'altres, es va crear una variable indicadora de si el bivalent quedava proper o no, assignant el valor "1" quan el bivalent quedava proper (dins de la primera corona; figura 3.7.) i el valor "0" quan no hi quedava (fora de la primera corona; figura 3.7.).

#### A. Anàlisi de bivalents individuals

L'anàlisi de proximitat de cada bivalent es va realitzar mitjançant un model de regressió logística (Hosmer i Lemeshow 2000) amb mesures repetides considerant com a "variable explicativa" els diferents bivalents. A partir del model establert es van calcular les *odds ratio*, que representaven el risc que tenia un bivalent de ser proper al bivalent sexual respecte dels altres. Es van realitzar comparacions 2 a 2 entre cada bivalent respecte de tots els altres mitjançant el test de la  $\chi^2$  per comprovar el grau de significació de les diferències.

#### B. Anàlisi de grups de bivalents

Es va avaluar si existien diferències de proximitat entre grups de bivalents formats a partir de cromosomes amb característiques de mida i morfologia similars. Per poder-ho estudiar, va ser necessari recodificar la variable explicativa "bivalent" segons els 7 grups de cromosomes que s'estableixen en el cariotip humà (taula 3.11.)

Per a l'estudi estadístic d'aquestes dades també es va fer servir un model de regressió logística amb mesures repetides. En aquest cas la variable explicativa van ser els diferents grups de bivalents que s'havien establert. Com en el cas anterior es van calcular les *odds ratio* i es van avaluar les diferències entre els grups de bivalents mitjançant el test de la  $\chi^2$ .

Grup	Bivalents
A	1,2,3
B	4,5
C	6,7,8,9,10,11,12
D	13,14,15
E	16,17,18
F	19,20
G	21,22

**Taula 3.11.** Bivalents agrupats segons les característiques de mida i morfologia cromosòmica.

### 3.3.3. Mostres de semen

Es van calcular els percentatges d'espermatozoides amb disomies pels cromosomes 13, 18, 21 i cromosomes sexuals i les diploïdies, dels individus control i dels individus amb problemes de fertilitat.

#### A. Anàlisi individual

Per tal de determinar si les disomies y diploïdies observades en els individus infèrtils eren diferents a les de la població control, i degut a la mida de la mostra (500 espermatozoides per individu), es va aplicar el test exacte de Fisher. Aquesta comparació estadística es va realitzar pels cinc genotips analitzats i es va aplicar per cada individu de forma particular.

#### B. Anàlisi poblacional

Els resultats obtinguts es van tractar poblacionalment; agrupant els pacients segons les característiques del seminograma (A, AT, N, O, OA, OAT, OT, T), del cariotip somàtic (normal, polimòrfic, anormal) o del cariotip meiótic (normal, anormal).

Es van calcular els percentatges i els intervals de confiança dels individus que presentaven un resultat de FISH anormal segons els paràmetres seminals i segons el resultat de l'estudi meiótic.

#### C. Correlació entre anomalies cromosòmiques i paràmetres seminals

Per valorar la correlació entre l'increment d'anomalies cromosòmiques i els paràmetres de recompte espermàtic, motilitat i morfologia es va utilitzar el coeficient de correlació de Pearson. Aquest estudi es va fer pels cinc genotips per separat i també pel total d'anomalies cromosòmiques observades.

#### D. Correlació entre anomalies cromosòmiques i edat

Es va utilitzar el coeficient de correlació de Pearson per valorar la correlació entre l'increment d'anomalies cromosòmiques i edat; tant pel total d'anomalies cromosòmiques observades com pels cinc genotips per separat. Per realitzar aquestes correlacions només es van tenir en compte els individus de cariotip somàtic normal.

Finalment, per comparar la mitjana d'edat dels individus que presentaven increments significatius amb la mitjana d'edat del grup restant d'individus, es va aplicar el test de Mann Whitney.



## 4. Resultats





## 4.1. Estudis en biòpsia testicular

### 4.1.1. Anàlisi dels cromosomes a l'estadi de metafase I

Es van avaluar un total de 481 metafases I. En el 16,2% (6/37) dels individus no es va observar cap espermatòcit primari en aquesta etapa. La mitjana de metafases analitzada per individu va ser de  $15,5 \pm 12,5$  (rang: 1-52) (taula 4.1.).

Codi Pacient	Nº de MI analitzades	Codi Pacient	Nº de MI analitzades
072	0	314	8
118	10	315	36
140	11	321	24
142	11	323	0
282	0	328	34
284	18	331	27
285	0	360	2
287	22	361	2
289	8	392	13
291	18	6837	3
299	11	6854	6
300	0	6858	38
301	12	6859	32
302	6	6866	21
307	10	6867	9
308	4	8345	1
309	5	8362	0
310	18	8514	9
312	52		

**Taula 4.1.** Nombre de metafases I analitzades per pacient.

Es van identificar totes les unitats cromosòmiques en el 85,7% (412/481) de les cèl·lules analitzades (taula 4.2.). La resta incloïen unitats cromosòmiques no informatives (14,3%; 69/481).

De les 412 metafases I informatives, el 67,7% presentava tots els cromosomes aparellats formant bivalents. El 21,8% mostrava 22 bivalents autosòmics i els cromosomes sexuals en forma d'univalent (taula 4.2.). D'altra banda, el 6,8% es varen classificar com metafases hipoploides, de les quals, més de la meitat presentaven univalents. Finalment, en el 1,7% de les metafases s'observava desinapsi generalitzada de bivalents, mentre que el 1,5% eren metafases tetraploides.

Característiques Metafase I	Total		Subtotal	
	Nº	%	Nº	%
<b>MI,23,XY</b>	<b>279</b>	<b>67,7</b>		
<b>MI,24,X,Y</b>	<b>90</b>	<b>21,8</b>		
<b>Hipoploidies</b>	<b>28</b>	<b>6,8</b>		
MI,23,X,-I(Y)			6	1,5
MI,22,XY,-II(19)			3	0,7
MI,22,XY,-II(17)			2	0,5
MI,22,XY,-II(18)			2	0,5
MI,23,XY,-II(21),+I(21)			2	0,5
MI,21,XY,-II(4),-II(15)			1	0,2
MI,21,XY,-II(5),-II(16)			1	0,2
MI,22,XY,-II(3)			1	0,2
MI,22,XY,-II(4)			1	0,2
MI,22,XY,-II(14)			1	0,2
MI,22,XY,-II(22)			1	0,2
MI,22,X,Y,-II(4),-II(7)			1	0,2
MI,23,X,Y,-II(3)			1	0,2
MI,23,X,Y,-II(21)			1	0,2
MI,23,Y,-I(X)			1	0,2
MI,23,X,-I(Y),-II(21),+I(21)			1	0,2
MI,25,X,-I(Y),-II(21),+I(21),+I(21),-II(22),+I(22),+I(22)			1	0,2
MI,26,X,-I(Y),-II(11),+I(11),+I(11),-II(15),+I(15),+I(15),-II(22),+I(22),+I(22)			1	0,2
<b>Desinapsi generalitzada</b>	<b>7</b>	<b>1,7</b>		
<b>MI,46,XY,XY</b>	<b>6</b>	<b>1,5</b>		
<b>Altres</b>	<b>2</b>	<b>0,5</b>		
MI,24,XY,-II(19),+I(19),+I(19)			1	0,2
MI,26,X,Y,-II(12),+I(12),+I(12),-II(18),+I(18),+I(18)			1	0,2
<b>Total</b>	<b>412</b>	<b>100</b>		

Taula 4.2. Característiques de les metafases I analitzades.

La mitjana, la moda, el màxim, el mínim i la desviació estàndard del nombre de quiasmes per cadascun dels 23 bivalents i per cada pacient es detalla a la taula 4.3. És important destacar que quan a la taula un bivalent mostra el nombre zero com a valor mínim de recompte de quiasmes, indica que es van observar univalents en alguna de les metafases avaluades. D'altra banda cal dir que, els individus 072, 282, 285, 300, 323 i 8362 es van considerar "no informatius" perquè no es va observar cap metafase I en les preparacions analitzades.

Es va establir la mitjana de quiasmes per metafase de cadascun dels individus sumant les mitjanes obtingudes per cada bivalent. La mitjana de quiasmes per metafase I a la població d'estudi es va determinar a partir dels recomptes obtinguts en els 8421 bivalents analitzats i va ser de 50,3 quiasmes.

Codi Pacient	Recopte de quiasmes																							XY	Suma
	BV1	BV2	BV3	BV4	BV5	BV6	BV7	BV8	BV9	BV10	BV11	BV12	BV13	BV14	BV15	BV16	BV17	BV18	BV19	BV20	BV21	BV22			
287	Mitjana	3,7	3,8	3,4	3,3	3,0	2,9	2,7	2,7	2,3	2,8	2,4	2,5	2,4	2,1	2,3	2,2	2,2	2,1	2,0	1,9	1,3	1,3	0,7	55,9
	Moda	4	4	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	
	Màxim	4	5	5	5	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	
	Mínim	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	0	
	DE	0,5	0,7	0,7	0,7	0,5	0,6	0,6	0,6	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,5	
Nº BV	18	17	18	20	17	17	15	16	16	16	16	17	15	15	16	14	15	16	12	16	17	16	16	21	
284	Mitjana	3,8	3,5	3,2	2,6	2,8	2,6	2,6	2,5	2,3	2,7	2,5	2,5	2,2	2,0	2,1	2,2	2,2	1,9	1,8	1,8	1,1	1,1	0,6	52,4
	Moda	4	3	3	3	3	2	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	
	Màxim	5	5	5	4	4	4	3	3	4	4	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	2	1	
	Mínim	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	0	
	DE	0,9	0,7	0,8	0,6	0,5	0,6	0,5	0,5	0,6	0,6	0,5	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	0,3	0,5	0,5	0,3	0,3	0,5	
Nº BV	17	16	17	18	17	16	16	16	16	16	16	17	16	17	16	17	16	15	16	12	18	16	18	17	
6866	Mitjana	3,5	3,5	2,9	3,2	2,7	2,6	2,7	2,3	2,4	2,5	2,4	2,5	2,3	2,1	2,2	2,1	2,2	1,9	1,9	1,9	1,1	0,8	0,8	52,6
	Moda	4	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	
	Màxim	4	5	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	
	Mínim	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	0	
	DE	0,6	0,7	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,5	0,4	0,3	0,4	0,6	
Nº BV	17	15	14	11	15	14	13	15	13	15	16	14	15	15	13	14	18	18	17	17	14	14	20		
289	Mitjana	3,8	4,0	3,6	2,7	3,0	3,0	2,6	2,8	2,3	2,7	2,3	2,8	2,3	2,0	2,0	2,2	2,0	2,3	1,8	1,5	1,0	1,0	1,0	54,6
	Moda	4	4	3	2	3	3	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	
	Màxim	4	6	5	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	3	2	3	2	2	1	1	1	
	Mínim	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	
	DE	0,4	1,1	0,9	0,8	0,7	0,0	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,0	0,0	0,0	0,4	0,5	0,4	0,5	0,0	0,0	0,0	
Nº BV	5	6	5	7	5	7	5	5	4	7	4	5	4	4	4	5	4	4	6	6	5	6	6		
301	Mitjana	3,7	3,5	3,3	3,0	3,3	3,1	2,9	2,5	2,5	2,5	2,8	2,5	2,1	1,9	2,1	2,3	2,1	1,9	1,8	1,7	1,3	1,2	0,3	54,1
	Moda	4	4	3	3	3	3	3	2	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	
	Màxim	5	5	4	4	4	4	4	3	3	3	4	3	3	2	3	3	3	3	2	2	2	2	1	
	Mínim	2	2	3	2	3	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	1	1	1	0	
	DE	1,0	0,9	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6	0,5	0,7	0,5	0,6	0,5	0,4	0,3	0,4	0,5	0,4	0,6	0,4	0,5	0,5	0,4	0,5	
Nº BV	7	8	8	6	8	9	9	11	11	10	10	10	8	10	8	10	8	9	10	11	11	12	12		
299	Mitjana	3,6	3,3	3,0	2,6	2,9	2,5	2,1	2,4	2,3	2,2	2,1	2,7	2,3	1,7	2,0	2,0	2,0	2,0	1,7	2,0	1,1	1,0	0,8	50,2
	Moda	4	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	
	Màxim	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	4	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	
	Mínim	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	1	1	0	
	DE	0,7	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,8	0,5	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,4	0,0	0,4	
Nº BV	9	7	9	8	9	8	7	9	8	6	7	6	4	3	5	4	3	3	6	7	7	6	10		
392	Mitjana	3,5	3,0	3,1	2,8	2,8	2,8	2,1	2,4	2,4	2,3	2,2	2,4	2,1	2,1	2,1	2,0	2,2	2,2	1,8	1,8	1,5	1,0	0,8	51,3
	Moda	4	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	
	Màxim	4	4	4	3	3	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	2	1	
	Mínim	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0	
	DE	0,7	0,6	0,5	0,4	0,5	0,6	0,3	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,3	0,3	0,3	0,0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,0	0,4	
Nº BV	13	12	13	11	12	11	12	11	10	11	12	12	10	12	11	10	11	10	11	11	10	13	11	12	
307	Mitjana	3,7	3,5	3,4	3,0	2,8	3,2	2,4	2,3	2,4	2,3	2,4	2,7	2,1	1,9	2,0	2,0	2,0	2,0	1,8	1,2	1,2	1,0	1,0	53,2
	Moda	4	4	3	3	3	3	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	
	Màxim	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	2	
	Mínim	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	
	DE	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,4	0,6	0,5	0,0	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,0	
Nº BV	6	8	8	10	10	9	8	9	10	8	9	9	9	8	7	10	10	9	10	10	9	10	10		
6867	Mitjana	3,5	4,0	3,1	2,7	3,0	2,6	2,2	2,0	2,4	2,6	2,4	2,7	2,0	2,1	2,2	2,0	2,0	1,8	1,9	2,0	1,1	1,0	1,0	52,1
	Moda	3	4	3	3	3	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	
	Màxim	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	1	
	Mínim	3	4	2	2	3	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	
	DE	0,5	0,0	0,6	0,5	0,0	0,5	0,4	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,4	0,4	0,0	0,0	0,5	0,4	0,0	0,4	0,0	0,0	
Nº BV	6	6	8	6	9	7	9	7	8	7	8	7	7	8	6	7	6	8	7	8	8	6	7		
142	Mitjana	3,8	3,2	3,2	2,6	2,6	2,6	2,8	2,4	2,6	2,9	2,4	2,8	2,1	2,1	2,2	2,0	2,1	1,8	1,6	1,7	1,3	1,1	0,9	52,5
	Moda	4	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	
	Màxim	4	4	4	3	3	3	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	1	
	Mínim	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	0	
	DE	0,7	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,7	0,5	0,5	0,4	0,5	0,4	0,3	0,6	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	
Nº BV	8	9	10	9	9	10	8	10	9	8	8	10	10	10	9	9	8	6	9	10	8	9	11		
328	Mitjana	3,8	3,5	3,2	3,0	2,8	2,6	2,8	2,5	2,5	2,5	2,4	2,6	2,2	2,0	2,1	2,0	2,1	1,9	1,7	1,8	1,3	1,3	0,9	53,8
	Moda	4	3	3	3	3	3	3	2	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	
	Màxim	5	5	4	4	4	4	4	4	3	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	
	Mínim	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	0	1	1	1	0	
	DE	0,7	0,7	0,6	0,6	0,5	0,5	0,7	0,6	0,5	0,6	0,5	0,5	0,5	0,4	0,2	0,3	0,2	0,4	0,5	0,6	0,4	0,4	0,5	
Nº BV	31	32	30	30	29	28	31	31	30	29	30	26	30	24	29	27	29	32	31	29	34	32	33		
331	Mitjana	3,8	3,3	3,3	2,7	2,8	2,7	2,7	2,4	2,6	2,1	2,3	2,5	2,0	1,9	1,9	2,0	1,9	1,4	1,9	1,4	1,0	1		



Codi		Recompte de quiasmes																						(continua de la pàgina anterior)	
Pacient		BV1	BV2	BV3	BV4	BV5	BV6	BV7	BV8	BV9	BV10	BV11	BV12	BV13	BV14	BV15	BV16	BV17	BV18	BV19	BV20	BV21	BV22	XY	Suma
310	Mitjana	3,0	3,2	2,8	2,6	2,6	2,7	2,6	2,3	2,4	2,4	2,3	2,2	1,8	1,8	1,8	1,9	1,9	1,6	1,6	1,8	1,2	1,2	0,8	48,4
	Moda	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	Màxim	4	5	5	4	3	4	3	3	3	3	3	3	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1
	Mínim	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	DE	0,9	0,7	0,8	0,7	0,5	0,6	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4	0,8	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
	Nº BV	14	18	18	16	16	18	17	16	18	16	16	15	18	15	18	18	15	17	15	17	15	15	15	18
360	Mitjana	3,0	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0	2,5	2,0	2,0	2,0	2,5	2,5	2,0	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0	1,5	1,0	50,5
	Moda	3	2	3	3	3	-	2	2	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-	2	2	1	-	1	
	Màxim	3	2	3	3	3	3	3	2	2	2	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1
	Mínim	3	2	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	DE	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,7	0,0	0,0	-	0,7	0,7	-	0,7	0,0	0,0	-	-	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0
	Nº BV	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2
315	Mitjana	2,7	2,8	2,5	2,1	2,3	2,1	2,2	2,0	2,1	2,0	2,0	2,2	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,6	1,6	1,7	1,1	0,9	0,2	43,1
	Moda	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	0
	Màxim	5	4	4	4	4	3	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	1
	Mínim	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
	DE	1,3	0,9	0,9	1,1	0,8	0,9	0,7	0,8	0,6	0,6	0,8	0,6	0,6	0,8	0,6	0,5	0,5	0,7	0,6	0,5	0,4	0,6	0,4	0,6
	Nº BV	19	23	29	28	29	28	29	26	28	28	29	25	28	29	28	28	29	29	30	30	30	29	32	29
308	Mitjana	3,0	3,0	2,7	2,5	2,3	2,0	1,8	2,3	2,0	2,0	2,3	2,3	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,8	2,0	1,8	0,8	1,0	1,0	46,2
	Moda	-	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	Màxim	4	3	3	3	3	2	2	3	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	Mínim	2	3	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	0	1	1
	DE	1,0	0,0	0,6	0,6	0,5	0,0	0,5	0,5	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0
	Nº BV	3	3	3	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	3	3	4	3	4	4	4	4	4
6837	Mitjana	3,0	3,0	3,0	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,5	2,0	1,5	1,0	1,0	1,0	46,0
	Moda	3	-	-	-	2	2	2	2	2	2	2	-	2	2	2	2	2	-	2	-	1	1	1	
	Màxim	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	Mínim	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1
	DE	0,0	-	-	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0
	Nº BV	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
8514	Mitjana	2,8	3,0	2,8	2,4	2,4	2,6	1,8	2,0	2,1	1,8	1,8	2,2	2,0	1,7	2,0	2,0	2,0	1,8	1,8	1,0	1,1	0,9	46,1	
	Moda	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	Màxim	4	3	4	3	3	4	2	2	3	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1
	Mínim	2	3	2	2	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	0
	DE	0,8	0,0	0,8	0,5	0,5	0,8	0,4	0,0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,6	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,4	0,0	0,4	0,3	0,3
	Nº BV	6	6	6	5	7	7	5	4	7	5	5	6	7	6	6	3	2	4	6	6	7	7	9	9
361	Mitjana	1	3	3	0	1	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11,0
	Moda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Màxim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mínim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nº BV	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tots els individus	Mitjana	3,4	3,3	3,0	2,7	2,7	2,5	2,5	2,3	2,3	2,4	2,3	2,4	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,9	1,8	1,8	1,2	1,2	0,7	50,3
	Moda	4	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
	Màxim	6	6	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2
	Mínim	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
	DE	0,8	0,7	0,7	0,7	0,6	0,7	0,6	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4
	Nº BV	349	368	378	371	368	361	365	361	372	357	367	355	361	334	336	340	337	339	382	382	398	395	445	8421

\* En els individus 072, 282, 285, 300, 323 i 8362 no es va observar cap metafase I

**Taula 4.3. (continuació)** Descripció del nombre de quiasmes per bivalent per cadascun dels individus estudiats on es detalla la mitjana, la moda, el màxim, el mínim, la desviació estàndard i el nombre de bivalents analitzats. BV: bivalent; DE: desviació estàndard.

La mitjana poblacional del nombre de quiasmes també es va calcular tenint en compte les 121 metafases en les que s'havien pogut identificar totes les unitats cromosòmiques i comptar el nombre de quiasmes en tots els bivalents, i que per tant es disposava d'un recompte total de quiasmes per metafase (taula 4.4.). En aquest cas, la mitjana va ser de  $50,9 \pm 5,5$  quiasmes. Aquest valor no va ser significativament diferent de la mitjana de 50,3 quiasmes obtinguda de l'anàlisi de tots els bivalents informatius ( $t=-0,530$ ;  $p=0,598$ ). Per aquesta raó es va decidir treballar a partir de tots els recomptes de quiasmes (independentment de si formaven part d'una metafase "completa" o "incompleta").

Codi Pacient	Nº de MI analitzades*	Mitjana de quiasmes	DE	Màxim	Mínim
287	8	56,4	2,0	59	53
284	10	51,4	3,6	58	46
6866	0	-	-	-	-
289	1	54,0	-	54	54
301	4	53,8	5,0	59	49
299	2	46,5	3,5	49	44
392	7	51,9	2,5	56	49
307	4	53,3	2,8	56	50
6867	2	52,0	0,0	52	52
142	4	52,3	2,5	55	49
328	11	53,4	3,2	60	49
331	3	53,0	1,0	54	52
140	0	-	-	-	-
118	1	49,0	-	49	49
302	1	61,0	-	61	61
8345	1	52,0	-	52	52
314	2	48,0	1,4	49	47
291	1	49,0	-	49	49
6854	0	-	-	-	-
321	13	50,5	3,2	57	45
6858	8	51,1	2,5	55	47
6859	7	51,3	3,9	58	47
312	9	50,8	3,7	58	46
309	2	50,0	7,1	55	45
310	9	47,9	5,8	54	37
360	1	52,0	-	52	52
315	7	46,6	4,6	52	39
308	1	47,0	-	47	47
6837	1	45,0	-	45	45
8514	0	-	-	-	-
361	1	11,0	-	11	11
<b>Tots els individus</b>	<b>121</b>	<b>50,9</b>	<b>5,5</b>	<b>61</b>	<b>11</b>

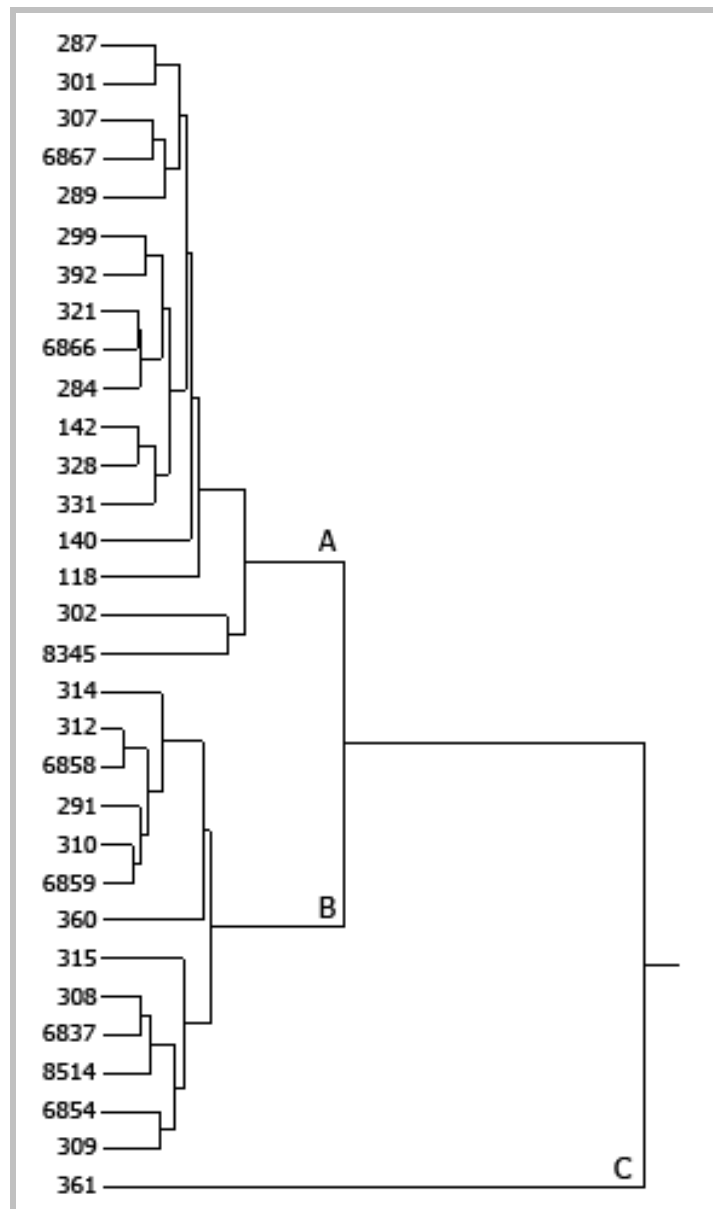
**Taula 4.4.** Nombre de quiasmes per metafase per cadascun dels individus estudiats. Es detalla el nombre de metafases I analitzades, la mitjana de quiasmes, la desviació estàndard, el màxim i el mínim.

\*Només s'han inclòs les metafases I en les que ha estat possible comptar el nombre de quiasmes de tots els bivalents.

DE: desviació estàndard.

### A. Anàlisi de clústers

Aquesta anàlisi es va fer a partir de les mitjanes de recomptes de quiasmes de cadascun dels bivalents per cada individu (fileres ombrejades a la taula 4.3.) i va permetre agrupar els individus en 3 clústers diferenciats: A, B i C (figura 4.1.). El clúster A estava format per 17 individus, el clúster B per 13 individus i el clúster C el constituïa un únic individu. Els 6 pacients en els que no s'havia observat cap metafase I quedaven exclosos del dendrograma.



**Figura 4.1.** Dendrograma obtingut a partir de l'anàlisi multivariant de les mitjanes dels recomptes de quiasmes per cadascun dels bivalents (els valors a partir dels quals s'han establert els clústers es detallen a les fileres ombrejades de la taula 4.3.)

## Resultats

El dendrograma és una representació gràfica de les distàncies relatives entre individus. El fet de que el pacient que constituïa el clúster C presentés unes característiques de recompte de quiasmes molt diferents de la resta, reduïa les distàncies relatives que s'establien entre els altres individus estudiats. Per tal d'ajustar la classificació dels pacients, es va excloure el cas 361 de l'anàlisi i es va establir un nou dendrograma (figura 4.2.). En la nova classificació, els individus es van agrupar en dos clústers diferenciats: l'A i el B. El clúster A, format per 16 individus, presentava una mitjana poblacional de 53,1 quiasmes per metafase (rang entre 50,2 i 55,9) i el clúster B, format per 14 individus, en presentava 47,9 (rang entre 43,1 i 50,5).

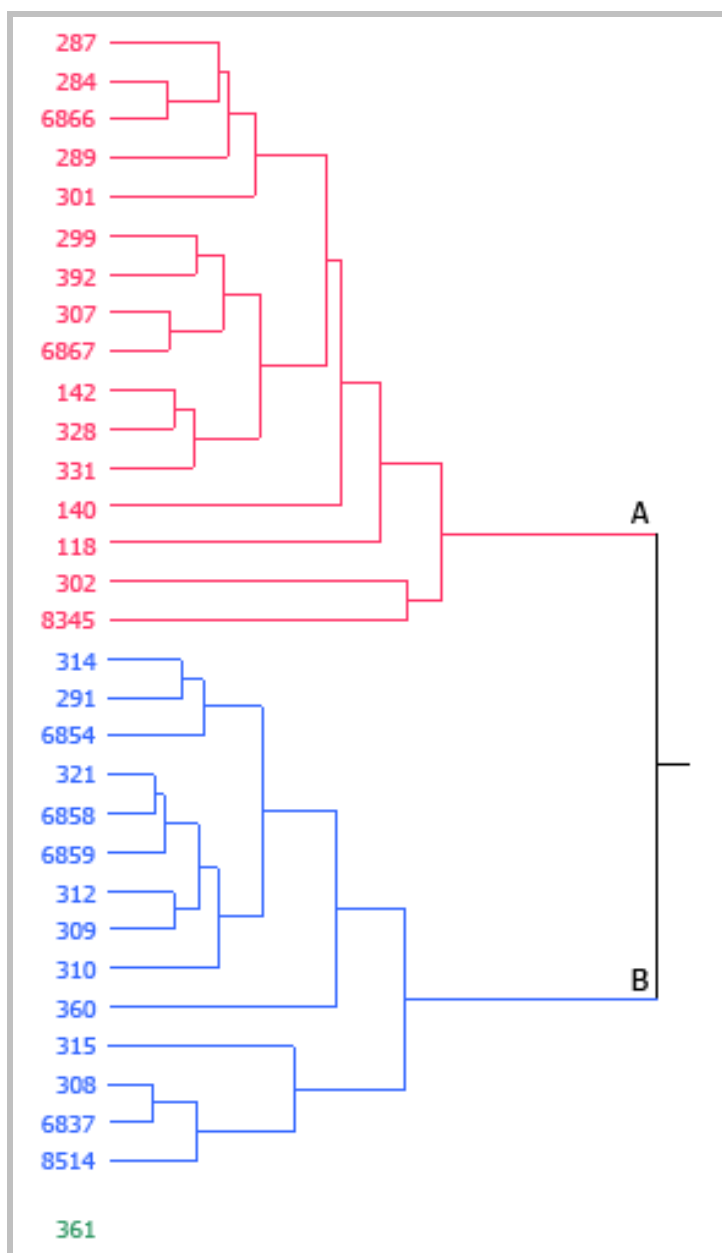
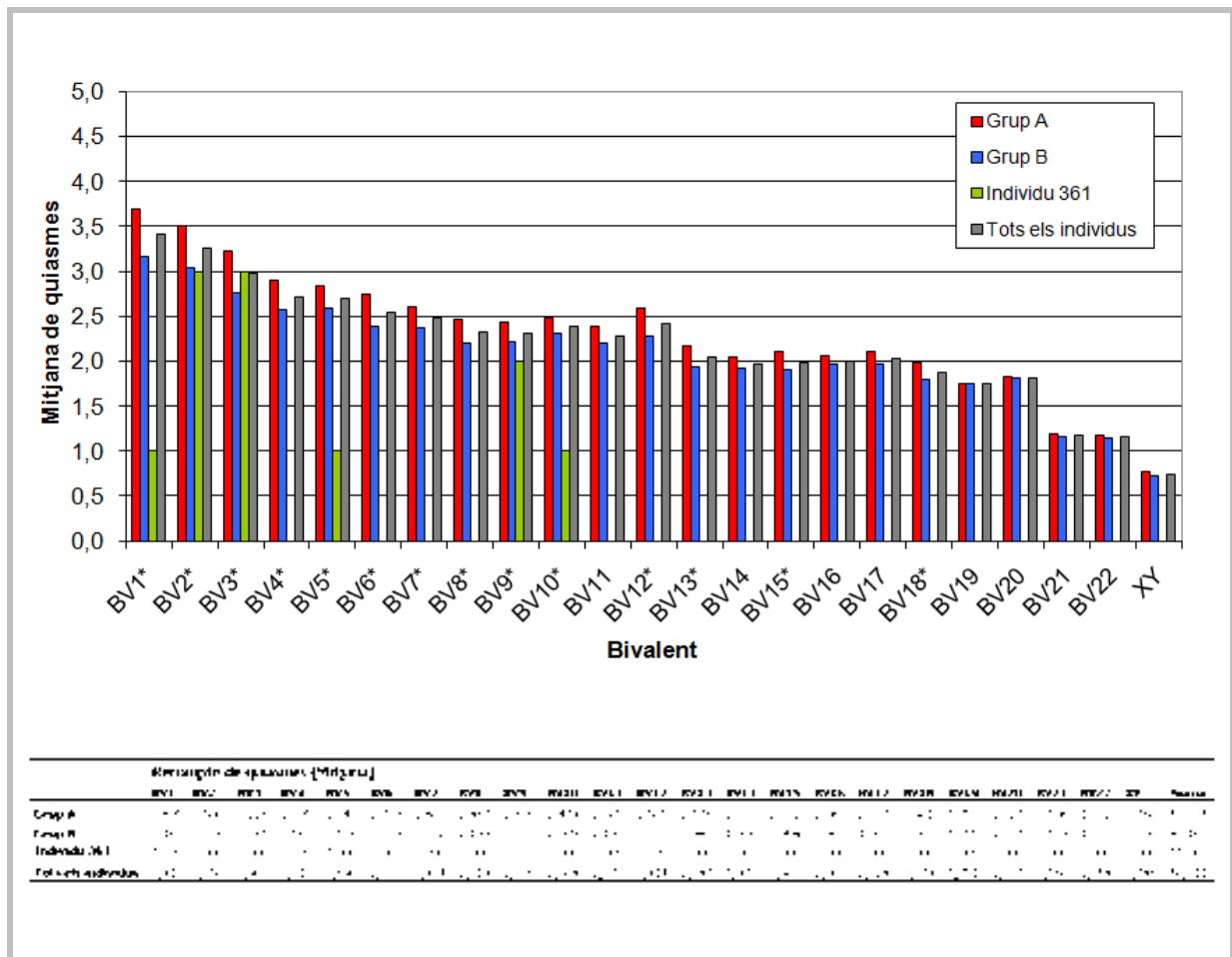


Figura 4.2. Dendrograma resultant d'excloure l'individu 361.



En el clúster A les mitjanes de quiasmes de més de la meitat dels bivalents (14/23) varen ser superiors a les mitjanes poblacionals (figura 4.3.). Els mateixos cromosomes varen mostrar mitjanes de quiasmes significativament inferiors en el clúster B. La majoria d'aquests bivalents estaven formats per cromosomes mitjans o grans. Pel que fa a l'individu 361, aquest presentava els recomptes de quiasmes més baixos de tots els observats.



**Figura 4.3.** Gràfic de barres on es mostren les mitjanes de quiasmes de cadascun dels bivalents pel clúster A, el clúster B, l'individu 361 i les mitjanes de tots els individus junts. La taula mostra els valors a partir dels quals s'ha construït el gràfic. \*Bivalents que presenten diferències significatives respecte a la mitjana poblacional en el clúster A i B.

### B. Modelització segons clústers

Es van establir models de regressió de Poisson per tal d'analitzar i quantificar les possibles diferències entre els clústers A i B del dendrograma. Les diferències observades van ser estadísticament significatives ( $F=102,61$ ;  $p<0,0001$ ).

Es van calcular els valors esperats de recomptes de quiasmes per metafase d'aquests dos clústers (taula 4.5.), i es va poder establir que de mitjana s'esperaria trobar un 10% més de quiasmes en el clúster A que en el clúster B (RR:1,102;  $p < 0,0001$ ).

Clúster	Mitjana esperada de quiasmes per bivalent	Mitjana esperada de quiasmes per metafase
A	2,18	50,1
B	1,98	45,5

**Taula 4.5.** Valors esperats de recomptes de quiasmes (per BV i per metafase) de les dues categories de la variable explicativa "grups d'individus definits a partir de l'anàlisi de clústers", calculats a partir del model de regressió de Poisson establert.

### C. Modelitzacions segons cariotip i seminograma

Es va analitzar si hi havia diferències significatives en les freqüències de quiasmes obtingudes en cada cèl·lula segons les variables explicatives del cariotip i del seminograma. Tal com ja s'ha descrit a l'apartat de material i mètodes, per la variable "cariotip" es van definir dues categories: "46,XY" i "46,XY (polimorfisme)", i per la variable "seminograma" se'n van definir tres: "normal", "anormal no OAT" i "anormal OAT" (taula 3.10.). Les diferències observades entre les categories de cada variable van ser significatives, tant pel cariotip ( $F=14,92$ ;  $p=0,0001$ ) com pel seminograma ( $F=9,50$ ;  $p < 0,0001$ ). Els valors esperats de recomptes de quiasmes per metafase que es van calcular a partir del model, es detallen a la taula 4.6.

Variable	Categoria	Mitjana esperada de quiasmes per bivalent	Mitjana esperada de quiasmes per metafase
Cariotip	46,XY	2,10	48,4
	46,XY (polimorfisme)	1,97	45,2
Seminograma	Normal	2,17	49,8
	Anormal no OAT	2,10	48,3
	Anormal OAT	2,03	46,7

**Taula 4.6.** Valors esperats de recomptes de quiasmes (per BV i per metafase) de les dues categories de les variables explicatives "cariotip" i "seminograma"; calculats a partir del model de regressió de Poisson establert.

En el cas del cariotip es va establir que, de mitjana, s'esperaria trobar un 7% menys de quiasmes en el la categoria "46,XY (polimorfisme)" que en la categoria "46,XY" (RR:1,070;  $p=0,0001$ ) (annex 7.2., pàgina 150). D'altra banda, analitzant les diferents categories del seminograma, es va establir que s'esperaria trobar un 7% menys de quiasmes en la categoria "anormal OAT" que en la categoria "normal" (RR:1,067;  $p=0,0002$ ), i un 3% menys de quiasmes en la categoria "anormal OAT" que en la categoria "anormal no OAT" (RR:1,034;  $p=0,0082$ ). Els valors esperats de quiasmes de les categories "normal" i "anormal no OAT" no van presentar diferències significatives (RR:0,969;  $p=0,1254$ ) (annex 7.2., pàgina 152).

#### D. Anàlisi d'integració de variables

En el clúster A, les diferències observades en els recomptes de quiasmes tenint en compte la interacció entre les variables "cariotip" i "seminograma" van ser significatives ( $F=3,81$ ;  $p=0,0096$ ).

Els valors esperats de recomptes de quiasmes per metafase per cadascuna de les combinacions possibles entre les categories del cariotip i del seminograma, es detallen a la taula 4.7.

Quan es van comparar dos a dos les 4 categories obtingudes en el clúster A (detallades a la 4.10.), només es van observar diferències significatives entre "46,XY (polimorfisme) + normal" i "46,XY + normal" ( $t=2,94$ ;  $p=0,0176$ ) (veure annex 7.2., pàgina 155).

Interacció entre les variables:		Mitjana esperada de quiasmes per bivalent	Mitjana esperada de quiasmes per metafase
Cariotip	Seminograma		
46,XY	Normal	2,11	48,46
46,XY	Anormal no OAT	2,15	49,52
46,XY	Anormal OAT	2,19	50,43
46,XY (polimorfisme)	Normal	2,23	51,26

**Taula 4.7.** Valors esperats de recomptes de quiasmes (per BV i per metafase) de les diferents combinacions possibles entre les categories del cariotip i les del seminograma en el clúster A. Valors calculats a partir del model de regressió de Poisson establert.

En el clúster B, les diferències observades en els recomptes de quiasmes tenint en compte la interacció entre les variables "cariotip" i "seminograma" també van ser significatives ( $F=7,40$ ;  $p<0,0001$ ).

Els valors esperats de recomptes de quiasmes per metafase per cadascuna de les combinacions possibles entre les categories del cariotip i del seminograma en aquest clúster, es detallen a la taula 4.8.

Quan es van comparar dos a dos les 4 categories obtingudes en el clúster B, es van observar diferències significatives en dues d'aquestes comparacions. Una d'elles va ser entre "46,XY (polimorfisme) + Anormal OAT" i "46,XY + Anormal no OTA" ( $t=-4,48$ ;  $p<0,0001$ ), i l'altre, entre "46,XY (polimorfisme) + Anormal OAT" i "46,XY + Anormal OAT" ( $t=-3,85$ ;  $p=0,0007$ ) (veure annex 7.2., pàgina 157).

Interacció entre les variables:		Mitjana esperada de quiasmes per bivalent	Mitjana esperada de quiasmes per metafase
Cariotip	Seminograma		
46,XY	Normal	2,03	46,70
46,XY	Anormal no OAT	2,02	46,45
46,XY	Anormal OAT	2,03	46,66
46,XY (polimorfisme)	Anormal OAT	1,75	40,26

**Taula 4.8.** Valors esperats de recomptes de quiasmes (per BV i per metafase) de les diferents combinacions possibles entre les categories del cariotip i les del seminograma en el clúster B. Valors calculats a partir del model de regressió de Poisson establert.

### 4.1.2. Relació de proximitat al bivalent sexual

Es van identificar els bivalents autosòmics més propers al bivalent sexual en les 279 metafases I que presentaven tots els cromosomes en forma de bivalent (taula 4.2.).

#### A. Anàlisi de bivalents individuals

Les mitjanes dels valors de "zeros" i "uns" assignats a cada bivalent es mostren a la taula 4.9. Tots els bivalents autosòmics es van observar propers al bivalent sexual en alguna de les metafases I analitzades. Els bivalents que van presentar valors més elevats, i que per tant tendien a quedar més propers al bivalent sexual, varen ser el 15, el 22, el 14, el 7 i el 21.

A l'analitzar la probabilitat que tenia cada bivalent autosòmic de ser proper al bivalent sexual respecte a la resta de bivalents, es va observar que els bivalents 22 i 15 es trobaven significativament més propers que els altres ( $p=0,011$  i  $p=0,014$ , respectivament).

Codi	Estimació de la proximitat de cada BV autosòmic al BV sexual (mitjana)																						
	Pacient	BV1	BV2	BV3	BV4	BV5	BV6	BV7	BV8	BV9	BV10	BV11	BV12	BV13	BV14	BV15	BV16	BV17	BV18	BV19	BV20	BV21	BV22
287	0,00	0,20	0,20	0,30	0,40	0,30	0,40	0,00	0,50	0,40	0,30	0,20	0,40	0,30	0,40	0,20	0,40	0,00	0,10	0,10	0,20		
284	0,33	0,33	0,33	0,22	0,33	0,33	0,22	0,33	0,22	0,33	0,44	0,22	0,11	0,33	0,44	0,22	0,44	0,00	0,33	0,22	0,11	0,33	
6866	0,14	0,00	0,00	0,14	0,14	0,43	0,14	0,57	0,14	0,43	0,57	0,29	0,43	0,14	0,14	0,43	0,29	0,43	0,29	0,43	0,29	0,71	
289	0,00	0,17	0,00	0,33	0,17	0,50	0,50	0,50	0,17	0,33	0,33	0,17	0,33	0,33	0,33	0,33	0,17	0,00	0,17	0,33	0,00		
301	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	0,67	0,67	0,00	0,33	0,67	0,67	0,33	0,33	0,00	0,33	0,00	0,67	0,00	0,00	0,33	0,33	
299	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,33	0,00	0,33	0,33	0,17	0,33	0,00	0,50	0,33	0,33	0,17	0,00	0,17	0,17	0,00	0,17	0,17	
392	0,30	0,30	0,40	0,10	0,20	0,33	0,40	0,20	0,20	0,30	0,50	0,40	0,00	0,40	0,30	0,40	0,30	0,10	0,10	0,10	0,30	0,30	
307	0,20	0,30	0,50	0,10	0,10	0,40	0,20	0,30	0,20	0,20	0,30	0,40	0,50	0,40	0,10	0,20	0,40	0,00	0,30	0,10	0,10	0,40	
6867	0,50	0,33	0,33	0,33	0,50	0,33	0,00	0,33	0,00	0,17	0,17	0,33	0,33	0,50	0,33	0,17	0,67	0,17	0,33	0,33	0,50	0,00	
142	0,00	0,13	0,50	0,38	0,25	0,25	0,00	0,38	0,25	0,00	0,25	0,38	0,00	0,13	0,25	0,13	0,25	0,13	0,50	0,25	0,25	0,13	
328	0,35	0,27	0,12	0,27	0,23	0,19	0,27	0,19	0,19	0,27	0,31	0,27	0,27	0,46	0,42	0,35	0,15	0,35	0,23	0,31	0,19	0,27	
331	0,11	0,42	0,11	0,11	0,37	0,26	0,37	0,11	0,21	0,37	0,11	0,21	0,11	0,16	0,26	0,37	0,26	0,37	0,21	0,11	0,32	0,32	
140	0,50	0,25	0,00	0,25	0,00	0,25	0,50	0,00	0,25	0,25	0,50	0,75	0,00	0,25	0,25	0,50	0,00	0,25	0,00	0,50	0,25	0,50	
118	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,50	0,50	0,00	0,00	0,50	0,00	1,00	0,50	0,00	0,50	1,00	0,50	0,00	1,00	
302	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,00	0,00	0,50	0,00	0,50	0,00	0,00	1,00	0,50	1,00	0,50	1,00	0,00	0,50
8345	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
314	0,00	0,67	0,17	0,33	0,00	0,33	0,67	0,33	0,33	0,17	0,17	0,33	0,17	0,17	0,00	0,33	0,33	0,17	0,00	0,33	0,17	0,17	
291	0,33	0,25	0,25	0,33	0,25	0,25	0,42	0,17	0,08	0,25	0,00	0,17	0,33	0,17	0,50	0,33	0,08	0,25	0,42	0,25	0,17	0,17	
6854	0,50	0,50	0,00	1,00	0,00	1,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,50	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50	
321	0,20	0,40	0,40	0,30	0,50	0,00	0,30	0,20	0,20	0,20	0,30	0,20	0,50	0,10	0,40	0,30	0,60	0,00	0,20	0,20	0,30	0,50	
6858	0,44	0,22	0,41	0,22	0,33	0,19	0,30	0,33	0,26	0,41	0,26	0,44	0,30	0,30	0,30	0,22	0,22	0,15	0,37	0,30	0,30	0,33	
6859	0,43	0,17	0,22	0,26	0,26	0,13	0,09	0,17	0,26	0,52	0,48	0,13	0,13	0,39	0,22	0,26	0,26	0,17	0,22	0,30	0,39	0,39	
312	0,20	0,25	0,23	0,27	0,16	0,20	0,30	0,18	0,27	0,18	0,27	0,11	0,30	0,34	0,41	0,07	0,20	0,25	0,27	0,20	0,41	0,36	
309	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50	0,00	0,50	0,25	0,00	0,25	0,25	0,25	0,00	0,25	0,25	0,25	0,25	0,00	0,75	0,50	0,00	0,50	
310	0,55	0,10	0,09	0,00	0,27	0,30	0,55	0,18	0,18	0,27	0,27	0,09	0,27	0,36	0,27	0,36	0,64	0,18	0,18	0,45	0,27	0,00	
360	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50	0,50	1,00	
315	0,20	0,20	0,40	0,10	0,20	0,40	0,20	0,10	0,20	0,00	0,10	0,00	0,20	0,10	0,30	0,20	0,10	0,20	0,30	0,10	0,40	0,40	
308	0,25	0,25	0,00	0,25	0,25	0,25	0,25	0,00	0,50	0,25	0,25	0,25	0,00	0,25	0,75	0,25	0,50	0,00	0,25	0,50	0,75	0,25	
6837	0,33	0,33	0,33	0,00	0,33	0,00	0,33	0,00	0,33	0,67	0,00	0,33	0,33	0,67	0,67	1,00	0,00	0,33	0,33	0,00	0,33	0,33	
8514	0,33	0,50	0,17	0,33	0,00	0,33	0,33	0,17	0,67	0,50	0,17	0,33	0,33	0,17	0,17	0,17	0,17	0,33	0,17	0,50	0,33	0,67	
361	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tots els individus	0,26	0,26	0,23	0,23	0,24	0,26	0,29	0,22	0,24	0,28	0,28	0,24	0,25	0,30	0,33	0,26	0,26	0,22	0,26	0,25	0,29	0,33	

**Taula 4.9.** Estimació de la proximitat de cada bivalent autosòmic al bivalent sexual. Els nombres detallats a la taula són les mitjanes dels valors de "0" (bivalent autosòmic no proper al bivalent sexual) i de "1" (bivalent autosòmic proper al bivalent sexual) assignats a cadascun dels bivalents.

BV: bivalent.

## B. Anàlisi de grups de bivalents

Es va avaluar si alguns bivalents, formats per cromosomes amb característiques morfològiques i de mida similars, s'observaven més freqüentment propers al bivalent sexual (taula 4.10.).

Grup	Bivalents inclosos	Estimació de proximitat (Percentatge)
A	1,2,3	25
B	4,5	24
C	6,7,8,9,10,11,12	26
D	13,14,15	29
E	16,17,18	25
F	19,20	25
G	21,22	31

**Taula 4.10.** Estimació de la proximitat dels diferents grups de bivalents.

Els grups que van presentar valors més elevats varen ser el grup D i el grup G. Quan es va analitzar la probabilitat que tenia cada grup de bivalents de ser proper al bivalent sexual

respecte dels altres grups, dos d'ells van presentar diferències significatives. El grup B, que incloïa els bivalents 4 i 5, per no proximitat al bivalent sexual ( $p=0,038$ ), i el grup G, que incloïa els cromosomes 21 i 22, per estar-hi més freqüentment propers ( $p=0,030$ ).

No es van observar patrons característics d'individu pel que fa a les proximitats dels diferents grups de bivalents al bivalent sexual (Anàlisi multivariant de correspondències múltiples, veure annex 7.2. pàgines 164-166).

### 4.1.3. Anàlisi dels cromosomes a l'estadi de metafase II

Es van analitzar un total de 124 metafases II. En el 37% (13/37) dels individus no es van observar cèl·lules en aquest estadi de divisió (taula 4.11.). La mitjana de metafases II analitzada per individu va ser de  $5,2 \pm 4,3$  (rang: 1-18).

Codi Pacient	Nº de MII analitzades	Codi Pacient	Nº de MII analitzades
072	0	314	7
118	0	315	0
140	0	321	2
142	4	323	0
282	0	328	7
284	3	331	3
285	0	360	0
287	11	361	0
289	0	392	3
291	2	6837	0
299	4	6854	0
300	2	6858	7
301	7	6859	18
302	0	6866	14
307	4	6867	7
308	2	8345	1
309	1	8362	1
310	8	8514	1
312	5		

**Taula 4.11.** Nombre de metafases II analitzades per cadascun dels individus inclosos a l'estudi.

En un total de 116 metafases es van poder comptar i analitzar totes les unitats cromosòmiques. El 47,4% de les metafases es van classificar com a normals, el 18,1% presentava cromosomes amb les cromàtides separades, 13,8% mostrava formes no esperades, el 3,4% presentava pèrdues d'una cromàtide en algun cromosoma i el 14,7% eren aneuploides (taula 4.12.). Un 2,6% de les metafases eren diploides.

Característiques Metafase II						
Codi	Normal	Separació cromàtides	Formes no esperades <sup>1</sup>	Pèrdua cromàtide	Aneuploidia	46,X,Y
Pacient						
287	6 (54,5%)	3 (27,3%)	2 (18,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
284	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
6866	8 (61,5%)	1 (7,7%)	2 (15,4%)	0 (0,0%)	2** (15,4%)	0 (0,0%)
289	-	-	-	-	-	-
301	3 (42,9%)	1 (14,2%)	3 (42,9%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
299	3 (75,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1* (25,0%)	0 (0,0%)
392	2 (66,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (33,3%)	0 (0,0%)
307	2 (50,0%)	0 (0,0%)	2 (50,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
6867	2 (28,6%)	0 (0,0%)	1 (14,3%)	0 (0,0%)	4** (57,1%)	0 (0,0%)
142	3 (60,0%)	1 (20,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (20,0%)
328	4 (57,1%)	2 (28,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (14,3%)
331	0 (0,0%)	2 (66,7%)	0 (0,0%)	1* (33,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
140	-	-	-	-	-	-
118	-	-	-	-	-	-
302	-	-	-	-	-	-
8345	1 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
314	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
291	1 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
6854	-	-	-	-	-	-
321	0 (0,0%)	1 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
6858	5 (71,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2* (28,6%)	0 (0,0%)
6859	6 (35,2%)	1 (5,9%)	2 (11,8%)	2* (11,8%)	5 (29,4%)	1 (5,9%)
312	0 (0,0%)	4 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
309	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1* (100,0%)	0 (0,0%)
310	3 (37,5%)	3 (37,5%)	1 (12,5%)	1 (12,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
360	-	-	-	-	-	-
315	-	-	-	-	-	-
308	2 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
6837	-	-	-	-	-	-
8514	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (100,0%)	0 (0,0%)
361	-	-	-	-	-	-
072	-	-	-	-	-	-
282	-	-	-	-	-	-
285	-	-	-	-	-	-
300	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
323	-	-	-	-	-	-
8362	1 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<b>Tots els individus</b>	<b>55 (47,4%)</b>	<b>21 (18,1%)</b>	<b>16 (13,8%)</b>	<b>4 (3,4%)</b>	<b>17 (14,7%)</b>	<b>3 (2,6%)</b>

**Taula 4.12.** Classificació de les metafases II analitzades segons les característiques dels cromosomes.

<sup>1</sup> aquesta categoria inclou metafases amb trencaments de cromàtide i metafases amb cromàtides asimètriques.

\* totes les metafases d'aquesta categoria presentaven cromosomes amb formes no esperades.

\*\* una de les metafases d'aquesta categoria presentava cromosomes amb formes no esperades.

A la taula 4.13. es detallen les característiques morfològiques dels cromosomes a metafase II, les pèrdues de cromàtide i les aneuploidies observades. El 91,6% dels cromosomes van mostrar





Codi Pacient	Característica del cr.	Cromosoma																						Tots els cr.						
		cr.1	cr.2	cr.3	cr.4	cr.5	cr.6	cr.7	cr.8	cr.9	cr.10	cr.11	cr.12	cr.13	cr.14	cr.15	cr.16	cr.17	cr.18	cr.19	cr.20	cr.21	cr.22	cr.sexual	Nº	%				
118	Normal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Separació crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Trencament crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crt. asimètrica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pèrdua crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Aneuploidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nº de cr.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
302	Normal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Separació crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Trencament crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crt. asimètrica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pèrdua crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Aneuploidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nº de cr.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8345	Normal	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	23	100,0	
	Separació crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
	Trencament crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
	Crt. asimètrica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
	Pèrdua crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
	Aneuploidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
Nº de cr.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	23	100,0		
314	Normal	1	2	3	3	3	1	3	3	2	2	3	2	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	64	92,8	
	Separació crt.	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	4,3	
	Trencament crt.	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,4	
	Crt. asimètrica	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,4	
	Pèrdua crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
	Aneuploidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
Nº de cr.	3	3	4	3	3	2	3	3	2	2	3	2	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	7	69	100,0	
291	Normal	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	24	100,0
	Separació crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
	Trencament crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
	Crt. asimètrica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
	Pèrdua crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
	Aneuploidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
Nº de cr.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	24	100,0	
6854	Normal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Separació crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Trencament crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Crt. asimètrica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Pèrdua crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Aneuploidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Nº de cr.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
321	Normal	1	1	1	-	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	22	95,7
	Separació crt.	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4,3	
	Trencament crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
	Crt. asimètrica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
	Pèrdua crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
	Aneuploidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
Nº de cr.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	23	100,0	
6858	Normal	6	6	7	6	7	6	6	7	7	6	6	6	5	6	7	7	7	6	7	7	7	7	7	7	7	7	5	147	92,5
	Separació crt.	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	1,9
	Trencament crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
	Crt. asimètrica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
	Pèrdua crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	
	Aneuploidia	-	1	-	1	-	1	1	-	-	-	1	-	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0,6
Nº de cr.	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	7	6	7	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	159	100,0	
6859	Normal	13	13	14	16	17	16	15	17	16	18	16	15	15	14	14	16	16	15	15	15	17	18	14	11	351	85,4			
	Separació crt.	2	2	1	-	-	-	1	1	1	-	-	-	1	1	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	14	3,4		
	Trencament crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0		
	Crt. asimètrica	2	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	6	1,5		
	Pèrdua crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,5		
	Aneuploidia	1	2	1	2	1	2	2	-	1	-	2	2	2	3	2	1	2	1	2	1	-	3	5	38	9,2				
Nº de cr.	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	17	18	18	18	18	18	18	18	16	411	100,0				
312	Normal	2	1	1	2	3	1	1	2	2	-	2	2	2	3	4	3	3	2	4	3	3	3	5	54	67,5				
	Separació crt.	2	3	3	2	1	2	2	2	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	25	31,3				
	Trencament crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0		
	Crt. asimètrica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,3		
	Pèrdua crt.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0		
	Aneuploidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0		
Nº de cr.	4	4	4	4	4	3	3	4	3	1	3	3	2	4	4	4	3	2	4	4	4	4	5	80	100,0					
309	Normal	1	-	1																										



## 4.2. Estudis de FISH en espermatozoides

### - Individus control

Es van analitzar un total de 63.811 espermatozoides pels cromosomes X, Y i 18 ( $10.635 \pm 438$  espermatozoides/individu) i 62.345 espermatozoides pels cromosomes 13 i 21 ( $10.390 \pm 192$  espermatozoides/individu). A partir dels resultats obtinguts, es van establir les freqüències basals de disomies, i diploidies (taula 4.14.).

Codi individu	Disomies								Diploidies	
	Cr.13		Cr.18		Cr.21		Cr.XY		Nº	%
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
C1	10/10535	0,09	5/10979	0,05	7/10535	0,07	29/10979	0,26	54/21514	0,25
C2	4/10624	0,04	0/10754	-	9/10624	0,08	11/10754	0,10	100/21378	0,47
C3	5/10477	0,05	3/10150	0,03	7/10477	0,07	25/10150	0,25	17/20627	0,08
C4	9/10292	0,09	3/11223	0,03	14/10292	0,14	23/11223	0,20	43/21515	0,20
C5	10/10323	0,10	3/10560	0,03	8/10323	0,08	21/10560	0,20	21/20883	0,10
C6	1/10094	0,01	8/10145	0,08	2/10094	0,02	11/10145	0,11	47/20239	0,23
Freqüència basal	39/62345	0,06	22/63811	0,03	47/62345	0,07	120/63811	0,19	282/126156	0,22

**Taula 4.14.** Disomies pels cromosomes 13, 18, 21 i sexuals i diploidies observades en individus control.

### - Individus infèrtils

Dels individus que consultaven per problemes de fertilitat es van analitzar 164.156 espermatozoides en l'estudi dels cromosomes X, Y i 18 ( $515 \pm 138,34$  espermatozoides/individu) i 160.226 espermatozoides en el cas dels cromosomes 13 i 21 ( $502 \pm 123,88$  espermatozoides/individu).

### A. Anàlisi individual

L'estudi individualitzat dels 319 pacients va mostrar 49 individus (15,36%) amb increments significatius en les freqüències d'anomalies per, com a mínim, un dels cromosomes analitzats (taula 4.15.). El 35% (17/49) d'aquests individus mostrava increments exclusius d'espermatozoides diploidies, el 29% (14/49) de disomies dels cromosomes sexuals, i el 16% (8/49) presentava incidències incrementades de les dues anomalies alhora. La resta d'individus mostraven altres combinacions menys freqüents (figura 4.4.).

Els percentatges que revelaven increments significatius eren moderats i estaven compresos entre el 0,54% i el 4,92% (mitjana: 1,41%  $\pm$ 1%). Cal destacar que les disomies dels cromosomes 13 i 18 varen ser en tots els casos equivalents a les de la població control; havent exclòs d'aquesta valoració els 3 individus amb cariotip 45,XY,der(13;14)(q10;q10).

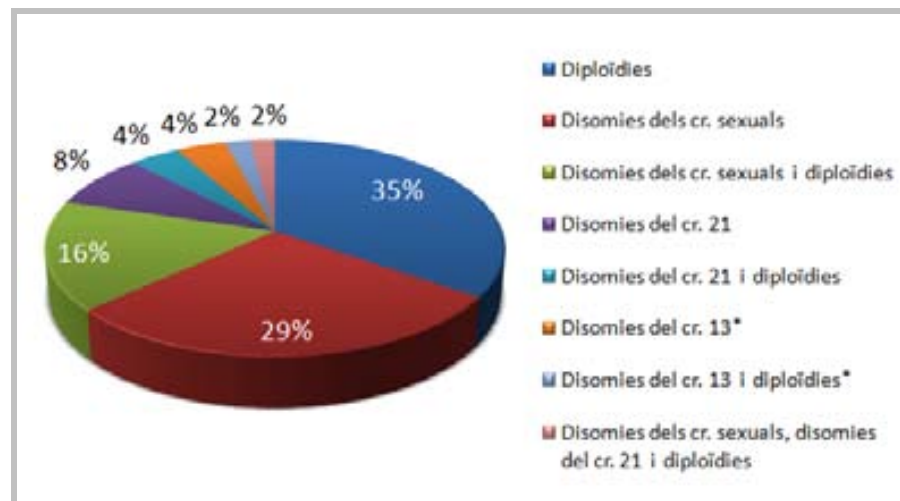
## Resultats

Codi pacient	Seminograma	Edat	Cariotip	Estudi meiòtic	Disomies (%)				Diploidies (%)
					Cr.13	Cr.18	Cr.21	Cr.XY	
12	OA	31	46,XY	-			1,03	0,87	
16	A	33	46,XY	-			0,93		
17	OAT	29	no avaluat	Anormal (D)			1,10	0,76	
18	O	37	no avaluat	No informatiu			1,61		
24	N	29	46,XY	-			0,79		
26	OA	35	46,XY	-			0,97		
33	OAT	39	46,XY	-			0,96		
39	OAT	33	46,XY	-			0,78	0,71	
42	A	30	46,XY	-				2,67	
48	OA	37	no avaluat	-			0,78		
51	OAT	34	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	Anormal (B)	1,79				
59	OAT	36	46,XY	Anormal (D)			2,25	0,90	
64	AT	45	46,XY,inv9(p11q12)	Anormal (D)				1,08	
70	AT	36	46,XY	Normal				0,59	
86	OAT	29	46,XY,1qh+	Anormal (D)			1,14	1,27	
99	AT	33	no avaluat	-			1,00		
112	OAT	45	46,XY	Anormal (D)			3,15		
118	AT	45	46,XY	Anormal (D)				0,79	
129	OAT	37	46,XY	-			0,98		
140	AT	39	no avaluat	-				0,59	
165	A	36	46,XY	-			0,96		
166	OA	36	46,XY	Anormal (D)				1,26	
172	OA	38	46,XY	Anormal (B)				0,59	
178	OAT	32	46,XY	Normal			1,15	1,76	
180	AT	52	46,XY	Anormal (D)			2,82		
184	A	37	46,XY	Anormal (D)			1,37	0,68	
188	OT	34	46,XY	Anormal (B)				0,77	
191	OAT	37	46,XY	-				0,78	
193	N	39	46,XY	Normal				0,56	
199	OAT	29	no avaluat	Anormal (B)			1,00	3,27	
215	OA	37	46,XY	-			4,49	0,79	
217	OA	38	46,XY	-				0,54	
232	OA	48	46,XY	-				0,68	
233	OAT	36	no avaluat	-			0,88		
242	OA	39	46,XY	Anormal (D)			1,54		
243	OA	38	46,XY	Anormal (D)			1,84		
264	OA	32	46,XY,t(3;16)(p21;q13)	-				2,71	
279	O	35	46,XY	-			1,37	0,77	
286	N	42	46,XY	Anormal (D)			1,93		
287	OA	40	46,XY	-			4,92		
328	OA	34	46,XY,22s+	Anormal (BD)			2,40		
331	OA	39	47,XXY (50%)/46,XY(50%)	-			1,99		
336	OAT	29	46,XY	Anormal (B)				0,57	
355	T	37	46,XY	-				0,96	
356	OA	40	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	-	0,59			0,98	
376	OT	27	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	-	4,30				
388	N	34	46,XY	-				1,97	
398	OA	33	46,XY	No informatiu			1,82	1,40	
399	OA	34	46,XY	-				0,70	

**Taula 4.15.** Percentatge de disomies i diploidies en pacients infèrtils que mostren valors superiors a la població control ( $p < 0,05$ ). De la segona a la cinquena columna s'indiquen el seminograma, l'edat, el cariotip i el resultat de l'estudi meiòtic, respectivament.

B: bloqueig del procés meiòtic; D: desinapsi; BD: bloqueig i desinapsi.

A: Astenozoospermia, AT: Astenoteratozoospermia, N: Normozoospermia, O: Oligozoospermia, OA: Oligoastenozoospermia, OAT: Oligoastenoteratozoospermia, OT: Oligoteratozoospermia, T: Teratozoospermia.



**Figura 4.4.** Incidència de les diferents combinacions d'anomalies en els espermatozoides en el grup d'individus amb increments significatius.

cr.: cromosoma.

\* Individus amb cariotip 45,XY,der(13;14)(q10;q10)

### B. Anàlisi poblacional

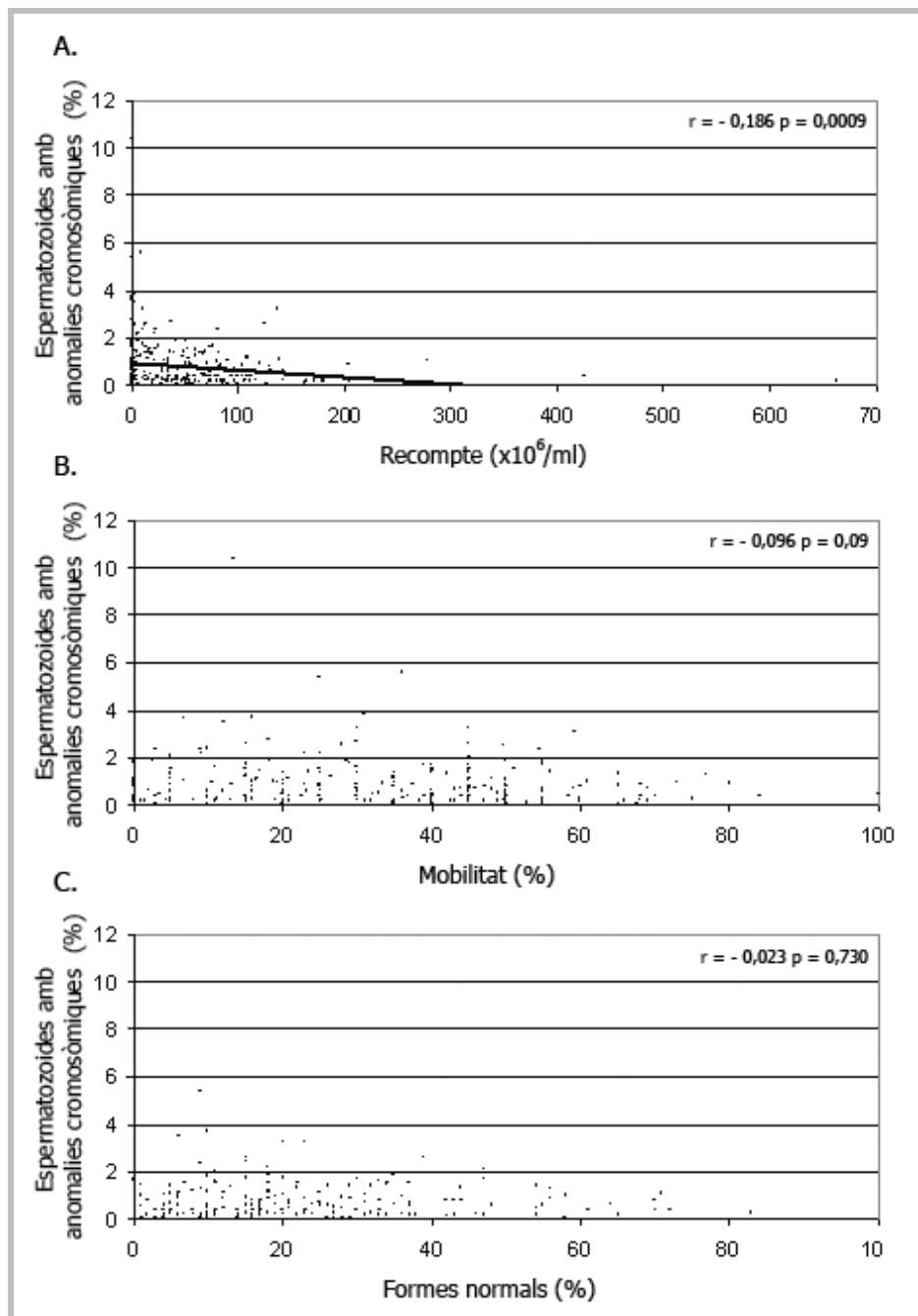
A l'analitzar les anomalies cromosòmiques per tota la població d'estudi, es va observar que les disomies dels cromosomes sexuals (0,41% vs. 0,19%) i les disomies del cromosoma 21 (0,15% vs. 0,07%) varen ser superiors ( $p < 0,05$ ) als percentatges observats en la població control.

Quan es van avaluar els resultats tenint en compte els grups d'individus amb característiques seminals similars, en tots els grups es van observar pacients amb increments d'anomalies cromosòmiques en els seus gàmetes (taula 4.16.). Els pacients oligozoospermics (2/4; 50%), oligoastenozoospermics (17/51; 33,3%), i oligoastenoteratozoospermics (13/62; 21%) varen ser els que van presentar percentatges més elevats, essent d'entre un 5,9% i un 15,4% en la resta de grups. Cal destacar que alguns grups estaven formats per pocs individus i per tant els intervals de confiança dels percentatges eren molt amplis.

Seminograma	Nº individus	Percentatge	Interval de confiança
Astenoteratozoospermia (AT)	6/71	8,5	2,5 – 14,5
Astenozoospermia (A)	4/67	6,0	0,0 – 12,0
Normozoospermia (N)	4/34	11,8	0,8 – 22,8
Oligoastenoteratozoospermia (OAT)	13/62	21,0	11,0 – 31,0
Oligoastenozoospermia (OA)	17/51	33,3	20,3 – 46,3
Oligoteratozoospermia (OT)	2/13	15,4	0,0 – 35,4
Oligozoospermia (O)	2/4	50,0	1,0 – 99,0
Teratozoospermia (T)	1/17	5,9	0,0 – 16,9
<b>Total</b>	<b>49/319</b>	<b>15,36</b>	<b>12,36 – 18,36</b>

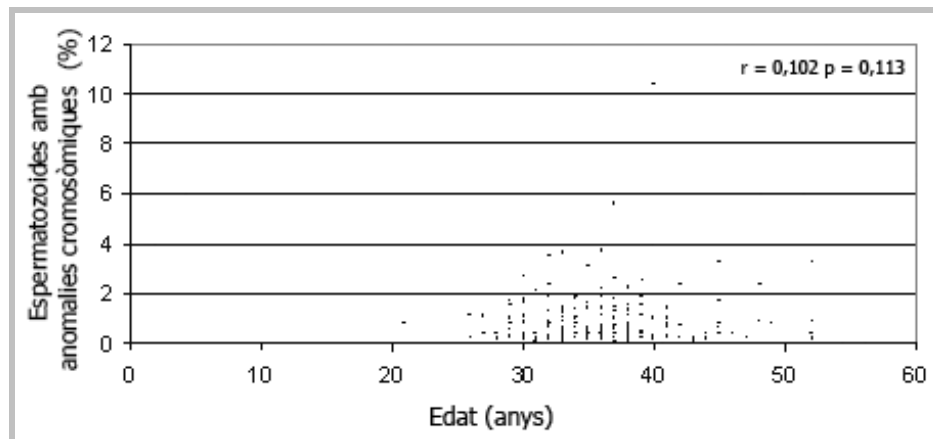
**Taula 4.16.** Pacients amb resultat de FISH en espermatozoides anormal classificats segons els seus paràmetres seminals.

Respecte als tres paràmetres seminals (recompte, mobilitat i morfologia), la disminució en el recompte espermàtic va ser l'únic paràmetre que va mostrar correlació amb el percentatge total d'anomalies cromosòmiques ( $R = -0,186$ ;  $p=0,0009$ ) (figura 4.5.). En relació als cinc genotips analitzats només es va observar correlació per les disomies dels cromosomes sexuals ( $R=-0,158$ ;  $p=0,005$ ) i les diploidies ( $R=-0,124$ ;  $p=0,027$ ).



**Figura 4.5.** Gràfiques que mostren la relació entre el recompte espermàtic (A), la mobilitat (B) i les formes normals (C), i el total d'espermatozoides amb anomalies cromosòmiques.

Quan es van tractar els resultats tenint en compte les edats dels pacients estudiats, no es va observar correlació entre aquest paràmetre i el percentatge d'anomalies cromosòmiques en els espermatozoides ( $R=0,1017$ ;  $p=0,113$ ) (figura 4.6.). També es va comparar la mitjana d'edat dels 34 individus amb increments significatius ( $37\pm 5$  anys; rang 29-52) amb la mitjana d'edat del grup restant d'individus ( $35\pm 5$  anys; rang 21-52) i no es van obtenir diferències significatives ( $p=0,088$ ).



**Figura 4.6.** Gràfica que mostra la relació entre l'edat i el total d'espermatozoides amb anomalies cromosòmiques.

Els resultats també es van avaluar tenint en compte el cariotip dels individus estudiats ( $n=266$ , taula 3.3.). El 14% (34/245) dels individus amb cariotip somàtic normal presentava increments de les anomalies cromosòmiques en els espermatozoides analitzats. En el grup d'individus amb polimorfismes, els increments significatius es van observar en 3 dels 13 individus. Pel que fa al grup de pacients amb anomalies del cariotip, es va excloure de l'anàlisi estadística el pacient amb cariotip 47,XY,mar+ ja que es desconeixia la procedència del cromosoma marcador. A més a més, només es van tenir en compte els increments en les anomalies cromosòmiques quan no afectaven a cromosomes implicats en les alteracions. En aquest subgrup, 1 dels 7 pacients analitzats va mostrar increments significatius.

Finalment, es van analitzar els resultats tenint en compte el resultat meiòtic (procedent de l'historial clínic dels pacients). En aquest cas, el 8,3% (3/36) dels individus que presentaven un resultat meiòtic normal mostraven increments significatius en les anomalies cromosòmiques dels seus gàmetes, i el percentatge era del 26,5% (18/68) en els que presentaven un estudi meiòtic normal (taula 4.17.).

Estudi meiòtic	Nº individus	Percentatge	Interval de confiança
Normal	3/36	8,3	0,0 – 17,3
Alterat	Desinapsis	12/55	21,8
	Bloqueig	5/11	45,5
	Desinapsis i bloqueig	1/2	50,0
No informatiu	2/9	22,2	0,0 – 49,2
<b>Total</b>	<b>23/113</b>	<b>20,4</b>	<b>13,4 – 27,4</b>

**Taula 4.17.** Pacients amb anomalies cromosòmiques en els espermatozoides classificats segons el resultat de l'estudi meiòtic.

La integració de les dades dels individus que presentaven increments significatius (taula 4.15.), va mostrar que el 69% (34/49) dels pacients presentaven baix recompte espermàtic. A més a més, el 19% (8/42) tenien un cariotip anormal. Dels pacients als que se'ls havia realitzat un estudi meiòtic en biòpsia testicular, el 78% (18/23) presentaven anomalies, la majoria anomalies sinàptiques (57%; 13/23).



## 5. Discussió



## 5.1. Metafase I

### 5.1.1. Anomalies observades

La valoració del nombre d'unitats cromosòmiques va proporcionar informació rellevant sobre la presència d'anomalies. La majoria de les cèl·lules analitzades presentaven les 23 unitats esperades (67,7%). No obstant, en un percentatge significatiu de metafases es van observar diferents tipus d'alteracions.

La presència d'univalents va ser l'anomalia més observada. La separació podia afectar a un, a dos o a tots els bivalents d'una mateixa metafase. Aquestes dues situacions es correspondrien amb les categories de "desinapsi individual de bivalents" i "desinapsi generalitzada" (revisat per Egozcue et al 2005). Diferents treballs apunten que defectes en els processos d'aparellament, sinapsi i/o recombinació dels cromosomes homòlegs durant la profase I serien els responsables de donar lloc a cromosomes aquiasmàtics (Székvölgyi i Nicolas 2010, Handel i Schimenti 2010). Els univalents que es van observar amb més freqüència corresponien als cromosomes sexuals i als autosòmics de mida petita. Altres estudis també han observat la presència d'univalents corresponents a aquests cromosomes (Skakkebaek et al 1973). Tant els cromosomes sexuals com els dels grups F i G, que són els més petits del cariotip, presenten sovint un únic quiasma (Laurie i Hultén 1985a). Per tant, és d'esperar que qualsevol alteració que afecti negativament als processos de sinapsi i/o recombinació, generi major presència d'univalents pels cromosomes d'aquests grups.

És important remarcar que l'anàlisi numèrica de les metafases només posa de manifest les variacions en el nombre de quiasmes que impliquen la separació dels cromosomes. No obstant, és evident que les reduccions no afecten exclusivament als bivalents constituïts per cromosomes petits o els sexuals. En cromosomes mitjans i grans, els factors que afecten de forma negativa la formació de quiasmes es traduiran majoritàriament en una reducció del nombre d'intercanvis (Laurie i Hultén 1985a).

En la nostra sèrie es van identificar un percentatge notable de metafases I tetraploides (5,6%). Altres autors també descriuen espermatòcits tetraploides, tant a l'estadi de paquitè (Codina-Pascual et al 2006b), com a l'estadi de metafase I (Skakkebaek et al 1973, Koulischer et al 1982). Aquests resultats evidencien l'existència de cèl·lules meiòtiques tetraploides i demostren que els espermatòcits humans, tot i que presentin doble nombre de cromosomes, poden realitzar processos de sinapsi i recombinació. L'origen més probable d'aquests espermatòcits seria una endoreduplicació mitòtica, entesa com la duplicació del DNA en absència de divisió cel·lular.

Algunes metafases mostraven la pèrdua d'un o més bivalents, o només d'un cromosoma; normalment el cromosoma Y. El fet que no s'observés cap metafase I amb els productes

complementaris resultants de fenòmens de no disjunció, fa pensar que la majoria de les variacions per defecte podrien ser degudes a la pèrdua d'algun cromosoma o bivalent al realitzar les extensions.

**5.1.2. Característiques de les anomalies: variabilitat i cromosomes implicats**

Els 31 individus infèrtils analitzats en aquest treball representen una de les sèries més llargues estudiades (taula 5.1. i taula 5.2).

Publicació	Nº individus	Nº quiasmes		
		Mitjana de la sèrie	Per cèl·lula (rang)	Mitjana per individu (rang)
McDermott 1973	15	54,4	45 - 62	52,2 - 57,0
Skakkebaek et al 1973*	16	48,7*	39 - 64*	42,5 - 55,0*
Chandley et al 1976*	87	48,9*	-----	39,3 - 56,3*
Lamont et al 1981	10	49,0	-----	45,5 - 53,1
Laurie i Hultén 1985a*	7	51,33*	40 - 60*	49,6 - 53,7*
Sèrie d'individus d'aquest treball	31	50,3	11 - 61	43,1 - 55,9

**Taula 5.1.** Sèries d'individus infèrtils en les que s'ha estudiat el nombre de quiasmes.

\* nombre de quiasmes calculat a partir dels bivalents autosòmics.

Publicació	Nº individus	Nº de quiasmes		
		Mitjana de la sèrie	Per cèl·lula (rang)	Mitjana per individu (rang)
McDermott 1973	36	52,9	43 - 62	47,2 - 55,5
Skakkebaek et al 1973*	6	51,2*	43 - 57*	49,0 - 54,6*
Lamont et al 1981	16	48,5	-	42,6 - 53,2
Uroz 2009	17	50,3	-	47,4 - 53,4

**Taula 5.2.** Sèries d'individus fèrtils/controls en les que s'ha estudiat el nombre de quiasmes.

\* nombre de quiasmes calculat a partir dels bivalents autosòmics.

Els rangs de quiasmes obtinguts en el nostre estudi varen mostrar amplituds notables, tant en la comparació entre cèl·lules (11-61 quiasmes) com en la comparació entre individus (43,1-55,9 quiasmes). La bibliografia recull diferències importants en el nombre de quiasmes, tant en pacients infèrtils com en individus fèrtils/controls (taula 5.1. i taula 5.2.). Aquesta variabilitat reflecteix les diferències de comportament que presenten les cèl·lules a metafase I. En aquest

sentit, la majoria dels individus analitzats (excloent aquells individus en els que només es van poder avaluar 1 o 2 metafases), presentaven cèl·lules amb alteracions. Aquest resultat suggereix la presència de línies cel·lulars de comportament meiòtic normal i línies cel·lulars amb anomalies. És a dir, indiquen que els processos que produeixen anomalies no afecten totes les cèl·lules per igual.

Pel que fa a la variabilitat entre individus, aquesta va ser superior en les sèries de pacients infèrtils que en les d'individus fèrtils/controls (taula 5.1., taula 5.2.). Aquestes diferències indiquen que la població infèril és més heterogènia pel que fa al nombre de quiasmes. De fet, aquest resultat no és sorprenent si tenim en compte la gran varietat d'etiologies que es relacionen amb la infertilitat (Skakkebaek et al 1994, O'Flynn O'Brien et al 2010).

En aquest treball, la utilització de conglomerats jeràrquics per a l'anàlisi dels resultats va permetre avaluar la variabilitat de la població infèril separant la població en dos clústers (taula 5.3.). La mitjana de quiasmes del clúster A va ser superior a la majoria de mitjanes poblacionals d'individus infèrtils o fèrtils/controls descrites a la bibliografia, i la del clúster B va ser inferior (taula 5.1., taula 5.2. i taula 5.3.). Aquests resultats indiquen que les mitjanes de quiasmes dels estudis publicats són, en molts casos, el resultat d'agrupar pacients amb característiques diferents pel que fa al nombre de quiasmes.

Classificació	Nº individus	Nº quiasmes		
		Mitjana de quiasmes	Per cèl·lula (rang)	Mitjana per individu (rang)
Clúster A	16	53,1	44 - 61	50,2 - 55,9
Clúster B	14	47,9	37 - 58	43,1 - 50,5
Individu 361	1	11,0	11	--
Tota la sèrie	31	50,3	11 - 61	43,1 - 55,9

**Taula 5.3.** Taula resum del nombre de quiasmes per clúster

D'altra banda, la comparació dels resultats dels clústers de la nostra sèrie amb la bibliografia va permetre considerar que el clúster A agrupava individus amb recomptes de quiasmes propers a la normalitat. En canvi, es va considerar que els individus del clúster B, amb la mitjana de quiasmes inferior a les publicades, presentaven una reducció significativa en el nombre de quiasmes. Tal com seria d'esperar, la variabilitat entre individus va ser superior en el clúster B. Reforçant aquesta interpretació, els resultats de les modelitzacions segons clústers apuntaven que s'esperaria trobar un 10% més de quiasmes en el clúster A que en el clúster B. A més a més, el promig esperat de quiasmes al clúster A (50,1 quiasmes) va ser superior als 45,5

quiasmes esperats al clúster B. En resum, podem concloure que el 48,34% (15/31; els 14 individus del clúster B i l'individu 361) dels individus infèrtils analitzats en aquest estudi varen presentar un comportament meiòtic anormal.

La tècnica de M-FISH va permetre avaluar si la reducció en el nombre de quiasmes es donava a l'atzar o afectava preferentment a alguns bivalents. Els bivalents formats per cromosomes mitjans i grans van presentar recomptes de quiasmes inferiors en el clúster B, i de fet, aquests bivalents varen ser els responsables d'establir les diferències entre clústers (figura 4.3.). En canvi, els bivalents formats per cromosomes petits o pels cromosomes sexuals no van presentar diferències. Aquests resultats es podrien interpretar com que la reducció afecta preferentment els bivalents mitjans i grans, i que és aleatòria en la resta. No obstant, cal tenir en compte:

1. Els bivalents de mides mitjanes i grans, probablement pel fet de poder presentar més quiasmes (Laurie i Hultén 1985a), rarament s'observen en forma d'univalent.
2. La univalència és molt més freqüent en els bivalents petits o en el parell de cromosomes sexuals.
3. La presència d'anomalies de sinapsi i recombinació a paquitè i de cromosomes desalineats a la placa metafàsica en la transició metafaseI/anafaseI s'ha relacionat amb l'activació de punts de control i l'eliminació cel·lular (Li et al 2009, Vogt et al 2008).

Així doncs, és possible que l'activació dels punts de control meiòtic elimini cèl·lules amb anomalies i això redueixi la incidència de cèl·lules amb univalents en el clúster B a nivells que podríem interpretar com a basals (similars al del clúster A).

Tot i això, diferents autors descriuen que la reducció en el nombre de quiasmes en individus infèrtils afecta preferentment als bivalents petits o al bivalent format pels cromosomes sexuals (revisat per Egozcue et al 2000a). En aquests bivalents, la reducció en el nombre de quiasmes sovint és relacionada amb la presència d'univalents i per tant amb una variació en el nombre d'unitats cromosòmiques. Aquest fet és molt més evident a l'observació i probablement per aquesta raó es descriu amb més freqüència a la bibliografia.

En relació a l'aparellament dels cromosomes sexuals, estudis a l'etapa de paquitè descriuen que com més elevada és la taxa general de recombinació de l'individu, major és la quantitat de parells XY amb un punt de recombinació (Codina-Pascual et al 2005), i per tant proposen que la recombinació en el parell XY podria ser un indicador del grau de recombinació de l'espermatoïcit, i per tant també de l'individu.

A metafase I els resultats són més controvertits, mentre que alguns autors també descriuen relació entre el nombre de quiasmes a metafase I i la presència dels cromosomes sexuals desaparellats (Chandley et al 1976, Uroz et al 2008), altres estudis no troben cap relació (Laurie i Hultén 1985a). En la sèrie de 31 individus avaluats en el present treball, no es va observar

relació entre aquests dos paràmetres. Tot i que el clúster B presentava reducció en el nombre de quiasmes, els cromosomes sexuals no mostraven diferències entre clústers.

### 5.1.3. Relació amb variables descriptives

#### A. Seminograma

L'estudi realitzat va mostrar que els individus amb seminograma OAT presentaven recomptes de quiasmes més baixos que els de seminograma normal o seminograma anormal no OAT (taula 4.6.).

La relació entre la presència d'anomalies sinàptiques i de recombinació, el bloqueig del procés espermatogènic i els recomptes baixos d'espermatozoides, ha estat descrita per diferents autors (Hultén et al 1970, Navarro et al 1990, Vendrell et al 1999, Egozcue et al 2000a). Aquesta relació rau en l'activació de punts de control a paquitè i a metafase I/anafase I, que bloquejarien i eliminarien cèl·lules meiótiques amb anomalies (revisat per Hunt i Hassold 2002). Depenent del grau d'afectació i de l'eficiència dels mecanismes de control, es podria donar un bloqueig total o parcial de l'espermatogènesi, donant lloc a azoospermia o oligozoospermia més o menys severa.

#### B. Cariotip

El grup d'individus amb polimorfismes va mostrar reducció en el nombre de quiasmes per metafase respecte al grup d'individus amb cariotip somàtic normal (taula 4.6.). Aquests resultats suggereixen que el cariotip polimòrfic i les anomalies en l'espermatogènesi estan relacionats.

El polimorfisme cromosòmic més comú en humans és la inversió pericèntrica del cromosoma 9 (9qh). Diferents estudis relacionen aquestes inversions amb problemes reproductius (Boué et al 1975, Teo et al 1995, Collodel et al 2006). Un altre tipus de polimorfisme que es considera com una variant del cariotip somàtic normal, són els que afecten les regions heterocromàtiques dels cromosomes 1, 9, 16 i Y. La incidència d'aquests en la població d'individus infèrtils és major que en la població general (Eiben et al 1987, Nakamura et al 2001, Penna Videau et al 2001, Yakin et al 2005). Estudis en CS d'aquests individus mostren que la regió d'heterocromatina responsable del polimorfisme presenta més anomalies sinàptiques que regions equivalents no polimòrfiques (Codina-Pascual et al 2006a).

Tant la presència de fragments cromosòmics invertits com la de regions heterocromàtiques grans poden entorpir la progressió meiótica, i donar lloc a regions asinàptiques durant la primera divisió meiótica (Solari et al 1991). Aquestes regions poden interferir en l'aparellament i la segregació d'altres segments desaparellats; fenomen que es coneix amb el nom d'efecte intercromosòmic (Lejeune 1963). Aquest fenomen s'associa tant a individus portadors de variants polimòrfiques com a individus portadors d'anomalies cromosòmiques estructurals.

Els nostres resultats evidencien la presència d'efecte intercromosòmic en els individus amb cariotip polimòrfic, que es manifesta amb una reducció en el nombre de quiasmes. Aquesta reducció indica anomalies en el procés d'aparellament i sinapsi que podrien desencadenar l'activació de mecanismes de control que bloquejarien i eliminarien les cèl·lules amb anomalies. Aquest fet acabaria repercutint en el nombre d'espermatozoides resultants.

La integració dels resultats evidencia que les alteracions en el cariotip somàtic, les anomalies meiòtiques i els seminogrames alterats estan relacionats. Reforça aquesta interpretació el fet que, tenint en compte les dades del cariotip i del seminograma conjuntament, es va observar que els individus OAT amb cariotip polimòrfic varen ser els que van presentar els recomptes de quiasmes més baixos de tots els individus inclosos en el present treball (taula 4.8.).

### 5.1.4. Relació de proximitat al bivalent sexual

Els bivalents 15 i 22, ambdós formats per cromosomes acrocèntrics, es van observar propers al bivalent sexual amb més freqüència que la resta; fet que indica que la distribució dels bivalents a la placa metafàsica no és aleatòria. Aquest resultat és coincident amb altres estudis realitzats en CS que descriuen que el bivalent 15 es troba més freqüentment proper al parell XY que els altres bivalents autosòmics (Metzler-Guillemain et al 1999, Codina-Pascual et al 2006a).

Els cromosomes acrocèntrics humans presenten al braç p una regió organitzadora nucleolar (NOR) i un bloc d'heterocromatina anomenat satèl·lit. S'ha descrit que l'heterocromatina no centromèrica del cromosoma 15 presenta traces d'homologia amb l'heterocromatina no centromèrica del cromosoma Y (Burk et al 1985). A la vegada, algunes regions del braç curt del cromosoma 15 també presenten homologia amb les regions subtèlomèriques Xq/Yq (Brown et al 1990). A més, s'ha demostrat que material del braç curt del cromosoma 15 es troba en alguns cromosomes Y amb satèl·lits al braç q (Yqs) (Martin Lucas et al 1984, Verma et al 1997, Kühl et al 2001, Velissariou et al 2001, Velissariou et al 2007), i també en els braços curts dels cromosomes 13, 14 i 21 com a formes polimòrfiques (Higgins et al 1985, Smeets et al 1991, Stergianou et al 1992, Wilkinson i Crolla 1993, Kühl et al 2001). Ambdues situacions podrien explicar la proximitat dels bivalents formats per cromosomes acrocèntrics al bivalent sexual a l'etapa de paquitè (Metzler-Guillemain et al 1999, Codina-Pascual et al 2006a).

D'altra banda, dades indirectes donen suport a aquests resultats, per exemple el 70% dels casos de translocacions cromosoma Y/autosoma, es produeixen entre l'heterocromatina Yq i el braç curt d'un cromosoma acrocèntric (Gardner i Sutherland 2004). El cromosoma 15 és el que es troba més freqüentment implicat en aquestes reorganitzacions (52%), seguit pel cromosoma 22 (33%), el cromosoma 21 (7%) i els cromosomes 13 i 14 (4% cadascun) (Smith et al 1979). Aquests percentatges probablement reflecteixen els diferents graus d'homologia de les seqüències d'ADN satèl·lit d'aquests cromosomes (Wilkinson i Crolla 1993); essent el 15p, 22p i Yq els que comparteixen una homologia major (revisat per Vogt 1990).



El manteniment d'aquesta proximitat des de l'estadi de paquitè fins al de metafase I, indicaria que la posició relativa dels bivalents, tot i la formació de la placa metafàsica, es trobaria notablement conservada. És important remarcar que no es van observar patrons característics d'individu pel que fa a les proximitats dels bivalents al bivalent sexual. Per tant, aquesta conservació en el posicionament depèn de les característiques intrínseques dels bivalents, probablement relacionat amb la territorialitat que presenten els cromosomes en el nucli interfàsic (revisat per Cremer i Cremer 2010).

## **5.2. Metafase II**

La metafase II és una fase molt ràpida en comparació amb d'altres fases de la meiosi (Ford 1973), i per tant és una etapa poc representada en les preparacions citogenètiques. Durant aquest estadi, els cromosomes presenten un aspecte contret, rinxolat i amb les cromàtides obertes com a resultat de la baixa condensació de la cromatina i de l'absència de cohesines als braços que mantinguin unides les cromàtides germanes (Petronczki et al 2003). Aquestes característiques dificulten l'anàlisi dels cromosomes a MII utilitzant les tècniques citogenètiques clàssiques (Hultén et al 1992, 2001). La incorporació de tècniques d'hibridació *in situ* fluorescent (Sarrate et al 2004 (annex 7.1.1.)) ha permès identificar els cromosomes i caracteritzar les anomalies meiótiques observades en aquesta etapa.

En molts casos, el nombre de metafases II analitzades per individu va ser inferior a 5 (taula 4.11.), no obstant, en la majoria de pacients es va observar alguna metafase amb anomalies (taula 4.12. i taula 4.13.). Les anomalies observades i els cromosomes responsables d'aquestes anomalies varen ser diferents entre individus. Aquest fet indicaria la presència de línies cel·lulars diferents a metafase II, coincidint amb l'observat a metafase I, i també amb el descrit en d'altres treballs publicats (Uroz et al 2008).

Aproximadament la meitat de les metafases II (47,4%; 55/116) es van classificar com a normals. D'altra banda, el 13,8% (16/116) van presentar formes no esperades: cromàtides asimètriques o trencaments de cromàtide. En ambdós casos, l'origen d'aquestes es podria trobar en les característiques pròpies de la cromatina dels cromosomes a l'estadi de metafase II. Les variacions en el grau de condensació i l'absència de cohesines entre els braços de les cromàtides germanes comporta més fragilitat i vulnerabilitat de l'estructura cromatínica, i per tant la fa més susceptible a presentar asimetries i trencaments. Els cromosomes grans varen ser els que es van observar amb alguna d'aquestes anomalies amb més freqüència. Aquest resultat es podria relacionar amb el fet que és més fàcil determinar asimetria quan les cromàtides són llargues que quan són curtes, i que una cromàtide llarga té més possibilitats de trencar-se que una de curta. Tenint en compte aquesta interpretació dels resultats, considerem que el 61,2% (71/116) de les MII eren normals.

El 14,7% (17/116) de les metafases II eren aneuploides. La majoria presentaven nul·lisomies (88%; 15/17), tot i que en alguns casos es van observar disomies dels cromosomes sexuals (11,8%; 2/17). L'absència de quiasmes a metafase I pot conduir a errors en l'orientació dels cromosomes a la placa metafàsica. Aquest fet desencadenarà l'activació de mecanismes de control que eliminaran les cèl·lules amb anomalies (revisat per Vogt et al 2008). No obstant, algunes cèl·lules podrien eludir aquests mecanismes de control i derivar en fenòmens de no disjunció (Hassold i Hunt 2001), donant lloc a disomies i nul·lisomies complementàries. La presència majoritària de nul·lisomies *versus* disomies indica la participació de fenòmens de pèrdua anafàsica (Nath et al 1995, Zijno et al 1996) en la generació d'anomalies. Tot i així, no es pot descartar que algunes siguin el resultat de la pèrdua de cromosomes durant la realització de les extensions cromosòmiques.

La relació entre univalència i no disjunció aquiasmàtica es va fer palesa amb els resultats obtinguts en el present treball. Els cromosomes sexuals varen ser els que es van observar amb més freqüència separats a MI, i també varen ser aquests mateixos cromosomes els responsables de la majoria d'aneuploidies a MII.

També es van observar MII amb la pèrdua d'una cromàtide (3,4%; 4/116). En algunes espècies s'ha descrit que la presència d'un quiasma proper al centròmer dona lloc a la separació precoç de cromàtides germanes a meiosi I (Rockmill et al 2006). Estudis en oòcits de ratolí, descriuen que la bi-orientació en el fus de cromosomes aquiasmàtics podrien originar la separació prematura de les cromàtides durant l'anafase I (Kouznetsova et al 2007). Ambdós mecanismes podrien derivar amb la segregació d'un cromosoma i d'una de les cromàtides del cromosoma homòleg cap al mateix pol i la cromàtide restant cap a l'altre (Hassold i Hunt 2001). En el nostre estudi, no es van trobar MII amb guanys de cromàtide, probablement pel baix nombre de metafases II observades. Aquesta anomalia ja s'havia observat en espermatòcits amb anterioritat (Uroz et al 2008), i de fet és la principal causa d'aneuploidies en oòcits humans (Pellestor et al 2002, Pellestor et al 2006).

En el 18,1% (21/116) de les metafases II es van observar les cromàtides separades. Els cromosomes més grans varen presentar les cromàtides separades amb més freqüència que la resta. Tenint en compte que els cromosomes més grans presentaven reduccions significatives del nombre de quiasmes a MI, es podria deduir que aquesta reducció implica una recombinació aberrant a primera divisió meiótica que es manifesta en una reducció del nombre de quiasmes. S'ha descrit que la reducció va acompanyada de canvis en la localització dels quiasmes que poden donar lloc a la formació d'intercanvis propers al centròmer (Lamb et al 1997).

L'eliminació de les cohesines periquiasmàtiques en la transició metafase I / anafase I implica la pèrdua de cohesió entre cromàtides germanes en cas de la presència de quiasmes propers al

centròmer. Aquest fet pot donar lloc a una pèrdua prematura de cohesió a la segona divisió meiótica (Rockmill et al 2006).

Per últim, el 2,6% (3/116) de les MII varen ser diploides. La bibliografia descriu metafases II d'aquestes característiques (Skakkebaek et al 1973). L'observació d'aquestes metafases, juntament amb la presència d'espermatoïcits primaris tetraploides, evidencia que hi ha cèl·lules espermatogèniques, que tot i que presentin doble nombre de cromosomes, poden realitzar processos de sinapsi, recombinació i segregació.

### **5.3. Espermatozoides**

#### **5.3.1. Característiques de les anomalies: cromosomes implicats**

La bibliografia descriu que els espermatozoides dels individus infèrtils presenten una major incidència d'anomalies cromosòmiques que la població general (revisat per Egozcue et al 2003). Els resultats dels estudis de FISH en espermatozoides d'aquest treball també coincideixen amb aquest fet. Així, el 14% dels individus infèrtils de cariotip somàtic normal varen mostrar increments significatius d'anomalies cromosòmiques en els seus gàmetes. Els increments observats podrien explicar-se per una baixa eficiència dels punts de control; ja fos per errors en la identificació de les cèl·lules amb anomalies, per un mal funcionament del procés d'eliminació, o fins i tot, perquè el nombre de cèl·lules anormals fos massa gran per ser totalment eliminades pels sistemes de control.

Tots els increments significatius d'anomalies cromosòmiques varen ser moderats; compresos entre el 0,54% i el 4,92% (mitjana: 1,41%  $\pm$  1%). Aquests valors coincideixen amb els increments descrits a la bibliografia (Rives et al 1999, Vegetti et al 2000, Calogero et al 2001, Martin et al 2003a).

Els increments significatius d'anomalies cromosòmiques afectaven preferentment el percentatge de disomies pels cromosomes sexuals i el 21, així com el percentatge d'espermatozoides diploides. Les disomies dels cromosomes 13 i 18 varen ser, en tots els casos, equivalents a les de la població control. Aquests resultats concorden amb els resultats dels estudis meiótics obtinguts en aquest treball que mostren que aquests cromosomes són més susceptibles de produir univalents i donar llocs a errors de segregació. De fet, és ben conegut que els cromosomes sexuals i els del grup G presenten més aneuploidies en espermatozoides quan es comparen amb altres cromosomes (Blanco et al 1996, Martin 2008).

La bibliografia recull nombrosos estudis de pacients infèrtils en els que es s'analitza la freqüència d'aneuploidies de diferents cromosomes. Globalment s'han avaluat un total de 652 individus i s'han estudiat els cromosomes: 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 21, 22, X, Y (Moosani et al 1995, Finkelstein et al 1998, Arán et al 1999, Carrell et al 1999, Pang et al 1999, Pfeffer et al 1999, Rives et al 1999, Martin et al 2000, Nishikawa et al 2000, Ushijima et

al 2000, Vegetti et al 2000, Calogero et al 2001, Carrel et al 2001, Härkönen et al 2001, Levron et al 2001, Ohashi et al 2001, Rubio et al 2001, Hristova et al 2002, Templado et al 2002, Martin et al 2003a, Martin et al 2003b, Burrello et al 2004, Tempest et al 2004b, Nagvenkar et al 2005, Pang et al 2005, Mehdi et al 2006, Collodel et al 2007, Faure et al 2007, Durakbasi-Dursun et al 2008). Gairebé en tots els treballs es van avaluar les anomalies pels cromosomes sexuals i un o més autosomes. Revisant els resultats individu per individu, només 2 pacients van mostrar un increment en la taxa d'anomalies d'autosomes (exceptuant el cromosoma 21) i absència d'aneuploidies dels cromosomes sexuals i/o diploidies. Contretament, disomies del cromosoma 18 (Faure et al 2007) i disomies del cromosoma 15 (Carrell et al 2001).

La recopilació dels resultats publicats (n=652) i dels obtinguts en el present treball (n=319) permet afirmar que, exceptuant el cromosoma 21, rarament es dona un increment en la taxa d'anomalies que afecti únicament als autosomes (només 2 dels 971 individus analitzats).

D'altra banda, el 59% (29/49) dels individus amb increments significatius d'anomalies cromosòmiques en els seus espermatozoides presentaven diploidies (taula 4.15.). Un bloqueig anafàsic relacionat amb anomalies sinàptiques que conduïrien a la presència de cromosomes erràtics a metafase I podria derivar en l'absència de citocinesi originant espermatozoides diploides (Egozcue et al 2000a, Zaragoza et al 2000, Egozcue et al 2002). Tot i així, la presència d'espermatozoides poliploides observats en el present treball a MI i MII indica que els espermatozoides diploides també es poden originar com a conseqüència d'errors previs a la meiosi que s'hagin pogut produir durant l'etapa proliferativa dels espermatogonis (Codina-Pascual et al 2006b).

### 5.3.2. Relació amb variables descriptives

#### A. Seminograma

Diferents estudis mostren relació entre la infertilitat masculina, les característiques dels paràmetres seminals i els valors incrementats d'aneuploidies en els espermatozoides (Tempest i Griffin 2004a, Burrello et al 2004, Sarrate et al 2005 (annex 7.1.2.), Gianaroli et al 2005, Bernardini et al 2005, Faure et al 2007, Durakbasi-Dursun et al 2008). De totes formes, es fa difícil valorar la contribució individualitzada de cadascun dels tres paràmetres espermàtics (recompte, motilitat i morfologia) ja que, amb freqüència, les alteracions observades es presenten combinades.

La relació entre la condició de "oligo" i les aneuploidies en els espermatozoides s'ha analitzat en diversos treballs (revisat per Miharu 2005). La majoria d'estudis descriuen que un percentatge significatiu dels individus infèrtils amb un baix recompte espermàtic presenten freqüències elevades d'espermatozoides aneuploides i diploides respecte a la població general (McInnes et al 1998, Finkelstein et al 1998, Nishikawa et al 2000, Ohashi et al 2001, Nagvenkar et al 2005).

A més a més, quan s'ha analitzat la relació del recompte espermàtic amb els increments totals de les anomalies cromosòmiques dels espermatozoides es va observar una correlació inversa entre aquests dos paràmetres, coincidint amb els resultats de la majoria de les series publicades (Rives et al 1999 (50 pacients), Vegetti et al 2000 (15 pacients), Calogero et al 2001 (19 pacients), Martin et al 2003a (30 pacients)). Aquests resultats confirmen la relació que es va observar en els estudis meiòtics realitzats en el present treball, entre anomalies en el nombre de quiasmes i un baix recompte espermàtic.

Així com la relació entre baix recompte i risc incrementat d'aneuploidies en espermatozoides està àmpliament acceptada, la relació entre anomalies cromosòmiques i motilitat és més controvertida (Rives 2005, Collodel et al 2007). D'una banda, alguns autors observen certa correlació entre ambdós paràmetres (Arán et al 1999, Vegetti et al 2000, Hristova et al 2002, Collodel et al 2007), especialment pels cromosomes sexuals; però altres estudis no mostren cap relació (Calogero et al 2001, Rives et al 1999, Rubio et al 2001). En la nostra sèrie d'individus, tot i que alguns pacients astenozoospermics mostraven increments significatius d'anomalies cromosòmiques, no es va observar correlació entre aquests dos paràmetres; ni tant sols analitzant els 67 individus exclusivament astenozoospermics ( $R = -0,1218$ ;  $p=0,326$ ).

Un altre paràmetre inclòs en la caracterització seminal és la valoració de la morfologia dels espermatozoides. Tots els treballs que analitzen individus amb teratozoospermia polimòrfica mostren alguns individus amb increments, en les freqüències d'aneuploidies dels cromosomes sexuals (Calogero et al 2001, Gole et al 2001, Härkönen et al 2001, Templado et al 2002, Machev et al 2005a, Sun et al 2006, Strassburger et al 2007). Els resultats obtinguts en la sèrie de pacients estudiada no van mostrar correlació per aquest paràmetre, ni tampoc al valorar els 17 individus exclusivament teratozoospermics ( $R = 0,190016$ ;  $p=0,469$ ). A més a més, només un individu va presentar increments significatius per les diploidies.

## B. Cariotip

Els individus portadors d'anomalies cromosòmiques s'associen freqüentment a problemes de fertilitat ja que presenten un risc incrementat de produir espermatozoides desequilibrats pels cromosomes implicats en la reorganització o per d'altres cromosomes com a conseqüència d'un efecte intercromosòmic. Tot i que diferents estudis avalen l'existència de ICE en portadors de reorganitzacions cromosòmiques (Blanco et al 2000, Anton et al 2004a, Douet-Guilbert et al 2005, Machev et al 2005b, Kirkpatrick et al 2008), d'altres no en troben cap evidència (Honda et al 1999, Rives et al 2003b). La població estudiada en aquest treball presentava 8 individus amb cariotip somàtic alterat (taula 3.3.) amb característiques citogenètiques molt heterogènies. El 37,5% (3/8) dels individus varen mostrar anomalies cromosòmiques en els seus espermatozoides. Per tal de poder donar més rellevància a aquest resultat, es van tenir en

compte altres estudis publicats del nostre grup on s'analitzava aquesta relació en individus infèrtils portadors de reorganitzacions cromosòmiques (translocacions Robertsonianes (Anton et al 2004a); translocacions recíproques (Anton et al 2004b, Anton et al 2008b) i inversions (Anton et al 2002, Anton et al 2006). L'agrupació de totes les dades, va evidenciar la presència d'efecte intercromosòmic en el 33% (4/12) dels portadors de translocacions Robertsonianes, en gairebé el 44% (7/16) dels individus portadors de translocacions recíproques i en al 20% (1/5) dels individus portadors d'inversions. Aquests percentatges són clarament superiors al 14% d'homes infèrtils de cariotip somàtic normal que mostraven un resultat de FISH anormal; fet que suggereix la participació de l'efecte intercromosòmic com una font addicional d'anomalies cromosòmiques numèriques en els espermatozoides d'individus portadors de reorganitzacions.

Pel que fa als individus amb cariotip polimòrfic analitzats en el present treball, un dels pacients portadors de la inversió pericèntrica del cromosoma 9 (1/9; 11%) va mostrar percentatges superiors d'anomalies cromosòmiques, concretament de diploidies. Aquest resultat coincidia amb el descrit en estudis previs (Collodel et al 2006). Pel que fa als individus amb polimorfismes d'heterocromatina, en dos dels tres pacients es van observar taxes superiors d'anomalies cromosòmiques en els seus espermatozoides. Coincidint amb aquest resultat, la bibliografia descriu increments d'anomalies cromosòmiques en els espermatozoides d'aquests individus (Yakin et al 2005). Tot i que caldria incrementar el nombre de pacients analitzats per poder avaluar el paper dels diferents polimorfismes en relació a la infertilitat masculina, els resultats apunten una major incidència d'anomalies cromosòmiques en aquests individus (25%, 3/12) que en els de cariotip somàtic normal (11%). Considerant els resultats de l'estudi meiòtic en pacients amb cariotip polimòrfic, que mostraven una reducció significativa del nombre de quiasmes, i els resultats de FISH en espermatozoides, que suggereixen una major incidència d'aneuploidies i diploidies en aquests individus, els nostres resultats recolzen l'existència de ICE en aquests individus.

### C. Cariotip meiòtic

Tal com hem descrit en la primera part de la discussió i com descriuen altres estudis, els errors en els processos d'aparellament i recombinació es relacionen amb problemes de fertilitat; ja sigui per la producció d'espermatozoides amb anomalies cromosòmiques o per bloqueigs més o menys dràstics en el procés meiòtic (Egozcue et al 2005, Martin 2006, 2008).

El 26% (18/68. taula 4.17.) dels individus que presentaven un resultat meiòtic anormal (dades recopilades de l'historial clínic dels pacients) varen presentar un estudi de FISH en espermatozoides amb resultat també anormal. Aquesta incidència va ser clarament superior a la observada en els pacients amb resultat meiòtic normal (8%).

Aquests resultats reflecteixen una notable reducció de les cèl·lules anormals al llarg del procés espermatogènic en el 74% dels pacients, i són coincidents amb els resultats obtinguts en els

estudis meiòtics realitzats en el present treball, on les anomalies dels cromosomes sexuals es van reduir notablement entre MI i MII.

En qualsevol cas, el percentatge de pacients amb anomalies meiòtiques que eren portadors d'anomalies cromosòmiques en els seus espermatozoides (26%) va ser superior al 14% que presentaven els individus infèrtils amb cariotip normal, suggerint, igual que en el cas del cariotip somàtic, la seva implicació en la producció d'espermatozoides aneuploides.

#### D. Edat

És ben coneguda que l'edat materna avançada és un factor de risc pel naixement de nens amb aneuploidies. Els resultats pel que fa al risc associat a l'edat paterna són controvertits (Bosch et al 2001, Buwe et al 2005, Rubes et al 2005, Wyrobek et al 2006, Plastira et al 2007).

La sèrie d'individus analitzada en aquest treball, no van mostrar correlació per cap de les anomalies cromosòmiques analitzades. A més a més, no es van observar diferències entre les edats dels pacients que presentaven increments significatius ( $37 \pm 5$ ; 29-52 anys) i les edats dels grups restants ( $35 \pm 5$ ; 21-52 anys). No hi ha gaires estudis que analitzin aquesta relació en individus infèrtils. Mentre que alguns treballs no observen correlació (Guttenbach et al 1997, Bernardini et al 1998), en d'altres es descriuen efectes de l'edat, exclusivament pel que fa a la incidència de disomies dels cromosomes sexuals (Asada et al 2000, Plastira et al 2007). A més a més, cal destacar que Plastira et al (2007) observen una major incidència d'aneuploidies pels cromosomes sexuals en homes més joves.

#### 5.4. Directrius per a l'estudi clínic

Els estudis citogenètics s'inclouen en els protocols d'anàlisi de la infertilitat masculina en l'àmbit clínic (Foresta et al 2002). Tot i així, les recomanacions per indicar un determinat tipus d'estudi són variables entre centres i no hi ha consens pel que fa a l'espai que han d'ocupar en el context de l'anàlisi del pacient infèril.

L'única prova que s'ha consolidat per a l'estudi de l'individu infèril és l'anàlisi del cariotip somàtic. Aquest estudi està àmpliament incorporat en l'àmbit clínic i ha demostrat la seva utilitat diagnòstica per identificar causes cromosòmiques d'infertilitat. D'altra banda, els estudis citogenètics de la meiosi en teixit testicular i els de FISH en espermatozoides, tot i el llarg camí recorregut pels primers i l'àmplia difusió assolida pels segons durant els últims anys, encara són motiu de controvèrsia; tant pel que fa a la seva incorporació en el diagnòstic de la infertilitat masculina com a l'hora d'interpretar els resultats i determinar la utilitat de la informació que aporten en la presa de decisions i el consell genètic reproductiu.

A partir dels resultats dels estudis meiòtics i de FISH en espermatozoides presentats en aquest treball i dels recollits en la bibliografia, s'han revisat les indicacions sota les quals s'han de

realitzar aquests tipus d'estudis, s'ha avaluat la informació obtinguda a partir dels protocols d'anàlisi emprats actualment i s'han establert pautes per tal d'interpretar els resultats obtinguts.

### 5.4.1. Estudi meiòtic en biòpsia testicular

#### A. Indicació

La realització d'un estudi meiòtic estarà indicat en els següents casos:

- Individus amb un cariotip somàtic normal i baix recompte espermàtic. Per altres anomalies del seminograma la seva aplicació dependrà de la història reproductiva de la parella.
- Individus amb alteracions del cariotip.

#### B. Protocol d'estudi

Tot i que la incorporació de tècniques de M-FISH en aquest tipus d'estudis ha representat una millora en la caracterització de les anomalies meiòtiques, el binomi "informació obtinguda - cost econòmic" no és favorable a la incorporació rutinària de la tècnica de M-FISH en l'àmbit clínic.

Es proposa la utilització de protocols citogenètics clàssics per establir la mitjana individual de quiasmes a partir de l'anàlisi del major nombre possible de metafases I i la comparació d'aquest valor amb la freqüència basal (en el nostre estudi 53,1 quiasmes (Clúster A); taula 5.3.). Diferències significatives entre aquests dos valors es diagnosticaran com "meiosi alterada".

#### C. Interpretació dels resultats

L'anàlisi dels cromosomes meiòtics proporciona informació valuosa sobre el procés meiòtic de l'individu infèril. Un resultat de "meiosi alterada" indica anomalies en els processos d'aparellament, sinapsi i/o recombinació dels cromosomes.

En la nostra sèrie d'individus (taula 4.17.) només 1 de cada 4 pacients amb diagnòstic de meiosi alterada, es van diagnosticar amb un resultat de FISH en espermatozoides alterat, és a dir, en la majoria dels casos no es tradueix amb un increment del risc de transmissió d'anomalies cromosòmiques a la descendència.

Tanmateix, tenint en compte les característiques del material analitzat i dels protocols d'estudi emprats, considerem necessari realitzar les següents consideracions:

1. És imprescindible establir una població control que permeti determinar si els resultats obtinguts s'haurien de considerar normals o anormals. Constituir aquesta població control no és una tasca fàcil; tant a l'hora de definir els individus que l'haurien de formar, com a l'hora d'obtenir les mostres de teixit testicular d'individus sense problemes reproductius.
2. Alguns individus infèrils poden presentar bloqueigs en el procés espermatogènic, que tot i que no presenten dificultat a l'hora de diagnosticar-los, impliquen una minva en el nombre de



cèl·lules que podran progressar i completar la meiosi. Per això, la quantitat de cèl·lules avaluades pot ser molt diferent entre individus, depenent del grau d'afectació i de com d'eficaços siguin els mecanismes de control. A més a més, les característiques del material cromosòmic d'aquestes cèl·lules sovint no són prou adequades per ser avaluades, ja que en alguns casos s'inicien processos apoptòtics que el malmeten.

3. Les variacions en el nombre de quiasmes a MI i les diferents anomalies cromosòmiques observades mostren que la meiosi és un procés que presenta molta variabilitat, tant entre les cèl·lules d'un mateix individu (variabilitat intraindividual) com entre individus (variabilitat interindividual); fet que complica encara més el tractament de les dades i la interpretació dels resultats.

#### 5.4.1. Estudi de FISH en espermatozoides

##### A. Indicació

Un estudi de FISH en espermatozoides estarà indicat en els següents casos:

- Individus amb un cariotip somàtic normal i baix recompte espermàtic. Per altres anomalies del seminograma la seva aplicació dependrà de la història reproductiva de la parella.
- Individus amb alteracions del cariotip.
- Individus amb un resultat de "meiosi alterada".

##### B. Protocol d'estudi

L'estudi dels cromosomes 21, X i Y és suficient per identificar la majoria dels pacients de risc, és a dir, individus amb un risc incrementat de produir espermatozoides portadors d'anomalies cromosòmiques.

##### C. Interpretació dels resultats

Un resultat de FISH alterat es pot analitzar des de dues perspectives diferents:

- Anàlisi quantitativa: els increments significatius es podrien interpretar numèricament indicant el grau de risc del pacient. El primer punt feble d'aquesta interpretació deriva de les característiques pròpies de la tècnica. En primer lloc per la dificultat d'analitzar tots els cromosomes del cariotip (normalment s'analitzen els cromosomes X, Y, 13, 18 i 21) i en segon lloc pel fet de que no es valoren totes les anomalies cromosòmiques (per exemple, no es consideren les nul·lisomies). A més a més, els criteris de valoració utilitzats són molt estrictes, es tendeix a fer una estimació a la baixa dels increments reals; per tant, sembla evident que seria un error donar-los una interpretació estrictament numèrica.
- Anàlisi qualitativa: els increments significatius s'haurien d'interpretar com l'evidència de que existeixen anomalies en l'aparellament, la sinapsi, la recombinació i/o la segregació dels cromosomes meiòtics que indicaria que la qualitat dels procés espermatozònic no és

suficientment bona. Aquesta interpretació avala la proposta de que únicament amb l'estudi de tres cromosomes (21, X i Y), i analitzant un tipus concret d'anomalies, seria suficient per identificar errors en el procés meiótic, i per tant, identificar la gran majoria dels pacients de risc. De fet, són diverses les dades que reforcen la interpretació qualitativa en contraposició a la quantitativa. Per exemple, seria difícil explicar mitjançant un anàlisi estrictament quantitatiu, les repercussions clíniques de les anomalies cromosòmiques en espermatozoides sobre els cicles de FIV/ICSI. Les aneuploidies en aquests gàmetes s'han relacionat amb errors d'implantació (Burrello et al 2003, Nicopoullos et al 2008), amb avortaments recurrents (Pang et al 1999, Rubio et al 2001) i també amb cromosomopaties en nens nascuts (Bonduelle et al 2002, Devroey i Van Steirteghem 2004).

Per tot això, els estudis de FISH en espermatozoides són una eina d'estudi citogenètic del pacient infèrtil. Davant d'un resultat alterat, els individus s'hauran de considerar "de risc" i s'haurà d'informar la parella sobre les tècniques de diagnòstic genètic preimplantacional i prenatal disponibles (Sarrate et al 2010 (annex 7.1.4.)).

## 6. Conclusions



### 1a

L'aplicació seqüencial de les tècniques de tinció uniforme i d'hibridació *in situ* fluorescent múltiplex (M-FISH) permet identificar els cromosomes metafàsics d'espermatoïcits humans i caracteritzar les anomalies cromosòmiques que presenten.

### 2a

El 48% dels individus infèrtils presenten un percentatge d'anomalies meiótiques a l'estadi de metafase I compatible amb el diagnòstic de "meiosi alterada". La reducció del nombre de quiasmes, la presència d'univalents i l'observació de metafases tetraploides són les anomalies més freqüents. El nombre i el tipus d'anomalies són diferents entre les cèl·lules d'un mateix individu suggerint la coexistència de línies cel·lulars de comportament meiótic normal i línies cel·lulars amb anomalies.

### 3a

La presència de cromàtides separades, la pèrdua de cromàtide i l'observació de metafases aneuploides i diploides, són les anomalies més freqüents a metafase II en individus infèrtils.

### 4a

El 15% dels individus infèrtils presenten increments significatius d'anomalies cromosòmiques en els espermatozoides. L'increment en el nombre d'espermatozoides disòmics pels cromosomes sexuals i/o en el nombre d'espermatozoides diploides són les anomalies més freqüents.

### 5a

La reducció del nombre de quiasmes a metafase I i la separació de les cromàtides germanes a metafase II afecta majoritàriament els bivalents/cromosomes autosòmics de mida mitjana i gran. Ambdues observacions es podrien relacionar amb una recombinació aberrant a primera divisió meiótica, entesa com una reducció significativa del número de quiasmes i/o la presència de quiasmes pericentromèrics.

### 6a

El cromosomes sexuals i els cromosomes del grup F i G, principalment el cromosoma 21, són els que s'observen amb més freqüència en forma d'univalent, els més implicats en aneuploidies a metafase II i en anomalies cromosòmiques en espermatozoides.

### 7a

La presència de percentatges significatius d'espermatòcits primaris tetraploides i espermatòcits secundaris diploides posa de manifest la competència meiòtica de les línies tetraploides. L'increment significatiu d'espermatozoides diploides observat en pacients infèrtils suggereix la implicació d'anomalies cromosòmiques mitòtiques en la formació de gàmetes diploides.

### 8a

La posició dels bivalents a la placa metafàsica no és aleatòria: els bivalents formats per cromosomes dels grups D i G, i els bivalents 15 i 22 de forma particular, s'observen preferentment propers al bivalent sexual a metafase I.

### 9a

Les anomalies cromosòmiques en espermatòcits primaris i espermatozoides s'associen de forma significativa amb individus oligozoospermics i/o pacients amb alteracions del cariotip somàtic, ja sigui amb variants polimòrfiques o anomalies cromosòmiques estructurals.

### 10a

L'increment significatiu d'anomalies cromosòmiques en cèl·lules germinals en individus amb alteracions del cariotip recolza l'existència d'efectes intercromosòmics entre els cromosomes implicats i altres cromosomes del complement.

### 11a

La freqüència d'anomalies cromosòmiques numèriques analitzada en els espermatozoides dels individus infèrtils no mostra correlació amb l'edat.

### 12a

L'estudi meiòtic en biòpsia testicular està indicat en individus amb baix recompte espermàtic i/o alteracions del cariotip.

Tenint en compte la informació obtinguda i el cost del procediment, no es recomana la incorporació rutinària de la tècnica de M-FISH en l'àmbit clínic. Es proposa la utilització de protocols citogenètics clàssics adreçats a analitzar la mitjana individual de quiasmes. Diferències significatives entre aquest valor i la freqüència basal s'interpretaran com "meiosi alterada".

Un resultat de "meiosi alterada", tot i indicar anomalies en els processos d'aparellament, sinapsi i/o recombinació dels cromosomes, en la majoria de casos no es tradueix amb un increment d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides.

### 13a

L'estudi de FISH en espermatozoides està indicat en individus amb un cariotip somàtic normal i baix recompte espermàtic, en individus amb un cariotip somàtic alterat i en individus amb un cariotip meiòtic anormal.

L'estudi dels cromosomes 21, X i Y permet identificar la majoria dels pacients amb probabilitat de produir espermatozoides amb anomalies cromosòmiques.

Un resultat de FISH en espermatozoides alterat, independentment del valor numèric, s'interpretarà com l'evidència d'anomalies en el procés de l'espermatogènesi i per tant, proporciona informació qualitativa del procés.





## 7. Annexes





## 7.1. Articles d'investigació

### 7.1.1. Article 1

# Identification of meiotic anomalies with multiplex fluorescence in situ hybridization: preliminary results

Fertil Steril, 82(3): 712-717 (2004)

Z Sarrate, J Blanco, S Egozcue, F Vidal, J Egozcue



## Identification of meiotic anomalies with multiplex fluorescence in situ hybridization: preliminary results

Zaida Sarrate, M.Sc., Joan Blanco, Ph.D., Susana Egozcue, M.D.,  
 Francesca Vidal, Ph.D., and Josep Egozcue, M.D., Ph.D.

Unitat de Biologia Cel·lular, Edifici Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

**Objective:** To characterize meiotic anomalies in infertile men by multiplex fluorescence in situ hybridization (M-FISH) and to determine whether synaptic problems affect specific bivalents or whether anomalies are random.

**Design:** Analysis of meiotic preparations with standard techniques and M-FISH.

**Setting:** Assisted reproduction centers and Universitat Autònoma de Barcelona.

**Patient(s):** Three fertile men undergoing vasectomy, four sterile patients with oligoasthenoteratozoospermia, and one patient with a Robertsonian translocation t(13;14).

**Intervention(s):** Unilateral testicular biopsy in controls and patients with oligoasthenoteratozoospermia and collection of a semen sample from the translocation carrier.

**Main Outcome Measure(s):** Identification of bivalents in metaphase I and chromosomes in metaphase II and characterization of chromosome abnormalities.

**Result(s):** All bivalents in metaphase I and all chromosomes in metaphase II could be identified. In controls and in one patient with oligoasthenoteratozoospermia, meiosis was normal. Other patients with oligoasthenoteratozoospermia showed different types of anomaly: desynapsis, breaks, precocious XY separation, or cryptic reorganizations. The Robertsonian translocation t(13;14) was easily identified.

**Conclusion(s):** Results confirm the high incidence of synaptic errors in oligoasthenoteratozoospermia patients. Bivalents in metaphase I and chromosomes in metaphase II were individually identifiable. Nondisjunctional errors or small reorganizations overlooked in classic meiotic preparations were identified. Synaptic anomalies seem to affect meiotic bivalents at random. (Fertil Steril® 2004;82:712-7. ©2004 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** Meiosis, synaptic anomalies, chromosome reorganizations, multiplex FISH

Received September 19, 2003; revised and accepted February 4, 2004.

Supported by Project 161275 (Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain), Project DGR-2001 SGR-00202 (Generalitat de Catalunya, Spain), and Project SAF 2003-04312 (Direcció General de Investigació, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain).

Reprint requests: Josep Egozcue, M.D., Ph.D., Unitat de Biologia Cel·lular, Edifici Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain (FAX: 93-5812295; E-mail: josep.egozcue@uab.es).

0015-0282/04/\$30.00  
 doi:10.1016/j.fertnstert.2004.02.122

Meiotic studies are seldom included in the protocol of exploration of sterile or infertile men, because testicular biopsies require minor surgery and because most laboratories lack the expertise to analyze meiotic preparations. However, meiotic studies (1, 2) provide useful information on synaptic errors and on their influence in the production of univalents or of bivalents with a reduced chiasma count (1, 3-6), on the meiotic behavior of balanced chromosomal reorganizations (7-9), and on the presence of "de novo" meiotic structural anomalies (10), all of which can produce genetically unbalanced spermatozoa (11).

Data obtained from meiotic studies are helpful not only to establish a prognosis regarding the reproductive possibilities of the couple, but

also to decide on the most convenient assisted reproductive technique to use and to provide the couple with more accurate genetic counseling, which might include prenatal diagnosis, preimplantational genetic diagnosis, or even sperm donation.

The most important limitations of the technique with standard protocols (12) are these: [1] because the bivalents affected by synaptic anomalies in metaphase I and the bivalent possibly affected by an interchromosomal effect in carriers of structural reorganizations cannot be identified, a sperm fluorescence in situ hybridization (FISH) study of aneuploidies is impossible because there is no indication as to the probes to use, [2] the products of the segregation of structural reorganizations can

only be inferred from the configurations observed, although these conclusions can later be confirmed by FISH, and [3] taking into account that metaphase II figures are usually scarce and difficult to analyze (13), usually it is not possible to identify segregation errors during metaphase I or to predict segregation errors in metaphase II (even if they are not frequent).

For these reasons, it was decided to carry out a study of meiosis with a sequential protocol, combining the analysis of classic preparations with subsequent multiplex FISH (M-FISH) (14) in the same meiotic figures.

## MATERIALS AND METHODS

Testicular biopsies were obtained under local anesthesia from three fertile controls undergoing a vasectomy and four sterile patients with severe oligoasthenoteratozoospermia. A semen sample from a carrier of a balanced Robertsonian translocation (Rob) t(13;14) was obtained by masturbation after 3 days of abstinence from all sexual activity. Testicular biopsies were processed according to the method of Evans et al. (12), and the semen sample following the technique described by Vidal et al. (15). The study was approved by our institutional ethics committee, and all individuals signed an informed consent form.

Before the application of M-FISH, all samples were stained with Leishman (20%) for 8–10 minutes. The preparations were evaluated with an Olympus BX60 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a capture-and-image-analysis system (CytoVision 2.7; Applied Imaging, San Jose, CA). Pachytene, metaphase I, and metaphase II figures were captured, and coordinates were noted to facilitate the location and analysis after the M-FISH protocol.

Before application of the M-FISH protocol, preparations were destained in an ethanol series (70%, 80%, 90%) for 1 minute each, incubated for 30 minutes at 37°C in an RNase A solution (0.01% RNase A, Dnase-free in 2× saline sodium citrate) and for 5 minutes in a pepsin solution (0.005% pepsin in 0.1 N HCl) at 37°C. Slides were fixed with formaldehyde (5% buffered formalin with 1× phosphate-buffered saline; 0.05 mol/L MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O) for 2 minutes at room temperature. Afterwards, the manufacturer's M-FISH protocol was applied (Spectra Vysion Assay; Vysis, Downers Grove, IL).

Analyses were performed with an Olympus BX60 epifluorescence microscope equipped with specific filter sets for Aqua (Spectrum Aqua; excitation peak: 433 nm, emission peak: 480 nm), Cy 5 (Spectrum FRed; excitation peak: 655 nm, emission peak: 675 nm), fluorescein isothiocyanate conjugate (Spectrum Green; excitation peak: 497 nm, emission peak: 524 nm), Gold (Spectrum Gold; excitation peak: 530 nm, emission peak: 555 nm), TexasRed (Spectrum Red; excitation peak: 592 nm, emission peak: 612 nm), and 6-diamino-2-phenylindole (excitation peak: 367 nm, emission

peak: 452 nm). Capture and image analyses were carried out with a CytoVision system (CytoVision 2.7; Applied Imaging).

## RESULTS

The results obtained in this preliminary study show that M-FISH allows for the identification of individual bivalents in metaphase I (Fig. 1) and in pachytene (Fig. 2A) and of the chromosomes in metaphase II (Fig. 2B).

The three controls and one of the patients with severe oligoasthenoteratozoospermia had normal metaphase I and metaphase II figures.

One of the sterile patients showed a precocious separation of the XY bivalent in 33.3% of the metaphase I figures analyzed.

The other two patients with oligoasthenoteratozoospermia had multiple anomalies. One of them showed a precocious separation of the XY bivalent, a partial desynapsis of bivalents numbers 15 and 18, and a univalency of bivalent number 19. These anomalies, as is usual, were not present in all metaphase I figures; instead, several combinations of them were found (e.g., XY separation plus bivalent 19 univalency, XY separation plus desynapsis of bivalent 18) (Fig. 2C).

In the other patient with oligoasthenoteratozoospermia, the anomalies observed included the precocious separation of the XY bivalent, breaks in bivalent 9 (a frequent observation in classic studies but not identified as a break until M-FISH was used), desynapsis of bivalents 5, 13, 16, 17, and 18, a reorganization involving the sex chromosomes in one metaphase I figure, and an XY disomy in a metaphase II. Some of these anomalies are shown in Figures 3A and 3B.

In meiotic preparations from the semen sample of the carrier of the balanced Rob t(13;14), the trivalent was easily identified (Fig. 3C). Unfortunately, no metaphase II figures were found in this sample.

## DISCUSSION

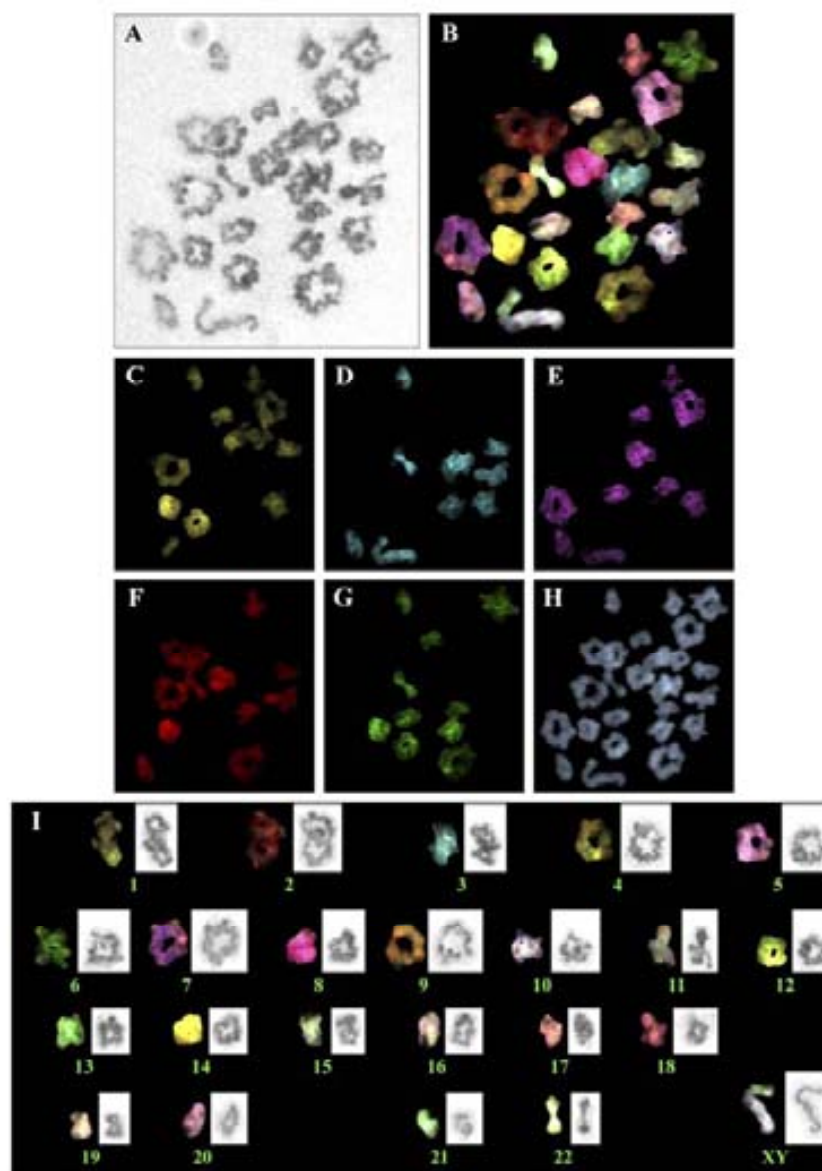
Multiplex FISH is a technique that can be sequentially used after analysis of meiotic preparations with the classic protocol of Evans et al. (12). The use of M-FISH allows for the identification of each individual bivalent in pachytene and metaphase I and of each individual chromosome in metaphase II.

Pachytenes are easily found in meiotic preparations. Synaptic anomalies can be detected if present. Thus, this stage can provide useful information on the bivalents affected by pairing problems.

The number of cells in metaphase I that can be analyzed in meiotic preparations, especially in infertile men, is always low (13). For this reason, even if at present meiotic (synaptic) anomalies seem to affect different bivalents at random

FIGURE 1

Metaphase I from a testicular biopsy. (A) Leishman staining, (B) Multiplex FISH image, (C) Spectrum Gold image, (D) Spectrum Aqua image, (E) Spectrum FRed image, (F) Spectrum Red image, (G) Spectrum Green image, (H) 6-diamino-2-phenylindole image, (I) Multiplex FISH karyotype plus uniformly stained combined image allowing for bivalent identification together with an accurate chiasmata count.



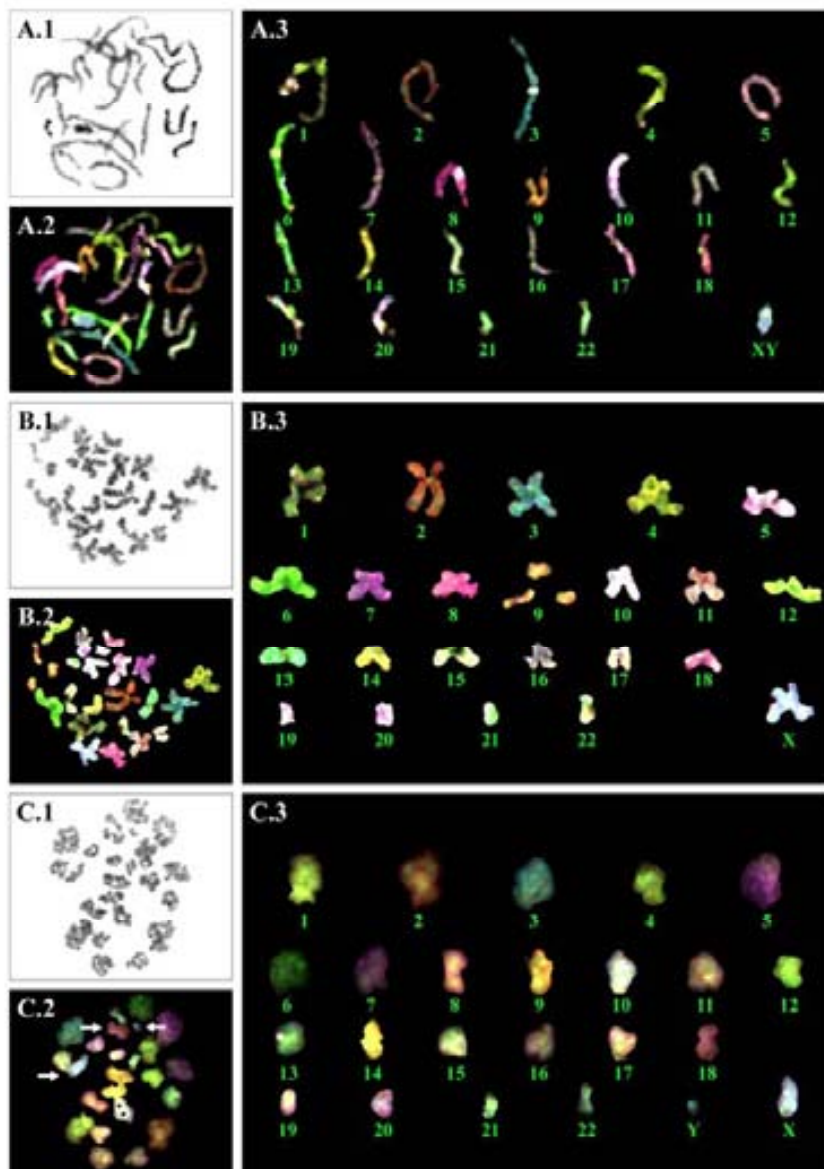
Sarrate. Meiotic studies with multiplex FISH. *Fertil Steril* 2004.

(with the exception of the XY bivalent), more studies will be needed to determine whether the anomalies are indeed random (in which case the M-FISH analyses would not be helpful to

choose the most adequate probes for a sperm FISH study) or whether all or some of them are more frequent than others (in which case at least some probes should always be used).

FIGURE 2

(A) Pachytene spread. (B) Normal, X-bearing metaphase II. (C) Metaphase I showing precocious separation of the XY bivalent (C.2, arrows, lower left and upper right) and desynapsis of bivalent 18, which would be expected to show two chiasmata instead of a single one, as seen in C.1 (C.2, arrow, upper left). A.1, B.1, C.1: Leishman staining. A.2, B.2, C.2: M-FISH images. A.3, B.3, C.3: M-FISH karyotypes.



Sarrate. *Meiotic studies with multiplex FISH. Fertil Steril* 2004.

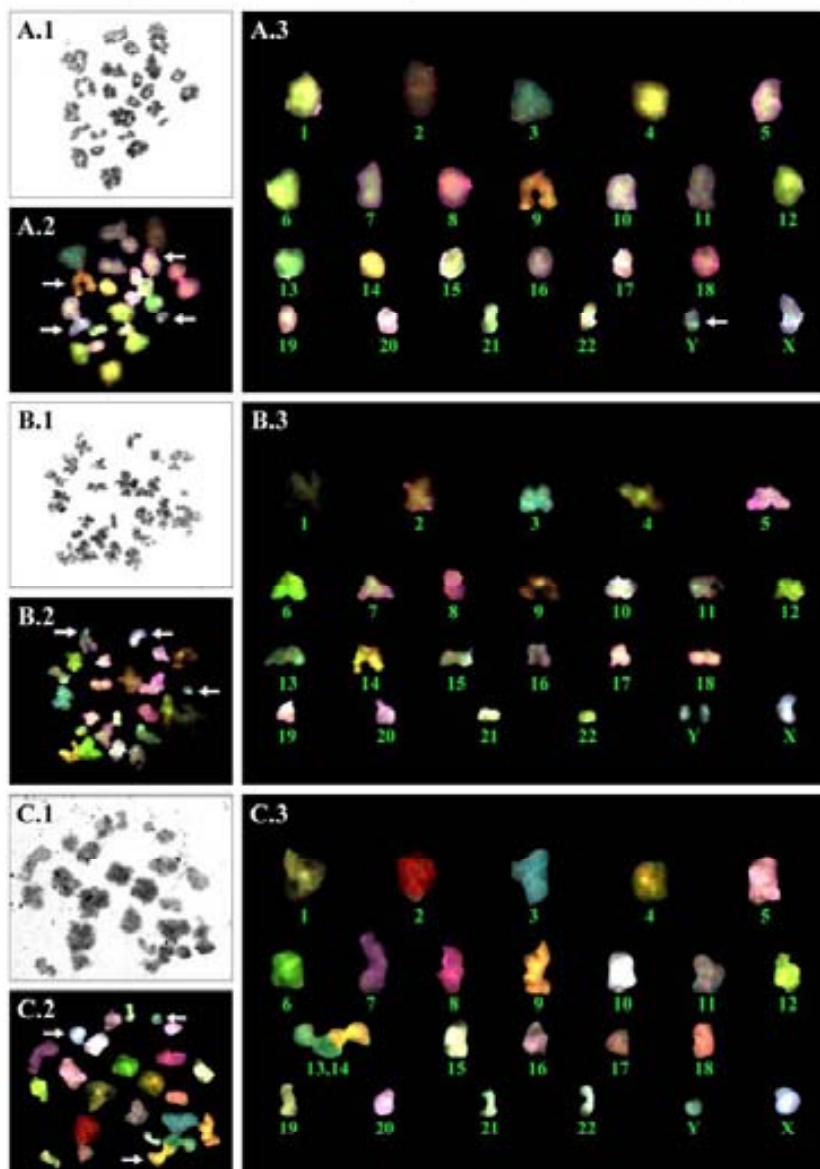
From classic data, as well as from our M-FISH results, it is possible to establish that bivalent 9 is often affected, especially by breaks, producing an asymmetric image like the one shown in Figure 3A. In fact, it is well known that

chromosome 9 is especially prone to breaks and pericentric inversions (16). On the other hand, a reduction in the number of chiasmata results in symmetric images like the one seen for bivalent 5 in the same figure (Fig. 3A). Bivalent 18 was



FIGURE 3

(A) Metaphase I showing a reorganization involving the sex chromosomes; the Y chromosome includes material from the X (A.2, arrows, lower left and right; A.3, arrow), desynapsis of bivalent 5, which should show at least two chiasmata instead of a single one (A.2, arrow, upper right), and a break in bivalent 9 (A.2, arrow, upper left). (B) Metaphase II showing an XY disomy (B.2, arrows) with a precocious separation of the chromatids of the Y chromosome (B.2, arrows, upper left and lower right). (C) Metaphase I from a semen sample from the Robertsonian translocation t(13;14) carrier showing the translocation trivalent (C.2, arrow, lower right) and the precocious separation of the X (C.2, arrow, upper left) and Y (C.2, arrow, upper right) chromosomes. A.1, B.1, C.1: Leishman staining. A.2, B.2, C.2: M-FISH images. A.3, B.3, C.3: M-FISH karyotypes.



Sarrate. Meiotic studies with multiplex FISH. *Fertil Steril* 2004.

affected in both patients. And univalency, as seen for bivalent 19 in one of our patients, is also frequently observed in

sterile patients. Thus, perhaps a combination adding a few more probes to the 13, 18, 21, X, and Y set now used for

aneuploidy screening could be enough to cover most patients with synaptic problems.

Finally, the use of M-FISH allows identification of the segregation errors produced in metaphase I when metaphase II figures are analyzed.

When meiotic configurations resulting from structural reorganizations are analyzed, the classic method does not always allow the individual identification of chromosomes involved in the multivalents (trivalents, quadrivalents) observed. Identification of the position and probable orientation of each chromosome will contribute to the prediction of its segregation and the anomalies that can be expected from each particular configuration.

Taking into account that analysis of the preparations with Leishman staining allows the location of chiasmata to be identified, it will be possible, for instance, to determine whether an interstitial chiasma is present in pair A or in pair B of, say, a quadrivalent from a reciprocal translocation. The duplications or deficiencies resulting if the chiasma is in A might have more (or less) severe consequences than if the chiasma is in B. To give another example, in a translocation producing a trivalent plus one univalent, the consequences might be quite different depending on whether the univalent is chromosome A or B or on whether the univalent is a translocated chromosome or its nontranslocated homologue.

The presence of "de novo" meiotic translocations is not frequent but has been described (10). Usually, they are detected by the presence of a meiotic configuration corresponding to a reorganization. However, cryptic reorganizations, such as the one shown in Figure 3A, would go unnoticed in classic preparations.

Finally, metaphase II figures in classic preparations are usually quite difficult to analyze because the chromatids are wide open and often separated and mixed. As a result, even counting chromosomes might become impossible (13), as seen in the metaphase II spreads of Figures 2B or 3B. However, the use of M-FISH allows for the identification of each individual chromosome or chromatid and also the characterization of anomalies, such as the XY disomy shown in Figure 3B. This characterization would have been impossible without the use of M-FISH, especially because the chromatids of the Y chromosome are so far apart.

The limitations of the technique, with respect to the classic meiotic procedure, are mainly related to the fact that the bivalents affected in patients with synaptic anomalies might be random. If this were the case, then M-FISH would not be of help in choosing the most appropriate probes for

sperm FISH studies. Another problem is that it cannot predict the segregation of the chromosomes in metaphase II and, in this regard, it does not have any advantage over the classic technique. Finally, the technique is expensive and time consuming, but both cost and time will probably decrease continually in the future.

*Acknowledgments:* The authors thank Ferran Garcia, M.D., Manuel Gil, M.D., and Josep Maria Vendrell, M.D., for providing the testicular biopsies; Simon Marina, M.D., for providing the semen sample from the Robertsonian translocation (13;14) carrier; and Jonatan Lucas for technical assistance.

## References

- Egozcue J, Templado C, Vidal F, Navarro F, Morer-Fargas F, Marina S. Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum Genet* 1983;66:306-8.
- Barlow AL, Hultén M. Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human spermatocytes. *Chromosome Res* 1996;4:562-73.
- Hultén M, Eliasson R, Tillinger KG. Low chiasma count and other meiotic irregularities in two infertile 46, XY men with spermatogenic arrest. *Hereditas* 1970;65:285-90.
- Pearson PL, Ellis JD, Evans HJ. A gross reduction in chiasma formation during meiotic prophase and a defective DNA repair mechanism associated with a case of human male infertility. *Cytogenetics* 1970;9:460-7.
- Templado C, Marina S, Egozcue J. Three cases of low chiasma frequency associated with infertility in man. *Andrologia* 1976;8:285-9.
- Templado C, Vidal F, Marina S, Pomerol JM, Egozcue J. A new meiotic mutation: desynapsis of individual bivalents. *Hum Genet* 1981;59:345-8.
- Vidal F, Templado C, Navarro C, Marina S, Egozcue J. Meiotic and synaptonemal complex studies in a 14/21 translocation carrier. *Int J Androl* 1982;5:21-6.
- Templado C, Vidal F, Navarro J, Marina S, Egozcue J. Meiotic studies and synaptonemal complex analysis in two infertile males with a 13/14 balanced translocation. *Hum Genet* 1984;67:162-5.
- Navarro J, Vidal F, Benet J, Templado C, Marina S, Egozcue J. XY-Trivalent association and synaptic anomalies in an infertile male carrier of a Robertsonian t(13/14) translocation. *Hum Reprod* 1991;6:376-81.
- Templado C, Vidal F, Navarro J, Marina S, Egozcue J. Meiotic translocation in two sterile males. *Hum Genet* 1984;67:239.
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, et al. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000;6:93-105.
- Evans EP, Breckon G, Ford CE. An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* 1964;3:289-94.
- Hultén MA, Goldman ASH, Saadallah N, Wallace BMN, Creasy MR. Meiotic studies in man. In: Roomey DE, Czepulkowski BH, eds. *Human cytogenetics. A practical approach. Volume 1. Constitutional analysis*. Oxford: IRL Press at Oxford University Press, 1992:193-221.
- Speicher MR, Ballard SG, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996;12:368-75.
- Vidal F, Moragas M, Catala V, Torcello MJ, Santalo J, Calderon G, et al. Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. *Hum Reprod* 1993;8:1740-3.
- Bosch M, Rajmil O, Egozcue J, Templado C. Linear increase of structural and numerical chromosome 9 abnormalities in human sperm regarding age. *Eur J Hum Genet* 2003;11:754-9.

7.1.2. Article 2

## FISH studies of chromosome abnormalities in germ cells and its relevance in reproductive counseling

Asian J Androl, 7(3): 227-236 (2005)

Sarrate Z, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Egozcue J, Vidal F





*Asian J Androl* 2005; 7 (3): 227–236  
DOI: 10.1111/j.1745-7262.2005.00061.x



·Review·

## FISH studies of chromosome abnormalities in germ cells and its relevance in reproductive counseling

Zaida Sarrate, Joan Blanco, Ester Anton, Susana Egozcue, Josep Egozcue, Francesca Vidal

*Cell Biology Unit, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Science Faculty, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra 08193, Spain*

### Abstract

Chromosome abnormalities are one of the major causes of human infertility. In infertile males, abnormal karyotypes are more frequent than in the general population. Furthermore, meiotic disorders affecting the germ cell-line have been observed in men with normal somatic karyotypes consulting for infertility. In both cases, the production of unbalanced spermatozoa has been demonstrated. Basically addressed to establish reproductive risks, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on decondensed sperm heads has become the most frequently used method to evaluate the chromosomal constitution of spermatozoa in carriers of numerical sex chromosome abnormalities, carriers of structural chromosome reorganizations and infertile males with normal karyotype. The aim of this review is to present updated figures of the information obtained through sperm FISH studies with an emphasis on its clinical significance. Furthermore, the incorporation of novel FISH-based techniques (Multiplex-FISH; Multi-FISH) in male infertility studies is also discussed. (*Asian J Androl* 2005 Sep; 7: 227–236)

**Keywords:** chromosome abnormalities; FISH; germ cells; male infertility; reproductive counseling

### 1 Introduction

Genetic abnormalities have long been accepted as an important cause of human infertility and are suspected to be present in 30 % of the patients consulting for fertility problems [1]. As a consequence, genetic studies, either cytogenetic or addressed to the detection of specific gene mutations, have been incorporated in most male infertility screening protocols, and are of great importance for the affected couples seeking reproduc-

tive counseling.

Focusing on cytogenetic studies, a study of the karyotype is usually included in the basic clinical evaluation. The high incidence of constitutional chromosomal abnormalities in infertile patients in relation to the general population [2–4] justifies its application and allows the diagnosis of approximately 7 % of the cases of male infertility [3]. On the other hand, meiotic cytogenetic studies directed towards the detection of abnormalities, which exclusively affect the germinal line, not detectable through the study of the somatic karyotype and performed through the analysis of testicular tissue, are less commonly requested. However, it has been shown that approximately 6 % of the patients with a normal somatic karyotype who seek advice for infertility present meiotic alterations in their spermatogenic cells [5]. During the last

Correspondence to: Prof. Francesca Vidal, Unitat de Biologia Cel·lular, Edifici C (Facultat de Ciències), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain.  
Tel: +34-93-581-2781, Fax: +34-93-581-2295  
E-mail: francesca.vidal@uab.es  
Received 2004-12-02 Accepted 2005-04-20

© 2005, Asian Journal of Andrology, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences. All rights reserved.

·227·

years, probably because of the use of testicular material for assisted reproductive techniques, meiotic studies have recovered their deserved space in the diagnosis of human male infertility. Substantial information has been derived from more recent reports, showing meiotic abnormalities in 17.5 % of males with severe oligoasthenozoospermia [6] and that this figure can increase up to 27 % in normozoospermic patients with one or more previous IVF failures [7].

As mentioned, chromosomal abnormalities (either constitutional or limited to the germ cell line) interfere with gametogenesis and may result in the production of gametes with chromosomal abnormalities that, in turn, increase the risk of affected offspring.

With the introduction of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) techniques, the possibilities of analysis of male germ cells are notably increased. In this context, FISH studies in spermatozoa were promptly incorporated into the study of infertile patients [8–12]. The application of combinations of DNA probes appropriate for each specific study, preceded by a protocol of spermatid chromatin decondensation, allows to obtain reliable data on the frequency of chromosomal abnormalities in the spermatozoa and valuable information for guiding reproductive counseling in each case.

Furthermore, with the objective of obtaining more detailed cytogenetic information of the whole spermatogenic process (spermatogonia, primary and secondary spermatocytes, spermatids and spermatozoa), the combination of different FISH-based techniques on testicular tissue can also be used [13]. Analyses by means of Multiplex-FISH (M-FISH), using DNA probes directly labeled with a combination of five different fluorochromes, thus allowing the obtention of 24 different color patterns and making possible the identification of all chromosomes in metaphase I and metaphase II cells, are especially promising [14].

This paper reviews the results obtained from the application of FISH methodologies in the cytogenetic characterization of spermatogenesis in three groups of individuals: 1) carriers of numerical abnormalities for the sex chromosomes; 2) carriers of structural chromosomal abnormalities; and 3) infertile individuals with a normal karyotype.

The behavior of the chromosomes involved in the abnormalities throughout the meiotic process, the risk of transmission to the offspring and the possible implications in reproductive counseling in each group will be

detailed.

## 2 Carriers of numerical sex chromosome abnormalities

Carriers of sex chromosome abnormalities are frequently seen in andrology services and fertility clinics. Sperm FISH studies carried out in these patients show an increase in the incidence of sex chromosome disomies (Table 1).

In apparently non-mosaic Klinefelter individuals, the average incidence of disomies for sex chromosomes is 6.29 % (range 1.36 %–25 %), while in 46,XY/47,XXY mosaics it is 2.54 % (range 0 %–7 %) (Table 1). Sperm FISH studies in 47,XYY individuals show that 3.74 % (range 0.11 %–14.36 %) of the spermatozoa analyzed (Table 2) are carriers of an extra sex chromosome.

The mechanisms by which these increases are produced are not well known yet. Although the early studies suggested the possible entry of the XXY aneuploid line in meiosis [36, 37], more recent studies indicate that these cells cannot enter the meiotic process [26, 38]. In these individuals, the observed increase of disomies could be justified by an abnormal testicular micro-environment, probably related to an increase of FSH, which would affect chromosomal segregation in a euploid 46,XY cell line. In 47,XYY individuals, although some studies suggested that the extra Y might be lost in the early stages of spermatogenesis [39–43], other studies [26, 30, 44] have shown it clear the capacity of some aneuploid cells to initiate and complete meiosis, producing aneuploid gametes.

Due to the relatively low frequency of disomic spermatozoa observed and the clinical features of numerical sex chromosome syndromes, some authors debated on performing routine sperm FISH analysis in these individuals [45, 46]. In our opinion, the variability shown by the different studies (Tables 1 and 2) indicates the need for the individualized analysis for each particular case. For example, according to the results of the studies shown in Table 1, it is evident that in a 47,XXY patient with an incidence of 21.71 % of disomies for the sex chromosomes [18], reproductive counseling will be quite different from that of another individual, also characterized as non-mosaic Klinefelter, but with a much lower disomy incidence (1.36 %) [22].

## 3 Carriers of structural chromosomal abnormalities

Table 1. Percentage of chromosomal abnormalities in spermatozoa of Klinefelter's syndrome patients. \*No statistical analysis has been performed; <sup>b</sup>statistically significant vs internal controls.

Reference	Authors	Karyotype	XY	XX	YY	Diploid
15	Chevret <i>et al.</i> (1996)	46,XY/47,XXY	2.09 <sup>b</sup>	0.11	0.003	0.33
16	Martini <i>et al.</i> (1996) <sup>a</sup>	46,XY/47,XXY	1.30	0.5	0.7	-
17	Guttenbach <i>et al.</i> (1997)	47,XXY	1.36 <sup>b</sup>	1.22 <sup>b</sup>	0.09	0.23 <sup>b</sup>
18	Foresta <i>et al.</i> (1998)	47,XXY	14.58 <sup>b</sup>	6.92	0.21	0.05
		47,XXY	10.03 <sup>b</sup>	3.34	0.09	0.03
19	Kruse <i>et al.</i> (1998) <sup>a</sup>	46,XY/47,XXY/48,XXXY	5	2	-	-
20	Estop <i>et al.</i> (1998) <sup>a</sup>	47,XXY	25 <sup>b</sup>	-	-	4.2 <sup>b</sup>
21	Lim <i>et al.</i> (1999)	46,XY/47,XXY	0.41 <sup>b</sup>	0.29 <sup>b</sup>	0.06	1.70 <sup>b</sup>
22	Rives <i>et al.</i> (2000)	47,XXY	0.54 <sup>b</sup>	0.45 <sup>b</sup>	0.37 <sup>b</sup>	0.23 <sup>b</sup>
		46,XY/47,XXY	0.62 <sup>b</sup>	0.24 <sup>b</sup>	0.20	0.36 <sup>b</sup>
23	Morel <i>et al.</i> (2000)	46,XY/47,XXY	1.3 <sup>b</sup>	0.71 <sup>b</sup>	-	0.24 <sup>b</sup>
		46,XY/47,XXY	1.73 <sup>b</sup>	0.86 <sup>b</sup>	0.86 <sup>b</sup>	0.25 <sup>b</sup>
24	Levron <i>et al.</i> (2000) <sup>a</sup>	47,XXY (5)	0.89	1.79	0.89	-
25	Bielanska <i>et al.</i> (2000) <sup>a</sup>	46,XY/47,XXY	2.23	1.12	0.56	0.84
26	Blanco <i>et al.</i> (2001)	47,XXY	1.37 <sup>b</sup>	-	-	1.37 <sup>b</sup>
		46,XY/47,XXY	-	-	-	-

Table 2. Percentage of chromosomal abnormalities in spermatozoa of carriers of structural chromosomal rearrangements. \*No statistical analysis has been performed; <sup>b</sup>statistically significant vs internal controls.

Reference	Authors	XY	XX	YY	Diploid
27	Han <i>et al.</i> (1994)	0.25	0.30	0.40	3.35 <sup>b</sup>
28	Mercier <i>et al.</i> (1996)	9.37 <sup>b</sup>	0.34	4.65 <sup>b</sup>	0.11
16	Martini <i>et al.</i> (1996) <sup>a</sup>	2.30	2	0.80	-
		5.40	2.70	2.30	-
29	Chevret <i>et al.</i> (1997)	0.24	0.02	0.08 <sup>b</sup>	0.23 <sup>b</sup>
		0.52	-	0.19 <sup>b</sup>	0.13 <sup>b</sup>
30	Blanco <i>et al.</i> (1997)	0.30 <sup>b</sup>	0.15	1.01 <sup>b</sup>	0.30
31	Mennicke <i>et al.</i> (1997) <sup>a</sup>	0.80	0.70	0.50	-
		1	1.2	1	-
		3.11	0.31	1.02	0.08
32	Martin <i>et al.</i> (1999)	0.55 <sup>b</sup>	0.08	0.03	0.12
33	Morel <i>et al.</i> (1999) <sup>a</sup>	3.01	1	1.64	0.15
34	Shi and Martin (2000)	0.44 <sup>b</sup>	0.05	0.07 <sup>b</sup>	0.33
26	Blanco <i>et al.</i> (2001)	0.11	-	-	0.44
35	Rives <i>et al.</i> (2003)	3.41 <sup>b</sup>	0.54 <sup>b</sup>	1.23 <sup>b</sup>	1.49 <sup>b</sup>
		0.83 <sup>b</sup>	2.20 <sup>b</sup>	1.65 <sup>b</sup>	1.38 <sup>b</sup>

The development of locus specific and subtelomeric DNA probes has allowed the analysis of chromosome segregation in carriers of inversions (pericentric and paracentric), Robertsonian translocations and reciprocal

translocations. These studies confirmed that carriers of structural chromosomal reorganizations produce, to a greater or a lesser extent, chromosomally unbalanced spermatozoa depending on the characteristics of the reorganization (Tables 3, 4 and 5). If these gametes fertilize an oocyte, the resulting embryos, depending on the chromosome regions implicated, can give rise to abortions or offspring affected by chromosomal abnormalities.

In patients, carriers of pericentric inversions, the frequencies of abnormal spermatozoa vary in function of the size of the inverted region, ranging between 0.67 % and 54.30 % (Table 3). For carriers of Robertsonian translocations, unbalanced spermatozoa range is between 7 % and 36 % (Table 4), and the range is between 29.37 % and 70.20 % in carriers of reciprocal translocations (Table 5). Among the different factors which condition chromosome segregation, the chromosomes involved in the reorganization and the characteristics of the reorganized regions (such as the location of the breakpoints involved in the rearrangement) seem to be especially important.

Furthermore, the presence of structural reorganizations may produce an interchromosomal effect (ICE), characterized by the abnormal behavior of one or more bivalents not involved in the reorganization, which could give rise to abnormal spermatozoa for these chromosomes. In this sense, diverse FISH studies where this phenom-

## Germ cell chromosome abnormalities

Table 3. Percentage of chromosomally abnormal spermatozoa in carriers of pericentric inversions.

Reference	Authors	Inversion	unbalanced (%)
47	Jaarola <i>et al.</i> (1998)	inv(1)(p31q12)	0.67
		inv(8)(p23q22)	13.7
48	Anton <i>et al.</i> (2002)	inv(6)(p23q25)	54.3
49	Yakut <i>et al.</i> (2003)	inv(1)(p36q32)	17.5
50	Mikhail-Phillips <i>et al.</i> (2004)	inv(2)(p23q33)	44.1

Table 4. Results of segregation and interchromosomal effect (ICE) in carriers of Robertsonian translocations. N/B: normal/balanced; A/U: abnormal/unbalanced; Alt = alternate; Adj = adjacent; ne = not evaluated.

Reference	Authors	Translocation	Type of segregation		ICE
			N/B (Alt)	A/U(Adj)	
51	Rousseaux <i>et al.</i> (1995)	t(14q;21q)	72.20	18.01	+
31	Mennicke <i>et al.</i> (1997)	t(21q;22q)	60	36	ne
52	Honda <i>et al.</i> (2000)	t(14q;21q)	88.42	11.25	ne
53	Escudero <i>et al.</i> (2000)	t(13q;14q)	73.60	23.30	ne
		t(13q;14q)	77.40	19.10	ne
54	Blanco <i>et al.</i> (2000)	t(13q;22q)	ne	ne	-
55	Morel <i>et al.</i> (2001)	t(13q;14q)	81.34	18.06	+
		t(13q;14q)	82.60	16.32	+
		t(13q;14q)	88.90	10.08	-
		t(13q;14q)	91	9	ne
56	Frydman <i>et al.</i> (2001)	t(13q;14q)	90	10	ne
		t(13q;14q)	87.10	12.90	ne
		t(14q;21q)	91.30	8.70	ne
		t(14q;21q)	92.80	7.20	ne
		t(14q;21q)	93	7	ne
		t(21q;21q)	ne	ne	-
57	Acar <i>et al.</i> (2002)	t(13q;14q)	86.48	12.56	-
		t(13q;14q)	87.49	12.17	-
		t(13q;14q)	83	14.53	+
		t(13q;14q)	84.53	14.17	-
		t(13q;14q)	88.13	11.40	-
		t(13q;14q)	88.23	11.11	+
		t(13q;14q)	87.73	11.63	-
58	Anton <i>et al.</i> (2004)	t(13q;14q)	86.48	12.56	-

enon has been evaluated show a positive ICE in 38.46 % of the studied Robertsonian translocations (Table 4), and approximately 34.5 % in reciprocal translocations (Table 5).

Sperm FISH studies in structural chromosome reorganization carriers allow to infer the meiotic behavior of the rearranged chromosomes and the final outcome in spermatozoa. However, the importance of improving

our knowledge of the meiotic process in these individuals has led to the application of M-FISH techniques for an in-depth cytogenetic analysis, thus allowing the evaluation of all bivalents or multivalents in metaphase I, making it possible to analyze the meiotic configuration of the chromosomes involved in a given reorganization and to evaluate the occurrence of interchromosomal effects [14, 77].



*Asian J Androl* 2005; 7 (3): 227-236

Table 5. Results of segregation and interchromosomal effect (ICE) in carriers of reciprocal translocations. N/B = normal/balanced; A/U = abnormal/unbalanced; Alt = alternate; Adj = adjacent; ne = not evaluated.

Reference	Authors	Translocation	Type of segregation		ICE
			N/B (Alt)	A/U(Adj I + Adj II + 3:1)	
59	Lu <i>et al.</i> (1994)	t(2;4)(q23;q27;p21)	ne	ne	-
60	Rousseaux <i>et al.</i> (1995)	t(6;11)(q14;p14)	ne	ne	+
		t(6;11)(q14;p14)	ne	ne	+
		t(2;14)(p23.1;q31)	ne	ne	+
61	Van Hummelen <i>et al.</i> (1997)	t(1;10)(p22.1;q22.3)	48.09	51	-
62	Blanco <i>et al.</i> (1998)	t(5;8)(q33;q13)	45.12	51.84	-
63	Estop <i>et al.</i> (1998)	t(2;18)(p21;q11.2)	43.60	53.10	ne
		t(8;9)(q24.2;q32)	44.40	53.50	ne
64	Martini <i>et al.</i> (1998)	t(3;11)(q27.3;q24.3)	44.30	51.40	-
65	Estop <i>et al.</i> (1999)	t(11;22)(q23;q11)	27.40	70.20	ne
66	Cifuentes <i>et al.</i> (1999)	t(5;7)(q21;q32)	49.70	50.30	-
67	Honda <i>et al.</i> (1999)	t(3;9)(q26.2;q32)	52.49	47.24	-
		t(3;9)(p25;q32)	47.25	52.48	-
68	Giltay <i>et al.</i> (1999)	t(Y;16)(q11.21;q24)	51	48	-
54	Blanco <i>et al.</i> (2000)	t(3;15)(p25;q15)	ne	ne	+
		t(Y;7)(q13;p11)	ne	ne	-
69	Estop <i>et al.</i> (2000)	t(10;12)(p26.1;p13.3)	ne	ne	-
		t(2;18)(p21;q11.2)	ne	ne	-
		t(3;19)(p25;q12)	ne	ne	-
		t(11;22)(q23;q11)	ne	ne	-
		t(3;4)(p25;p16)	ne	ne	-
		t(8;9)(q24.2;q32)	ne	ne	-
		t(10;18)(q24.1;p11.2)	ne	ne	-
70	Morel <i>et al.</i> (2001)	t(4;10)(q33;p12.2)	ne	ne	-
71	Oliver-Bonet <i>et al.</i> (2001)	t(X;Y)(p22.3;q11)	ne	ne	+
72	Geneix <i>et al.</i> (2002)	t(4;8)(q28;p23)	30.5	68.50	+
73	Oliver-Bonet <i>et al.</i> (2002)	t(17;22)(q11;q12)	19	65.50	ne
		t(1;13)(q41;q22)	41.6	58.40	-
74	Rives <i>et al.</i> (2003)	t(3;19)(p21;p13.3)	39.1	60.90	+
		t(9;10)(q11;p11.1)	56.25	43.74	-
75	Baccetti <i>et al.</i> (2003)	t(10;15)(q26;q12)	32.8	65.80	+
76	Morel <i>et al.</i> (2004)	t(7;8)(q11.21;cen)	56.7	43.26	+
		t(7;8)(q11.21;cen)	62.84	36.88	+

In summary, the combination of meiotic studies and cytogenetic sperm analysis can help to better establish appropriate reproductive advice for these patients. The variability observed in the studies reported from individual carriers of inversions (Table 3) and from carriers of Robertsonian and reciprocal translocations (Tables 4 and 5) recommends that an exhaustive study could be carried out in infertile men to facilitate the subsequent appli-

cation of the most appropriate reproductive strategy.

#### 4 Infertile individuals with a normal karyotype

The majority of infertile individuals have a normal somatic karyotype, but show altered semenograms frequently. Furthermore, it has been reported that the frequencies of aneuploid and diploid sperm present in a

given semen sample are directly related to the reduction in the number and progressive motility of sperm [6,10], high levels of FSH [6] and previous IVF failures in the case of normozoospermic patients [7].

In normal individuals disomies are around 0.1 % for most autosomes and 0.3 % for chromosome 21 and the sex chromosomes. Increases in sperm aneuploidies in individuals showing oligoasthenoteratozoospermia (OTA) have been reported by many authors [8,10,78–91]. Furthermore, an increase in aneuploid sperm has been detected in individuals with alterations of any of the basic semen parameters: sperm number [89, 92], sperm motility [10] and sperm morphology [80, 89, 93–97]. Meiotic errors, either affecting synapsis during prophase I or meiotic recombination [98–100], can be the starting point for the production of these chromosomally unbalanced spermatozoa. These meiotic abnormalities have been related to mutations of meiosis-specific-genes involved in synaptic events, DNA recombination and DNA repair [101], as well as environmental factors [5, 38].

It is well known that, in assisted reproduction, when no sperm cells are present in the ejaculate, those coming from the epididymis or from the testicle are used. In the few cases in which sperm FISH studies have been undertaken, no significant differences in the frequencies of aneuploidy and diploidy from those observed in ejaculate sperm have been reported for epididymal sperm. Nevertheless, these results differ in testicular spermatozoa where the reported incidence of diploidy and disomies (especially for the sex chromosomes) is higher [102–104].

However, compilation of sperm FISH data in this group of patients (infertile with normal karyotype) reveals a great heterogeneity, and important interindividual variations in the results obtained. Thus, it is in these individuals that the application of complementary studies combining different FISH techniques (Multi-FISH in interphase nuclei and Multiplex-FISH in metaphase I and metaphase II spermatocytes) can provide more useful information about the entire spermatogenic process (from spermatogonia to spermatozoa). Furthermore, the possibility of identifying and analyzing all the chromosomes in metaphases I and metaphase II will provide an accurate evaluation of the chromosomes affected by synaptic abnormalities and of their meiotic behavior [14]. From a clinical point of view, in the group of patients-frequent candidates in assisted reproduction programs-the application of the different techniques available would allow

better reproductive counseling.

## 5 Conclusion

As shown in this review, spermatozoa of infertile individuals showed a greater incidence of chromosomal abnormalities than those of the fertile population. FISH studies in decondensed sperm nuclei became a notable advance in the study and diagnosis of male infertility and were widely incorporated both in the clinical practice and in the field of basic research.

The possibility of combining different FISH-based techniques opens new prospects for a better understanding of the entire spermatogenic process. Furthermore, these approaches offer novel possibilities for exhaustive cytogenetic analyses of the meiotic process, that could allow a better understanding of the meiotic process and of the consequences of meiotic abnormalities.

From a clinical point of view, the result of pooling all the data obtained from these analyses could help in the reproductive counseling offered to these patients. For instance, many groups of infertile patients are candidates for preimplantation genetic diagnosis [105,106], reorienting the chromosomal screening of the embryos.

## Acknowledgment

This research was supported by Project 161275 (Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain), Project DGR-2001 SGR-00202 (Generalitat de Catalunya, Spain) and Project SAF 2003-04312 (Dirección General de Investigación, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain). We wish to thank Ferran Garcia, Manuel Gil, Simón Marina, Olga Martínez-Passarell and Joaquim Sarquella for the biological samples contributed.

## References

- 1 Kùpker W, Schwinger E, Hiort O, Ludwig M, Nikolettos N, Schlegel PN, *et al*. Genetics of male subfertility: consequences for the clinical work-up. *Hum Reprod* 1999; 14: 24–37.
- 2 Zuffardi O, Tiepolo L. Frequencies and types of chromosome abnormalities associated with human male infertility. In: Crosignani PG, Rubin BH., editors. *Genetic Control of Gamete Production and Function*. New York: Academic Press; 1982. p261–73.
- 3 De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991; 6: 245–50.
- 4 Haidl G, Peschka B, Schwanitz G, Montag M, van der Ven K, van der Ven H. Cytogenetic and andrological status and ICSI-

- results in couples with severe male factor infertility. *Asian J Androl* 2000; 2: 293-6.
- 5 Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, *et al.* Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 93-105.
  - 6 Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Calderon G, Egozcue S, Egozcue J, *et al.* Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligospermia. *Hum Reprod* 1999; 14: 375-8.
  - 7 Egozcue S, Garcia F, López-Teijón ML, Olivares R, Serra O, Aura M, *et al.* Estudio de meiosis en biopsia testicular y su correlación con el patron seminológico. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana* 2004; Suppl 1: 252.
  - 8 Bernardini L, Martini E, Geraedts JP, Hopman AH, Lanteri S, Conte N, *et al.* Comparison of gonosomal aneuploidy in spermatozoa of normal fertile men and those with severe male factor detected by *in-situ* hybridization. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 431-8.
  - 9 Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, *et al.* Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an *in vitro* fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril* 1999; 72: 696-701.
  - 10 Vegetil W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, *et al.* Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence *in-situ* hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 2000; 15: 351-65.
  - 11 Rubio C, Gil-Salcom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, *et al.* Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001; 16: 2084-92.
  - 12 Egozcue J, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Sarrate Z, Vidal F. Genetic analysis of sperm and implications of severe male infertility - a review. *Placenta* 2003; 24 Suppl 2: S62-5.
  - 13 Vidal F, Sarrate Z, Blanco J, Egozcue S, Egozcue J. Multi-FISH analysis of meiotic anomalies. *Hum Reprod* 2003; 18 Suppl 1: 69-70.
  - 14 Sarrate Z, Blanco J, Egozcue S, Vidal F, Egozcue J. Identification of meiotic anomalies using multiplex FISH: preliminary results. *Fertil Steril* 2004; 82: 712-7.
  - 15 Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Usson Y, Cozzi J, Pelletier R, *et al.* Increased incidence of hyperhaploid 24, XY spermatozoa detected by three-colour FISH in a 46, XY/47, XXY male. *Hum Genet* 1996; 97: 171-5.
  - 16 Martini E, Geraedts JP, Liebaers I, Land JA, Capitanio GL, Ramaekers FC, *et al.* Constitution of semen samples from XYY and XXY males as analysed by *in-situ* hybridization. *Hum Reprod* 1996; 11: 1638-43.
  - 17 Guttenbach M, Michelmann HW, Hinney B, Engel W, Schmid M. Segregation of sex chromosomes into sperm nuclei in a man with 47,XXY Klinefelter's karyotype: a FISH analysis. *Hum Genet* 1997; 99: 474-7.
  - 18 Foresta C, Galeazzi C, Bettella A, Stella M, Scandellari C. High incidence of sperm sex chromosomes aneuploidies in two patients with Klinefelter's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 203-5.
  - 19 Kruse R, Guttenbach M, Scharfmann B, Schubert R, van der Ven H, Schmid M, *et al.* Genetic counseling in a patient with XXY/XXXY/XY mosaic Klinefelter's syndrome: estimate of sex chromosome aberrations in sperm before intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69: 482-5.
  - 20 Estop AM, Munne S, Cieply KM, Vandermark KK, Lamb AN, Fisch H. Meiotic products of a Klinefelter 47,XXY male as determined by sperm fluorescence *in-situ* hybridization analysis. *Hum Reprod* 1998; 13: 124-7.
  - 21 Lim AS, Fong Y, Yu SL. Estimates of sperm sex chromosome disomy and diploidy rates in a 47, XXY/46, XY mosaic Klinefelter patient. *Hum Genet* 1999; 104: 405-9.
  - 22 Rives N, Joly G, Machy A, Simeon N, Leclerc P, Mace B. Assessment of sex chromosome aneuploidy in sperm nuclei from 47, XXY and 46, XY/47, XXY males: comparison with fertile and infertile males with normal karyotype. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 107-12.
  - 23 Morel F, Roux C, Bresson JL. Segregation of sex chromosomes in spermatozoa of 46, XY/47, XXY men by multicolour fluorescence *in-situ* hybridization. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 566-70.
  - 24 Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J. Sperm chromosome analysis and outcome of IVF in patients with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril* 2000; 74: 925-9.
  - 25 Bielanska M, Tan SL, Ao A. Fluorescence *in-situ* hybridization of sex chromosomes in spermatozoa and spare preimplantation embryos of a Klinefelter 46, XY/47, XXY male. *Hum Reprod* 2000; 15: 440-4.
  - 26 Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47, XXY, mosaic 46, XY/47, XXY and 47, XYY) assessed by fluorescence *in-situ* hybridization. *Hum Reprod* 2001; 16: 887-92.
  - 27 Han TH, Ford JH, Flaherty SP, Webb GC, Matthews CD. A fluorescent *in situ* hybridization analysis of the chromosome constitution of ejaculated sperm in a 47, XYY male. *Clin Genet* 1994; 45: 67-70.
  - 28 Mercier S, Morel F, Roux C, Clavequin MC, Bresson JL. Analysis of the sex chromosomal equipment in spermatozoa of a 47, XYY male using two-colour fluorescence *in-situ* hybridization. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 485-8.
  - 29 Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Usson Y, Cozzi J, Pelletier R, *et al.* Meiotic behaviour of sex chromosomes investigated by three-colour FISH on 35, 142 sperm nuclei from two 47, XYY males. *Hum Genet* 1997; 99: 407-12.
  - 30 Blanco J, Rubio C, Simon C, Egozcue J, Vidal F. Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47, XYY male assessed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Hum Genet* 1997; 99: 413-6.
  - 31 Mennicke K, Diercks P, Schlieker H, Bals-Pratsch M, al Hasani S, Diedrich K, *et al.* Molecular cytogenetic diagnostics in sperm. *Int J Androl* 1997; 20 Suppl 3: 11-9.
  - 32 Martin RH, McInnes B, Rademaker AW. Analysis of aneuploidy for chromosomes 13, 21, X and Y by multicolour fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) in a 47, XYY male. *Zy-*

## Germ cell chromosome abnormalities

- gote 1999; 7: 131–4.
- 33 Morel F, Roux C, Bresson JL. Sex chromosome aneuploidies in sperm of 47, XYY men. *Arch Androl* 1999; 43: 27–36.
- 34 Shi Q, Martin RH. Multicolor fluorescence *in situ* hybridization analysis of meiotic chromosome segregation in a 47, XYY male and a review of the literature. *Am J Med Genet* 2000; 93: 40–6.
- 35 Rives N, Simeon N, Milazzo JP, Barthelemy C, Mace B. Meiotic segregation of sex chromosomes in mosaic and non-mosaic XYY males: case reports and review of the literature. *Int J Androl* 2003; 26: 242–9.
- 36 Skakkeboek NE, Philip J, Hammen R. Meiotic chromosomes in Klinefelter's syndrome. *Nature* 1969; 221: 1075–6.
- 37 Vidal F, Navarro J, Templado C, Brusadin S, Egozcue J. Synaptonemal complex studies in a mosaic 46, XY/47, XXY male. *Hum Genet* 1984; 66: 306–8.
- 38 Mroz K, Hassold TJ, Hunt PA. Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors. *Hum Reprod* 1998; 14: 1151–6.
- 39 Thompson H, Melnyk J, Hecht F. Reproduction and meiosis in XYY men. *Lancet*, 1967; II, 831.
- 40 Melnyk J, Thompson H, Rucci AJ, Vanasek F, Hayes S. Failure of transmission of the extra chromosome in subjects with 47, XYY karyotype. *Lancet* 1969; 2: 797–8.
- 41 Evans EP, Ford CE, Chaganti RS, Blank CE, Hunter H. XY spermatocytes in an XYY male. *Lancet* 1970; 1: 719–20.
- 42 Luciani JM, Vagner-Capodano AM, Devictor-Vuillet M, Aubert L, Stahl A. Presumptive fluorescent evidence for spermatocyte with X+Y+Y diakinetid univalents in an XYY male. *Clin Genet* 1973; 4: 415–6.
- 43 Chandley AC, Fletcher J, Robinson JA. Normal meiosis in two 47, XYY men. *Hum Genet* 1976; 33: 231–40.
- 44 Speed RM, Faed MJ, Batstone PJ, Baxby K, Barnetson W. Persistence of two Y chromosomes through meiotic prophase and metaphase I in an XYY man. *Hum Genet* 1991; 87: 416–20.
- 45 Tachdjian G, Frydman N, Morichon-Delvallez N, Du AL, Fanchin R, Vekemans M, *et al.* Reproductive genetic counselling in non-mosaic 47, XXY patients: implications for preimplantation or prenatal diagnosis: case report and review. *Hum Reprod* 2003; 18: 271–5.
- 46 Griffin DK, Hyland P, Tempest HG, Homa ST. Safety issues in assisted reproduction technology: Should men undergoing ICSI be screened for chromosome abnormalities in their sperm? *Hum Reprod* 2003; 18: 229–35.
- 47 Jaarola M, Martin RH, Ashley T. Direct evidence for suppression of recombination within two pericentric inversions in humans: a new sperm-FISH technique. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 218–24.
- 48 Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion inv6p23q25 carrier using FISH on decondensed sperm nuclei. *Cytogenet Genome Res* 2002; 97: 149–54.
- 49 Yakut T, Acar H, Egeli U, Kimya Y. Frequency of recombinant and nonrecombinant products of pericentric inversion of chromosome 1 in sperm nuclei of carrier: by FISH technique. *Mol Reprod Dev* 2003; 66: 67–71.
- 50 Mikhaail-Philips MM, Ko E, Chernos J, Greene C, Rademaker A, Martin RH. Analysis of chromosome segregation in sperm from a chromosome 2 inversion heterozygote and assessment of an interchromosomal effect. *Am J Med Genet* 2004; 127A: 139–43.
- 51 Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Delafontaine D, *et al.* Sperm nuclei analysis of a Robertsonian t(14q21q) carrier, by FISH, using three plasmids and two YAC probes. *Hum Genet* 1995; 96: 655–60.
- 52 Honda H, Miharu N, Samura O, He H, Ohama K. Meiotic segregation analysis of a 14;21 Robertsonian translocation carrier by fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Genet* 2000; 106: 188–93.
- 53 Escudero T, Lee M, Carrel D, Blanco J, Munne S. Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13;14)(q10;q10) carriers. *Prenat Diagn* 2000; 20: 599–602.
- 54 Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence *in situ* hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 2000; 106: 500–5.
- 55 Morel F, Roux C, Bresson JL. FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 483–8.
- 56 Frydman N, Romana S, Le Lore'h M, Vekemans M, Frydman R, Tachdjian G. Assisting reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation. *Hum Reprod* 2001; 16: 2274–7.
- 57 Acar H, Yildirim MS, Cora T, Ceylaner S. Evaluation of segregation patterns of 21;21 Robertsonian translocation along with sex chromosomes and interchromosomal effects in sperm nuclei of carrier by FISH technique. *Mol Reprod Dev* 2002; 63: 232–6.
- 58 Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod* 2004; 19: 1345–51.
- 59 Lu PY, Hammit DG, Zinsmeister AR, Dewald GW. Dual color fluorescence *in situ* hybridization to investigate aneuploidy in sperm from 33 normal males and a man with a t(2;8)(q23;q27;p21). *Fertil Steril* 1994; 62: 394–9.
- 60 Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Devillard F, *et al.* Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocations: analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 71: 240–6.
- 61 Van Hummelen P, Manchester D, Lowe X, Wyrobek AJ. Meiotic segregation, recombination, and gamete aneuploidy assessed in a t(1;10)(p22.1;q22.3) reciprocal translocation carrier by three- and four-probe multicolor FISH in sperm. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 651–9.
- 62 Blanco J, Egozcue J, Clusellas N, Vidal F. FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and interchromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenet Cell Genet* 1998; 83: 275–80.

- 63 Estop AM, Cieply KM, Wakim A, Feingold E. Meiotic products of two reciprocal translocations studied by multicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 83: 193-8.
- 64 Martini E, von Bergh AR, Coonen E, de Die-Smulders CE, Hopman AH, Ramaekers FC, *et al.* Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3;11)(q27.3;q24.3) by triple FISH. *Hum Genet* 1998; 102: 157-65.
- 65 Estop AM, Cieply KM, Munne S, Feingold E. Multicolor fluorescence *in situ* hybridization analysis of the spermatozoa of a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Hum Genet* 1999; 104: 412-7.
- 66 Cifuentes P, Navarro J, Blanco J, Vidal F, Míguez L, Egozcue J, *et al.* Cytogenetic analysis of sperm chromosomes and sperm nuclei in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) by *in situ* hybridisation. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 231-8.
- 67 Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Honda N, Ham T, Ohama K. Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers, t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p2.5;q32), by triple-color fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Genet* 1999; 105: 428-36.
- 68 Gilray JC, Kastrop PM, Tiemessen CH, van Inzen WG, Scheres JM, Pearson PL. Sperm analysis in a subfertile male with a Y;16 translocation, using four-color FISH. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 84: 67-72.
- 69 Estop AM, Cieply K, Munne S, Surti U, Wakim A, Feingold E. Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? Sperm FISH studies. *Hum Genet* 2000; 106: 517-24.
- 70 Morel F, Fellmann F, Roux C, Bresson JL. Meiotic segregation analysis by FISH investigation of spermatozoa of a 46,Y,der(X),t(X;Y)(qter→p22;q11→qter) carrier. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 92: 63-8.
- 71 Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Carrera M, Egozcue J, Benet J. Meiotic segregation analysis in a t(4;8) carrier: comparison of FISH methods on sperm chromosome metaphases and interphase sperm nuclei. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 395-403.
- 72 Geneix A, Schubert B, Force A, Rodet K, Briançon G, Boucher D. Sperm analysis by FISH in a case of t(17; 22)(q11; q12) balanced translocation: case report. *Hum Reprod* 2002; 17: 325-31.
- 73 Oliver-Bonet M, Navarro J, Carrera M, Egozcue J, Benet J. Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 958-63.
- 74 Rives N, Jarnot M, Mousset-Simeon N, Joly G, Mace B. Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) analysis of chromosome segregation and interchromosomal effect in spermatozoa of a reciprocal translocation t(9,10)(q11;p11.1) carrier. *J Hum Genet* 2003; 48: 535-40.
- 75 Baccetti B, Bruni E, Collodel G, Gambera L, Moretti E, Marzella R, *et al.* 10, 15 reciprocal translocation in an infertile man: ultrastructural and fluorescence *in situ* hybridization sperm study: case report. *Hum Reprod* 2003; 18: 2302-8.
- 76 Morel F, Douet-Guilbert N, Roux C, Tripogney C, Le Bris MJ, De Braekeleer M, *et al.* Meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21;cen) translocation in two carrier brothers. *Fertil Steril* 2004; 81: 682-5.
- 77 Sarrate Z, Blanco J, Egozcue S, Vidal F, Egozcue J. Meiotic studies in OAT patients using M-FISH. *Chromosome Res* 2004;12 (Abstract book 1): 115-6.
- 78 Moosani N, Pattinson HA, Carter MD, Cox DM, Rademaker AW, Martin RH. Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence *in situ* hybridization. *Fertil Steril* 1995; 64: 811-7.
- 79 Lihdetie J, Saari N, Ajospenaa-Saari M, Mykkanen J. Incidence of aneuploid spermatozoa among infertile men studied by multicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Am J Med Genet* 1997; 71: 115-21.
- 80 Bernardini L, Borini A, Preti S, Conte N, Flamigni C, Capitano G L, *et al.* Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. *Hum Reprod* 1998; 13: 3406-13.
- 81 Melnes B, Rademaker A, Greene CA, Ko E, Barclay L, Martin RH. Abnormalities for chromosomes 13 and 21 detected in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod* 1998; 13: 2787-90.
- 82 Colombero LT, Hariprashad JJ, Tsai MC, Rosenwaks Z, Palermo GD. Incidence of sperm aneuploidy in relation to semen characteristics and assisted reproductive outcome. *Fertil Steril* 1999; 72: 90-6.
- 83 Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doneel GF, Acosta AA, *et al.* Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence *in situ* hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999; 14: 1266-73.
- 84 Pfeiffer J, Pang MG, Hoegerman SF, Osgood CJ, Stacey MW, Mayer J, *et al.* Aneuploidy frequencies in semen fractions from ten oligoasthenoteratozoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999; 72: 472-8.
- 85 Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Sibert L, Simeon N, Joly G, *et al.* Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet* 1999; 105: 266-72.
- 86 Nishikawa N, Murakami I, Ikuta K, Suzumori K. Sex chromosomal analysis of spermatozoa from infertile men using fluorescence *in situ* hybridization. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 97-102.
- 87 Ushijima C, Kumasako Y, Kihai PE, Hirotsuru K, Utsunomiya T. Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Reprod* 2000; 15: 1107-11.
- 88 Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction* 2001; 121: 655-66.
- 89 Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Romeo R, Rappazzo G, *et al.* Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum Reprod* 2001; 16: 1172-9.

*Germ cell chromosome abnormalities*

- 90 Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R, DeRobertis C, Bergues U, Hennebicq S, *et al.* Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum Reprod* 2002; 17: 1292-8.
- 91 Lee MS, Tsao HM, Wu HM, Huang CC, Chen CI, Lin David PC. Correlations between sperm apoptosis and aneuploidy. *Hum Reprod* 2002; 17 (Abstract book 1): 112-3.
- 92 Schmid TE, Kamischke A, Bollwein H, Nieschlag E, Brinkworth MH. Genetic damage in oligozoospermic infertility patients. *Hum Reprod* 2002; 17 (Abstract book 1): 27.
- 93 In't Veld PA, Broekmans FJ, de France HF, Pearson PL, Pieters MH, van Kooij RJ. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. *Hum Reprod* 1997; 12: 752-4.
- 94 Bergère M, Rodrigues D, Eschwege P, Pfeffer J, Guthauser B, Selva J. How FISH can help with a decision to use ICSI for teratozoospermic patients. *Hum Reprod* 1997; 12 (Abstract book 1): 82.
- 95 Weissenberg R, Aviram A, Golan R, Lewin LM, Levron J, Madgar I, *et al.* Concurrent use of flow cytometry and fluorescence *in-situ* hybridization techniques for detecting faulty meiosis in a human sperm sample. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 61-6.
- 96 Viville S, Mollard R, Bach ML, Falquet C, Gerlinger P, Wurtler S. Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies?: case report. *Hum Reprod* 2000; 15: 2563-6.
- 97 Calogero AE, Vicari E, De Palma A, Burrello N, Barone N, Grazioso C, *et al.* Elevated sperm aneuploidy rate in patients with absolute polymorphic teratozoospermia. *Hum Reprod* 2002; 17 (Abstract book 1): 95-6.
- 98 Hulten M. Meiosis in XYY men. *Lancet* 1970; 1: 717-8.
- 99 Pearson PL, Ellis JD, Evans HJ. A gross reduction in chiasma formation during meiotic prophase and a defective DNA repair mechanism associated with a case of human male infertility. *Cytogenetics* 1970; 9: 460-7.
- 100 Egozcue S, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, *et al.* Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 307-9.
- 101 Baarends WM, van der Laan R, Grootegoed JA. DNA repair mechanisms and gametogenesis. *Reproduction* 2001; 121: 31-9.
- 102 Bernardini L, Gianaroli L, Fortini D, Conte N, Magli C, Cavani S, *et al.* Frequency of hyper-, hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients. *Hum Reprod* 2000; 15: 2165-72.
- 103 Palermo GD, Colombero LT, Hariprashad JJ, Schlegel PN, Rosenwaks Z. Chromosome analysis of epididymal and testicular sperm in azoospermic patients undergoing ICSI. *Hum Reprod* 2002; 17: 570-5.
- 104 Rodrigo L, Rubio C, Mateu E, Simon C, Remohi J, Pellicer A, *et al.* Analysis of chromosomal abnormalities in testicular and epididymal spermatozoa from azoospermic ICSI patients by fluorescence *in-situ* hybridization. *Hum Reprod* 2004; 19: 118-23.
- 105 Geraedts J, Handyside A, Harper J, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, *et al.* Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium: data collection (May 2000). *Hum Reprod* 2000; 15: 2673-83.
- 106 Aran B, Veiga A, Vidal F, Parrigo M, Vendrell JM, Santalo J, *et al.* Preimplantation genetic diagnosis in patients with male meiotic abnormalities. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 470-6.

7.1.3. Treball 3:

## Fluorescence in situ hybridization (FISH) Protocol in Human Sperm

J Vis Exp. Sep 1;(31). pii: 1405. doi: 10.3791/1405 (2009)

Z Sarrate, E Anton





## Video Article

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) Protocol in Human Sperm

Zaida Sarrate, Ester Anton  
Unitat de Biologia Cel·lular (Facultat de Biociències),

Correspondence to: Ester Anton at [ester.anton@uab.cat](mailto:ester.anton@uab.cat)

URL: <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1405>

DOI: 10.3791/1405

Citation: Sarrate Z, Anton E. (2009) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) Protocol in Human Sperm. *JoVE*, 31. <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1405>. doi: 10.3791/1405

## Abstract

Aneuploidies are the most frequent chromosomal abnormalities in humans. Most of these abnormalities result from meiotic errors during the gametogenic process in the parents. In human males, these errors can lead to the production of spermatozoa with numerical chromosome abnormalities which represent an increased risk of transmitting these anomalies to the offspring.

For this reason, the technique of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on sperm nuclei has become a protocol widely incorporated in the context of clinical diagnosis. This practice provides an estimate of the frequencies of numerical chromosome abnormalities in the gametes of the patients that seek for genetic reproductive advice.

To date, the chromosomes most frequently included in sperm FISH analysis are chromosomes X, Y, 13, 18 and 21.

This video-article describes, step by step, how to process and fix a human semen sample, how to decondense and denature the sperm chromatin, how to proceed to obtain sperm FISH preparations, and how to visualize the results at the microscope. Special remarks of the most relevant steps are given to achieve the best results.

## Protocol

## I. Sample processing and cell fixation

1. Leave the semen sample in sterile containers at room temperature for 20 minutes until liquefaction.
2. Transfer the sample to a centrifuge tube and spin it at 1000g for 5 minutes.
3. Gently remove and discard the supernatant using a Pasteur pipette.
4. Add hypotonic solution (KCl, 0.075M) pre-heated at 37°C, drop by drop, while mixing on a vortex to obtain a final volume of 10 ml.
5. Place the tube in a water bath at 37°C for 30 minutes.
6. Centrifuge at 1000g for 5 minutes. Carefully discard the supernatant by decantation, without disturbing the pellet.
7. After resuspending the pellet, add freshly prepared Carnoy's fixative (3:1 methanol:acetic acid) drop by drop while mixing on a vortex to obtain a final volume of 8 ml.
8. Repeat points 6 and 7 as many times as necessary to obtain a white pellet.
9. Add freshly prepared methanol:acetic acid (3:1) drop by drop to adjust the final volume to the cellular concentration required for obtaining good cell spreading (in those cases with a small pellet, few drops will be enough whereas samples with a high amount of sperm recovered, the final volume can reach 1-2 ml). A test slide can be made by dropping the resuspended sample onto an ungreased slide and examining it under a phase contrast microscope. This will let to check the cellular dispersion obtained and would allow correcting it, if it is necessary, in further slides.
10. To make the extensions, drop from a minimum height of 40 cm two or three drops of cell suspension into the center of unfrosted slides (previously stored in methanol at -20°C to degrease them). To enable the location of the sample throughout the protocol, mark the area containing the sperm extension on the opposite side of the slide using a diamond pencil.
11. Store the slides at -20°C for at least 24 hours.  
*Note: The addition of methanol:acetic acid (3:1) drop by drop while mixing is a very important step to avoid the formation of sperm aggregates.*

## II. Decondensation

1. The slides stored at -20°C must be defrosted to continue with the protocol (leave them at room temperature).
2. Place the slide in two consecutive coplin jars with 2x saline-sodium citrate solution (2xSSC) for 3 minutes each.
3. Transfer the slide through a series of ethanol washes for 2 minutes in each coplin jar. Start with 70% ethanol, follow by 90% and finish with 100%. Dry out the slide leaving it at room temperature.
4. Incubate the slide in dithiothreitol solution (1,4-dithiothreitol 5mM, 1% Triton X-100, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol 50mM) at 37°C in the incubator to decondense the chromatin. This product acts by breaking the disulfide bridges of the protamines that coil the DNA in the spermatozoa nucleus. This is a very important step because the DNA in the sperm nucleus is highly compacted. The incubation time of the slides in dithiothreitol solution (DTT) must be adjusted according to the sample's reactivity to this product. Usually, this time is around 8 minutes, although it can vary from 2 to 15 minutes.
5. Immediately, transfer the slide to two consecutive coplin jars with 2xSSC for 3 minutes in each coplin.
6. Continue by placing the slide through a series of ethanol washes for 2 minutes in each coplin jar (70%, 90% and 100% ethanol). Let the slide to dry out at room temperature.  
*Note: Excessive exposure to DTT would result in disperse FISH signals at the end of the procedure, whereas a too short exposure would result in a lack of some signals.*

### III. Hybridization

1. Denature the sperm DNA by incubating the slide in a coplin jar with formamide solution (70% Formamide/2xSSC) at 73°C for 5 minutes.
2. Transfer the slide through ethanol solutions for 1 minute per coplin jar (start with 70% ethanol, 85% and finish with 100%). Leave the slide to dry out at room temperature.
3. Add directly 5 l of the corresponding ready-to-use probe mixture to a 15x15 cover slip (AneuVysion Assay Multi-color Probe Panel: CEP 18/X/Y or LSI 13/21).
4. As it is shown in the video, carefully place the slide onto the cover slip to put together the target region and the probe mixture. Seal it with rubber cement.
5. Place the slide into a pre-warmed 37°C hybridization chamber (HYBrite™) and incubate it at 37°C for 5-24 hours.  
*Note: Whereas the denaturation of the sperm sample is mandatory, the necessity of denaturing the probes is determined by the manufacturer. The probe mixtures used in this protocol are ready to use and, in this case, probe denaturation is not required. The volume of the probe mixture will vary according to the size of the hybridized area.*

### IV. Washes post-hybridization

1. Take out the slide from the hybridization chamber.
2. Remove the rubber cement and carefully pull out the cover slip sliding gently to the side.
3. To eliminate the unspecific hybridization signals place the slide for 2 minutes in a coplin jar with 0.4xSSC/0.3%NP-40 pre-warmed at 73°C in a water bath.
4. Transfer the slide to a 2xSSC/0.1%NP-40 wash solution at room temperature for 1 minute. Let the slide to dry out at room temperature.
5. Add a counterstaining product to the target region (5 l for an 18x18 cover slip). The most common product used is 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vysis Inc.).
6. As it is shown in the video, cover the hybridized region with a cover slip (to preserve the hybridization the cover slip can be sealed with nail varnish).
7. Store hybridized slides at -20°C in the dark until their prospect analysis. Under these conditions the slides can be stored for up to 12 months without significant lost in fluorescence signal intensity.  
*Note: A higher temperature or an excessive wash time can result in the elimination of some signals, whereas the opposite would not wash out unspecific probe hybridizations. The volume of the counterstaining product added will vary according to the size of the hybridization area to cover.*

### V. Visualization

The preparations can be evaluated under an epifluorescence microscope equipped with a triple-band filter for DAPI/Texas Red/FITC and single-band filters for Aqua, FITC and Texas Red. Standard assessment criteria must be followed for the correct evaluation of the sperm nuclei<sup>1</sup>.

The preparation hybridized with probes for chromosomes X, Y and 18 should display signals for these three chromosomes. Every normal spermatozoa must show one blue signal (corresponding to the chromosome 18), and a green signal (X-bearing spermatozoa) or a red signal (Y-bearing spermatozoa).

In the preparation hybridized with probes for chromosomes 13 and 21, a green signal for chromosome 13 and a red signal for chromosome 21 should be distinguished in every normal spermatozoa.

#### Discussion

This protocol describes how to process human semen samples for obtaining sperm FISH preparations. Using this protocol it is possible to analyze chromosomal abnormalities in male gametes. Spermatozoa aneuploidy screening has applications either in the context of basic research and in the reproductive advice given to infertile males. Although in clinical diagnosis the most widely studied chromosomes are X, Y, 13, 18 and 21, other commercial probes for a wide range of chromosomes and loci are available and can also be used in these experiments.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Generalitat de Catalunya (2005-SGR00437). The authors thank to J. Blanco and F. Vidal for their supervising and encouragement, and J. Lucas for his technical assistance.

#### References

1. Blanco, J., Egozcue, J. & Vidal, F. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. Hum. Reprod. 11, 722-726 (1996).

7.1.4. Treball 4:

## Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance

Fertil Steril 93, 1892-1902 (2010)

Z Sarrate, F Vidal, J Blanco



## Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance

Zaida Sarrate, B.Sc., Francesca Vidal, Ph.D., and Joan Blanco, Ph.D.

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

**Objective:** To determine the group of infertile patients that would benefit from sperm fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis, the number of chromosomes to be analyzed, and the diagnostic interpretation of the results obtained.

**Design:** A retrospective study of sperm FISH analyses.

**Setting:** Universitat Autònoma de Barcelona.

**Patient(s):** Three hundred nineteen infertile men.

**Intervention(s):** Semen samples were processed for FISH.

**Main Outcome Measure(s):** The frequencies of chromosomal abnormalities for chromosomes 13, 18, 21, X, and Y were compared to the seminogram, the somatic and meiotic karyotype, and the age.

**Result(s):** The highest percentages of patients with an increased rate of sperm chromosome abnormalities were found in the oligozoospermic (50%), oligoasthenozoospermic (33.3%), and oligoasthenoteratozoospermic (21%) individuals. Low sperm count was the only parameter correlated with the percentage of chromosome abnormalities. The 14% of the individuals with a normal somatic karyotype had an increased rate of sperm chromosome abnormalities. This percentage was higher in the group with an altered somatic karyotype (36%) and in patients with meiotic abnormalities (26%).

**Conclusion(s):** Sperm FISH studies are indicated when the oligo condition is present and in individuals with an abnormal somatic or meiotic karyotype. The analysis of chromosomes 21, X, and Y is enough to identify at-risk individuals. Significant differences in the rates of chromosome abnormalities should be taken into consideration regardless of the numerical value. (*Fertil Steril* 2010;93:1892–902. ©2010 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** Chromosome abnormalities, clinical relevance, indications, male infertility, sperm FISH, study approach

Aneuploidies are the most frequent chromosomal abnormalities in humans, and are detected in 35% of miscarriages, 4% of stillbirths, and 0.3% of live births (1). The majority are the result of meiotic errors during the process of gametogenesis in the parents. In men the study of the origin of these errors has revealed abnormal meiotic recombination (2), which, in addition to being related to the production of aneuploid gametes, could give rise to different degrees of meiotic arrest (3). Although meiotic studies are occasionally carried out in the context of clinical diagnosis (2), one of the protocols that has been most widely and most rapidly incorporated is fluorescent in situ hybridization (FISH) in spermatozoa, a technique that provides an estimate of the frequencies of chromosomal abnormalities.

Several investigators have reported a high number of chromosomal abnormalities in spermatozoa from patients with an altered seminogram (4–8). This result has been related to the diminished fertility of the patients and to an increased risk for the transmission of abnormalities. However, there is a great variability among studies, either due to the number of individuals studied, the criteria for classifying them, the characteristics of the control group used, the criteria used to assess samples, or even the statistical comparisons performed (9). Thus, from published data, it is difficult to identify which group of infertile patients would most benefit from a sperm FISH study.

Another controversial aspect of sperm–FISH studies concerns the number and the chromosomes to be evaluated to ensure an appropriate reproductive counseling. At present, the most widely studied chromosomes have been X, Y, 13, 18, and 21. However, a considerable number of centers have started to include other chromosomes in their studies, the idea being that the more information is available the more accurate the diagnosis will be. This has raised doubts about how to choose the most coherent and well-balanced analytic strategy with respect to the parameters of time, cost, and the results obtained.

Received December 5, 2006; revised December 19, 2008; accepted December 26, 2008; published online February 28, 2009.

Z.S. has nothing to disclose. F.V. has nothing to disclose. J.B. has nothing to disclose.

Supported by the Project 2005SGR-00437 (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca de la Generalitat de Catalunya, Spain) and Project 180034 (Universitat Autònoma de Barcelona, Spain).

Reprint requests: Joan Blanco, Ph.D., Unitat de Biologia Cel·lular, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Spain (FAX: 34-935812295; E-mail: joan.blanco@uab.cat).

The majority of studies agree that there is a clear and close relationship between aneuploidies and male infertility. In addition, they also agree that significant increases in the rate of aneuploidies usually correspond to percentages that are moderate in overall terms. However, the diagnostic interpretation of these increases and the genetic counseling that is subsequently given do not always coincide.

The present study has three objectives: [1] to identify those patients in which a FISH analysis of spermatozoa would be indicated; [2] to determine what chromosomes should be studied when seeking effectiveness in terms of time, cost, and obtained information; and [3] to interpret the results in view to its clinical relevance.

To achieve these objectives we conducted a retrospective study of medical records and the results of FISH analyses of spermatozoa carried out in our laboratory between 1998 and 2005.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Population

We analyzed semen samples from 319 individuals who consulted due to fertility problems and who were seen at six assisted reproduction centers (ART). The mean age of patients was  $36 \pm 5$  years (range 21–53 years). The control population was established in our laboratory and comprised six fertile and normozoospermic men who ranged in age from 20–25 years. All participants gave their informed consent with regard to participation in the study.

Criteria from the World Health Organization (10) were used to classify all the samples according to parameters of sperm count, motility, and morphology. The reproductive history of the patients included the somatic karyotype in 266 men and the meiotic karyotype in 113; both results were recorded in 98 cases.

Analysis of the somatic karyotype in peripheral blood was based on standard protocols and G-banded metaphase chromosomes. The meiotic preparations were obtained from testicular biopsy samples processed according to the protocol described by Evans et al. (11). Meiotic studies were based on the analysis of the different phases of spermatogenesis, thus enabling to assess meiotic arrest, synaptic abnormalities in metaphase I (desynapsis), and aneuploidies in metaphase II.

The characteristics of the patients according to semen parameters and to the somatic and meiotic karyotype are shown in Table 1.

### Processing of Semen Samples

Semen samples were fixed in methanol:acetic acid (3:1) and spread onto microscope slides. Before applying the FISH protocol the nuclei of the spermatozoa were decondensed by incubating the preparations in 5 mM of dithiothreitol (DTT) and 1% Triton X-100. The details of the fixation and

decondensation protocols used have been previously described by Vidal et al. (12).

### FISH Protocol

Two hybridizations were performed for each sample: one used centromeric probes to study chromosomes X, Y, 18 (spectrum Green, spectrum Orange, and spectrum Aqua, respectively), whereas the other used specific locus probes for chromosomes 13 and 21 (spectrum Green and spectrum Orange) (AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit; Vysis Inc., Downers Grove, IL). In both cases the hybridization protocol applied was the standard one used in our laboratory (12).

### Microscope Evaluation

The preparations were evaluated under an Olympus BX60 epifluorescence microscope (Olympus, Barcelona, Spain) equipped with a triple-band filter for 6-diamino-2-phenylindole (DAPI)/Texas Red/fluorescein isothiocyanate conjugate (FITC) and single-band filters for FITC, Texas Red, and Aqua. A mean number of  $508 \pm 131$  spermatozoa were evaluated for each hybridization and patient in line with standardized analytic criteria (13). The control population was established from the analysis of 63,811 spermatozoa for chromosomes X, Y, and 18 ( $10,635 \pm 438$  spermatozoa/patient) and 62,345 spermatozoa for chromosomes 13 and 21 ( $10,390 \pm 192$  spermatozoa/patient). The observed frequencies of disomy for the sex chromosomes and for chromosomes 13, 18, and 21, as well as the diploidy rates were recorded.

### Statistical Analysis

To determine whether the disomy and diploidy rates observed among infertile men were different from those in the control population we applied Fisher's exact test. This statistical comparison was performed for the five genotypes analyzed and the results were considered in both population and individual terms, grouping the patients according to the characteristics of the seminogram, the somatic karyotype, and the meiotic karyotype.

The correlation between an increased rate of chromosomal abnormalities and the parameters of sperm count, motility, morphology, and age was assessed by means of Pearson's correlation coefficient.

All the analyses were performed using SPSS (Version 13.0.1, Chicago, IL), with specialist assistance being provided by the Statistics Service of the Universitat Autònoma de Barcelona. For all statistical tests the level of significance was set at  $P < .05$ .

## RESULTS

In the study population the rates of sex chromosome and chromosome 21 disomies were higher than in the control group (0.41% vs. 0.19% and 0.15% vs. 0.07%, respectively;  $P < .05$ ).

TABLE 1

## Patient classification according to seminal parameters, somatic karyotype, and meiotic study.

Categories of classification	No. patients	% patients	Age range (y)	Detailed karyotype
Seminal parameters				
Asthenoteratozoospermia (AT)	71	22.3	27-53	
Atherozoospermia (A)	67	21.0	27-49	
Normozoospermia (N)	34	10.7	28-52	
Oligosafhenoteratozoospermia (OAT)	62	19.4	21-46	
Oligosafhenozoospermia (OA)	51	16.0	28-48	
Oligoteratozoospermia (OT)	13	4.1	28-41	
Oligozoospermia (O)	4	1.3	33-37	
Teratozoospermia (T)	17	5.2	30-52	
Total	319	100.0	21-53	
Karyotype				
46,XY	245	92.1	21-52	
Polymorphisms	13	4.9	29-45	
Abnormal	8	3.0	27-40	46,XY,1q11+
				46,XY,inv9(p11q12)
				46,XY,inv9(p11q12)
				46,XY,inv9(p11q12)
				46,XY,inv9(p11q12)
				46,XY,inv9(p11q12)
				46,XY,inv9(p11q12)
				46,XY,inv9(p11q12)
				46,XY,16q11
				46,XY,22s+
				46,X,invY(p11.1q11.2)
				46,XY,t(3;16)(p21;q13)
				46,XY,t(5;19)(12;p13.3)
				45,XY,der(13;14)(q10;q10)
				45,XY,der(13;14)(q10;q10)
				45,XY,der(13;14)(q10;q10)
				46,X,invY(p11.1q11.23),inv4ip14p15.3)
				47,XXY(50%)46,XY(50%)
				47,XY,mar+
Total	266	100.0	21-52	
Meiotic study				
Normal	36	31.9	27-49	
Abnormal	55	48.7	25-52	
Desynapsis	11	9.7	29-44	
Arrest	2	1.8	33-34	
Desynapsis and arrest	9	7.9	27-42	
Noninformative	113	100.0	25-52	

Serrate, Sperm FISH studies. Fertil Steril 2010.

On the individual level, 49 of the 319 patients (15.36%) showed a significantly increased rate of abnormalities for at least one of the chromosomes analyzed (Table 2). The percentages that showed significant increases were moderate in overall terms, ranging from 0.54%–4.92% (mean 1.41%  $\pm$  1%). Disomy rates for chromosomes 13 and 18 were in all cases equivalent to those of the control population; this analysis excluded the three individuals with a 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype.

When individuals were grouped according to the characteristics of the seminogram, all of these groups included patients with an increased rate of chromosomal abnormalities in their gametes (Table 3). The highest percentages were found in the groups of oligozoospermic (2/4, 50%), oligoasthenozoospermic (17/51, 33.3%), and oligoasthenoteratozoospermic (13/62, 21%) patients, the rate being between 5.9% and 15.4% in the remaining groups.

Of the three semen parameters analyzed (sperm count, motility, and morphology) a reduced sperm count was the only parameter that was correlated with the total percentage of chromosome abnormalities ( $R = -0.186$ ;  $P = .0009$ ) (Fig. 1). With regard to the five genotypes analyzed a correlation was only observed for the rate of sex chromosome disomy ( $R = -0.158$ ;  $P = .005$ ) and diploidy ( $R = -0.124$ ;  $P = .027$ ).

Among individuals with a normal somatic karyotype (245/266), 14% (34/245) had an increased rate of chromosome abnormalities in the spermatozoa. In the group of individuals with polymorphisms (13/266) a significant increase was observed in 3 of the 13 patients. In patients with karyotype abnormalities (8/266), we excluded from the statistical analysis the patient with a 47,XY,mar+ karyotype as the origin of the marker chromosome was unknown. In the remaining seven patients we only considered an increased rate of chromosome abnormalities when they did not affect the chromosomes involved in the alterations and, in this case, a significant increase was detected in one of the seven patients.

Among individuals with a normal meiotic result, 8.3% (3/36) had a significantly increased rate of chromosome abnormalities in their gametes, whereas the corresponding figure for patients with an abnormal meiotic karyotype was 26.5% (18/68) (Table 4).

There was no correlation between age and the percentage of chromosome abnormalities in spermatozoa ( $R = 0.1017$ ;  $P = .113$ ) (Fig. 1). In this case, we only considered those men with a normal somatic karyotype. There was no significant difference between the mean age of the 34 men with a significantly increased rate of abnormalities ( $37 \pm 5$  years; range 29–52 years) and the mean age of the remaining patients ( $35 \pm 5$  years; range 21–52 years) ( $P = .088$ ; Mann-Whitney  $U$  test,  $P < .05$ ).

The individuals with a significantly increased rate of chromosome abnormalities were then grouped together to pool the data (Table 2). It was found that 69% (34/49) of these patients had a low sperm count. Furthermore, 81% (34/42) of

men with a known somatic karyotype had a normal karyotype. Among those patients in whom a meiotic study had been performed, 78% (18/23) presented meiotic abnormalities, mostly due to synaptic defects (57%, 13/23).

## DISCUSSION

### Indications for a FISH Analysis

It has been widely reported that the gametes of infertile individuals show a higher rate of chromosome abnormalities than the general population (14). The results from our series confirm once more this fact, but also illustrate the difficulty to delineate groups of patients having a clear indication for FISH studies.

**Seminogram** Several studies have shown a relationship between male infertility, semen quality, and increased rates of aneuploidies in spermatozoa (8, 9, 15–19). However, it is difficult to assess the individual contribution of each of the three sperm parameters (count, motility, and morphology) as the observed changes often appear in a combined way. In addition, the variability among the different published series hinders the comparison of results.

The relationship between the oligo condition and the rate of aneuploidies in spermatozoa has been analyzed in several studies. As in the present study, the majority of these reports show that infertile patients with a low sperm count often present higher rates of aneuploid spermatozoa (20–24). Furthermore, our analysis of the relationship between sperm count and the overall increased rates of chromosome abnormalities in spermatozoa revealed an inverse correlation between these two parameters, this being consistent with most of the series reported up to date (Ref. 25 [50 patients]; Ref. 26 [15 patients]; Ref. 27 [19 patients]; Ref. 28 [30 patients]). It is well known that during spermatogenesis various checkpoints are activated to arrest cells with chromosome abnormalities, leading to a reduction in gamete production and therefore the oligo status (for a review, see Ref. 29). Inefficient control mechanisms could therefore be one explanation for the increased rate of chromosome abnormalities observed in spermatozoa. For example, there may be errors in the identification of abnormal cells, or a malfunction in the process of cell elimination, or even that the number of abnormal cells was too high to be completely removed by the control systems.

Whereas the link between a low sperm count and an increased risk of aneuploidies in spermatozoa is widely accepted, the relationship between chromosome abnormalities and sperm motility is more controversial (7, 30). Although some investigators have reported a certain correlation between the two parameters (26, 30–32), especially for sex chromosomes, other studies have failed to find any relationship (25, 27, 33). With regard to our series, although some asthenozoospermic patients showed a significantly higher rate of chromosome abnormalities we found no correlation between these two parameters; not even when analyzing the 67 patients purely asthenozoospermic ( $R = -0.1218$ ;  $P = .326$ ).



**TABLE 2**

Characteristics of patients with increased disomy and diploidy rates in their gametes.

Patient code	Seminal parameters	Age, y	Karyotype	Meiotic study	Disomy (%)					
					Chr. 13	Chr. 18	Chr. 21	Chr. XY	Diploidy (%)	
180	AT	52	46,XY	Abnormal (D)				2.82		0.59
70	AT	36	46,XY	Normal						0.79
118	AT	45	46,XY	Abnormal (D)						1.08
64	AT	45	46,XY,inv9(p11q12)	Abnormal (D)						0.59
140	AT	39	Unknown	—						
99	AT	33	Unknown	—				1.00		
165	A	36	46,XY	—		0.96				0.68
184	A	37	46,XY	Abnormal (D)		1.37				
16	A	33	46,XY	—				0.93		
42	A	30	46,XY	—						2.67
193	N	39	46,XY	Normal						0.56
24	N	29	46,XY	—				0.79		
286	N	42	46,XY	Abnormal (D)				1.93		1.97
388	N	34	46,XY	—						0.57
336	OAT	29	46,XY	Abnormal (A)						0.78
191	OAT	37	46,XY	—						
33	OAT	39	46,XY	—				0.96		
129	OAT	37	46,XY	—				0.98		
112	OAT	45	46,XY	Abnormal (D)				3.15		0.90
59	OAT	36	46,XY	Abnormal (D)				2.25		0.71
39	OAT	33	46,XY	—				0.78		1.76
178	OAT	32	46,XY	Normal				1.15		1.27
86	OAT	29	46,XY,1qh+	Abnormal (D)						
51	OAT	34	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	Abnormal (A)	1.79					
233	OAT	36	Unknown	—				0.88		0.91
199	OAT	29	Unknown	Abnormal (A)				1.00		0.76
17	OAT	29	Unknown	Abnormal (D)				1.10		
26	OA	35	46,XY	—				0.97		
215	OA	37	46,XY	—					4.49	0.79
217	OA	38	46,XY	—						0.54
232	OA	48	46,XY	—						0.68
242	OA	39	46,XY	—						
166	OA	36	46,XY	Abnormal (D)				1.54		1.26

Sarrate. Sperm FISH studies. Fertil Steril 2010.

<b>TABLE 2</b>		<b>Disomy (%)</b>									
<b>Continued.</b>											
<b>Patient code</b>	<b>Seminal parameters</b>	<b>Age, y</b>	<b>Karyotype</b>	<b>Meiotic study</b>	<b>Chr. 13</b>	<b>Chr. 18</b>	<b>Chr. 21</b>	<b>Chr. XY</b>	<b>Diploidy (%)</b>		
12	OA	31	46,XY	—				1.03	0.87		
243	OA	38	46,XY	Abnormal (D)				1.84			
287	OA	40	46,XY	—				4.92			
398	OA	33	46,XY	Noninformative				1.82	1.40		
399	OA	34	46,XY	—					0.70		
172	OA	38	46,XY	Abnormal (A)					0.59		
328	OA	34	46,XY,22s+	Abnormal (DA)				2.40			
264	OA	32	46,XY,(3;16)(p21;q13)	—					2.71		
331	OA	39	47,XXY (50%)/46,XY(50%)	—		1.99					
356	OA	40	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	—	0.59				0.98		
48	OA	37	Unknown	—				0.78			
188	OT	34	46,XY	Abnormal (A)					0.77		
376	OT	27	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	—	4.30						
279	O	35	46,XY	—				1.37	0.77		
18	O	37	Unknown	—				1.61			
355	T	37	46,XY	Noninformative					0.96		
Controls	N	20–25	46,XY	—	0.06	0.03	0.07	0.19	0.22		

Note: D = desynapsis; A = arrest; DA = desynapsis and arrest; other abbreviations as in Table 1.  
P < .05.

Source: Sperm FISH studies. *Fertil Steril* 2010.

TABLE 3

Patients with abnormal FISH results classified according to their seminal parameters.

Seminal parameters	Altered FISH results	%
Asthenoteratozoospermic (AT)	6/71	8.5
Asthenozoospermic (A)	4/67	6.0
Normozoospermic (N)	4/34	11.8
Oligoasthenoteratozoospermic (OAT)	13/62	21.0
Oligoasthenozoospermic (OA)	17/51	33.3
Oligoteratozoospermic (OT)	2/13	15.4
Oligozoospermic (O)	2/4	50.0
Teratozoospermic (T)	1/17	5.9
Total	49/319	15.36

Note: FISH = fluorescent in situ hybridization.

Sarrate. Sperm FISH studies. *Fertil Steril* 2010.

Concerning sperm morphology, all studies that have analyzed individuals with polymorphic teratozoospermia report on some men with moderate, but significant increases, in the aneuploidy rate for the sex chromosomes (5, 27, 34–38). However, the results obtained in our series showed no correlation for this parameter, not even when analyzing the 17 exclusively teratozoospermic patients ( $R = 0.190016$ ;  $P = .469$ ). In addition, only one man presented a significant increase for diploidy.

Thus, the relationship between an increased rate of chromosome abnormalities in spermatozoa and asthenozoospermia or teratozoospermia cannot be clearly established. At present, the isolated increases observed in asthenozoospermic, teratozoospermic, and normozoospermic patients are of unknown etiology.

**Somatic karyotype** Carriers of chromosome abnormalities often experience fertility problems as they have a certain risk of producing unbalanced spermatozoa for the chromosomes involved in the reorganization. In addition, the reorganized chromosomes often show asynaptic regions during the first meiotic division, which may interfere with the pairing and segregation of other unpaired segments (39). This phenomenon, known as interchromosomal effect (40), has been suggested to occur in carriers of chromosomal abnormalities and also in individuals having polymorphic variants.

Although several studies have reported the occurrence of interchromosomal effects in reorganization carriers (41–45), other studies have failed to replicate these findings (46, 47). The population analyzed in our study included seven men with an altered somatic karyotype (Table 1). Their cytogenetic characteristics were very heterogeneous; therefore it was impossible to draw any conclusion about the potential benefits of sperm FISH analysis. With the aim of giving more relevance to these results we also took into account other studies published by us in infertile men carriers of chromosome reorganizations (Robertsonian translocations [Ref. 42]; reciprocal translocations [Refs. 48, 49]; inversions [Refs. 50, 51]). By

pooling all of these data, an interchromosomal effect can be noticed in 33% of men with Robertsonian translocations, in almost 44% of men with reciprocal translocations, and in 20% of men with inversions. These figures are clearly higher than the 14% infertile men showing an abnormal FISH result, suggesting the participation of the interchromosomal effect as an additional source of numerical chromosome anomalies in the spermatozoa of reorganization carriers.

Regarding polymorphic variants, a common chromosome polymorphism in humans is the pericentric inversion of chromosome 9 (9qh). Although it is classified as a minor chromosomal reorganization, some studies have related these inversions to reproductive problems (52–54). In our study, one of the patients belonging to this group (1/9, 11%) showed a higher rate of chromosome abnormalities, specifically for diploidy, this being consistent with the report of Collodel et al. (54). This rate is similar to the percentage found for the group of infertile individuals with a normal karyotype (11% vs. 14%), suggesting no evidence for an interchromosomal effect in these patients.

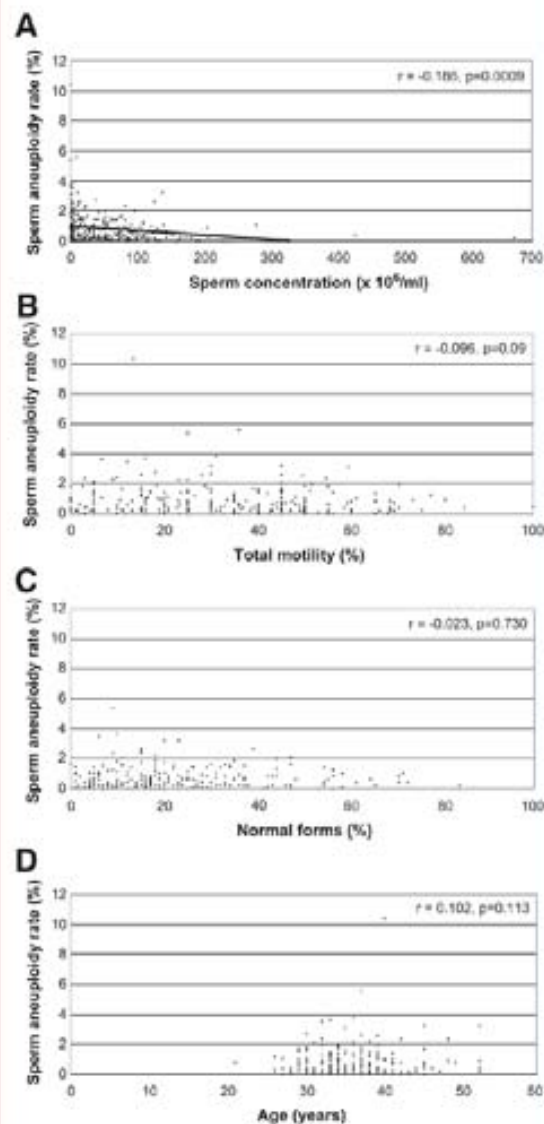
Heterochromatin polymorphisms are also considered a variant of the normal somatic karyotype, but they appear to be more common among infertile patients than in the general population (55–58). The only study to have analyzed chromosome abnormalities in the spermatozoa of these men described significant increases (58). Two of the three patients with heterochromatin polymorphisms included in our study showed higher rates of chromosome abnormalities. Although we are aware that there is a need for larger studies to reach any conclusion, the results point to the production of sperm chromosome abnormalities in these individuals.

**Meiotic karyotype** Several studies have related errors in the processes of chromosome pairing and recombination with male infertility, either due to the production of aneuploid spermatozoa or to meiotic arrest (2, 3, 59).

In our population, and in line with previous findings, we observed two types of meiotic abnormalities: synaptic anomalies

FIGURE 1

Scatter plot of sperm concentration (A), total motility (B), percentage of normal forms (C), and age (D) versus the total sperm aneuploidy rate.



Sarrate. Sperm FISH studies. *Fertil Steril* 2010.

(81%) and meiotic arrest (16%), although in some cases both abnormalities were present (3%). Of the 55 individuals with synaptic abnormalities, only 21.8% showed a significantly increased rate of aneuploidy in their gametes. The corresponding percentages for patients with meiotic arrest and both abnormalities combined were 45.5% and 50%, respectively. In all cases the incidence was clearly higher than that observed in patients with a normal meiotic result (8%).

Fertility and Sterility®

TABLE 4

Patients with chromosomal abnormalities in spermatozoa classified according to the meiotic study results.

Meiotic study	Altered FISH results	%
Normal	3/36	8.3
Abnormal		
Desynapsis (D)	12/55	21.8
Arrest (A)	5/11	45.5
Desynapsis and arrest (DA)	1/2	50.0
Non informative	2/9	22.2
Total	23/113	20.4

Sarrate. Sperm FISH studies. *Fertil Steril* 2010.

These results show that there had been a clear reduction of abnormal cells across the process of spermatogenesis in 74% of patients, probably due to the activation of checkpoints that would selectively eliminate aneuploid cells (60, 61).

In any case, the percentage of patients with meiotic abnormalities who were carriers of chromosome abnormalities in their spermatozoa (26%) was also higher than the 14% reported for infertile men with a normal karyotype, suggesting, as in the case of somatic karyotype, its implication in the generation of sperm aneuploidies.

**Paternal age** Some investigators have sought to establish a relationship between the presence of chromosome abnormalities in gametes and specific factors such as age of the parents. Although it is known that advanced maternal age is a risk factor for giving birth to children with aneuploidies, there are mixed results for the risk associated with advanced paternal age (62–65).

Not too much research has been devoted to analyze this relationship in infertile men. Although some studies found no correlation (66, 67), other investigators report an age effect, but exclusively on the rate of sex chromosome disomy (65, 68). Furthermore, it should be mentioned that Plastira et al. (65) found a higher rate of sex chromosome aneuploidy in younger men.

Our study showed no correlation for any of the chromosome abnormalities analyzed. In addition, we found no differences between the age of patients showing a significantly increased rate of abnormalities (mean  $37 \pm 5$  years; range 29–52 years) and the age of the remaining individuals (mean  $35 \pm 5$  years; range 21–52 years). In view of these results it can be considered that above a certain age (52 years; the maximum age in our series), the rate of chromosome abnormalities could increase. However, a recent study of almost 100 individuals ranging in age from 22–80 years also failed to show any age effect (64).

In summary, and to answer the first objective of this study, a FISH analysis of spermatozoa is especially indicated in:

1. Individuals with a normal somatic karyotype and low sperm count. For other abnormalities in the seminogram its application will depend on the couple's reproductive history.
2. Individuals with an abnormal somatic karyotype or who are carriers of heterochromatic polymorphisms.
3. Individuals with an abnormal meiotic karyotype.

### Chromosomes to Be Studied

To attain the objective of determining the chromosomes to be studied to optimize the technique in terms of time, cost, and information, we conducted an exhaustive review of the literature that has reported a significantly increased rate of aneuploidies in infertile men. Taken as a whole, these studies have evaluated chromosomes 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 21, 22, X, and Y (15, 18–20, 22–28, 30–33, 35, 36, 69–80). Almost all articles have evaluated the anomalies for the sex chromosomes in addition to one or more autosomes. Reviewing the results individual by individual, only four patients showed an increase in the rate of abnormalities for autosomes alone (chromosome 21 disomy [Refs. 18, 70, 78]; chromosome 18 disomy [Ref. 18]; chromosome 15 disomy [Ref. 75]).

In our series we found a significantly increased rate of sex chromosome disomies and chromosome 21 disomy. In contrast, the disomy rate in chromosomes 13 and 18 was in all cases equivalent to that found in the control population. These findings are consistent with previous studies reporting that the sex chromosomes and chromosome 21 show higher percentages of nondisjunction when compared with other chromosomes (13, 59, 81). Furthermore, compiling all the results reported up to date, it can be stated that the presence of increased rates of abnormalities affecting only autosomes, with the exception of chromosome 21, seldom occur.

Thus, regarding the second objective of our study, we can conclude that the study of chromosomes 21, X, and Y would be enough to identify the majority of patients at risk, that is, those individuals with a higher probability of producing chromosomally abnormal spermatozoa than is found among the general population. Ferguson et al. (82) have already suggested that the analysis of recombination events between sex chromosomes could be a useful indicator for identifying men with an increased risk of producing chromosomally abnormal spermatozoa.

### Interpreting the FISH Results

The increases in the anomalies are in line with percentages described in most of the studies reviewed in the present report. Furthermore, it is evident that the raw numbers are moderate in overall terms (ranging from 0.54%–4.92%; mean 1.41%  $\pm$  1%). Accordingly, the clinical relevance of the sperm-FISH results merits to be addressed.

Abnormal results in sperm-FISH analyses could be considered from two perspectives:

- **Quantitative:** the significant increases would be interpreted as a numerical value that would indicate the patient's degree of risk. The main drawback of this interpretation derives from the characteristics of the technique itself. First, it is very difficult to analyze all the chromosomes of the karyotype (normally only X, Y, 13, 18, and 21 are analyzed), and second, not all of the chromosome abnormalities are evaluated (e.g., nullisomies are not considered). In addition, the assessment criteria used are very strict and yield an estimate on the low side of real rates; therefore, in our view it would be a mistake to give them a strictly numerical interpretation.
- **Qualitative:** in this case the significant increases would have to be interpreted as evidence that there are abnormalities in the pairing, recombination, or segregation of meiotic chromosomes, thus indicating that the quality of the spermatogenesis is not optimum. This interpretation supports the proposal that the study of only three chromosomes (21, X, and Y), and the analysis of a specific type of abnormality, would be sufficient to identify errors in the meiotic process and, therefore, to identify the majority of at-risk patients. In fact, the value of the qualitative interpretation compared with the quantitative approach is supported by several pieces of data. For example, it would be difficult to explain by means of a strictly quantitative analysis the clinical repercussions of chromosome abnormalities in spermatozoa on IVF/ intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles. Aneuploidies in these gametes have been associated with implantation errors (83, 84), recurrent miscarriages (33, 71), and also with chromosome anomalies in live births (85, 86).

Therefore, and with regard to the third objective, FISH analysis of spermatozoa should be used as a tool of genetic screening in infertile patients. Significant differences in the rates of chromosome abnormalities with respect to controls should be taken into consideration regardless of the numerical value. When abnormal results are obtained, individuals should be identified as "at risk" and the couple should be advised about the available techniques of preimplantation and prenatal genetic diagnosis.

*Acknowledgments:* The authors thank Fundació Puigvert, Institut Marquès, Institut Universitari Dexeus, Instituto Bernabeu, Instituto de Reproducción CEFER and Instituto Valenciano de Infertilidad, for providing the semen samples and the clinical information on the patients studied.

### REFERENCES

1. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001;2:280–91.
2. Egozcue J, Sarrate Z, Codina-Pascual M, Egozcue S, Oliver-Bonet M, Blanco J, et al. Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:337–42.
3. Martin RH. Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. *Reprod Toxicol* 2006;22:142–7.

4. Burrello N, Vicari E, Calogero AE. Chromosome abnormalities in spermatozoa of patients with azoospermia and normal somatic karyotype. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:363–5.
5. Machev N, Gosset P, Viville S. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:352–7.
6. Miharu N. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:347–51.
7. Rives NM. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: asthenozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:358–62.
8. Sarrate Z, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Egozcue J, Vidal F. FISH studies of chromosome abnormalities in germ cells and its relevance in reproductive counselling. *Asian J Androl* 2005;7:227–36.
9. Tempest HG, Griffin DK. The relationship between male infertility and increased levels of sperm disomy. *Cytogenet Genome Res* 2004;107:83–94.
10. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. New York: Cambridge University Press, 1992.
11. Evans EP, Breckon G, Ford CE. An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* 1964;15:289–94.
12. Vidal F, Moragas M, Catalá V, Torelló MJ, Santaló J, Calderón G, et al. Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. *Hum Reprod* 1993;8:1740–3.
13. Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1996;11:722–6.
14. Egozcue J, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Sarrate Z, Vidal F. Genetic analysis of sperm and implications of severe male infertility—a review. *Placenta* 2003;24:S62–5.
15. Burrello N, Arellano G, Vicari E, Asero P, Di Benedetto D, De Palma A, et al. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum Reprod* 2004;19:2298–302.
16. Bernardini LM, Calogero AE, Bottazzi C, Lanteri S, Venturini PL, Burrello N, et al. Low total normal motile count values are associated with increased sperm disomy and diploidy rates in infertile patients. *Int J Androl* 2005;28:328–36.
17. Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, et al. Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum Reprod* 2005;20:2140–52.
18. Faure AK, Aknin-Seifer I, Frérot G, Pellétier R, De Robertis C, Cans C, et al. Predictive factors for an increased risk of sperm aneuploidies in oligo-astheno-teratozoospermic males. *Int J Androl* 2007;30:153–62.
19. Durakbasi-Dursun HG, Zamani AG, Kutlu R, Görkemli H, Babec M, Acar A. A new approach to chromosomal abnormalities in sperm from patients with oligoastheno-teratozoospermia: detection of double aneuploidy in addition to single aneuploidy and diploidy by five-color fluorescence in situ hybridization using one probe set. *Fertil Steril* 2008;89:1709–17.
20. Finkelstein S, Mukamel E, Yavetz H, Puz G, Avivi L. Increased rate of nondisjunction in sex cells derived from low-quality semen. *Hum Genet* 1998;102:129–37.
21. McInnes B, Rademaker A, Greene CA, Ko E, Barclay L, Martin RH. Abnormalities for chromosomes 13 and 21 detected in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod* 1998;13:2787–90.
22. Nishikawa N, Murakami I, Ikata K, Suzumori K. Sex chromosomal analysis of spermatozoa from infertile men using fluorescence in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:97–102.
23. Ohashi Y, Miharu N, Honda H, Samura O, Ohama K. High frequency of XY disomy in spermatozoa of severe oligozoospermic men. *Hum Reprod* 2001;16:703–8.
24. Nagvenkar P, Zaveri K, Hinduja I. Comparison of the sperm aneuploidy rate in severe oligozoospermic and oligozoospermic men and its relation to intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 2005;84:925–31.
25. Rives N, Salm Clair A, Mazurier S, Sibert L, Simson N, Joly G, Mace B. Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet* 1999;105:266–72.
26. Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, et al. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 2000;15:351–65.
27. Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Romeo R, Rappazzo G, et al. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum Reprod* 2001;16:1172–9.
28. Martin RH, Rademaker AW, Greene C, Ko E, Hoang T, Barclay L, et al. A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. *Biol Reprod* 2003;69:535–9.
29. Hunt PA, Hassold TJ. Sex matters in meiosis. *Science* 2002;296:2181–3.
30. Colodel G, Capitani S, Baccetti B, Pammolli A, Moretti E. Sperm aneuploidies and low progressive motility. *Hum Reprod* 2007;22:1893–8.
31. Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, et al. Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril* 1999;72:696–701.
32. Hristova R, Ko E, Greene C, Rademaker A, Chernos J, Martin R. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with asthenoteratozoospermia. *Biol Reprod* 2002;66:1781–3.
33. Rubio C, Gil-Salom M, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Minguéz Y, et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001;16:2084–92.
34. Gole LA, Wong PF, Ng PL, Wang XQ, Ng SC, Bongso A. Does sperm morphology play a significant role in increased sex chromosomal disomy? A comparison between patients with teratozoospermia and OAT by FISH. *J Androl* 2001;22:759–63.
35. Hirköinen K, Suominen J, Lähdelehto J. Aneuploidy in spermatozoa of infertile men with teratozoospermia. *Int J Androl* 2001;24:197–205.
36. Templado C, Hoang T, Greene C, Rademaker A, Chernos J, Martin R. Aneuploid spermatozoa in infertile men: teratozoospermia. *Mol Reprod Dev* 2002;61:200–4.
37. Sun F, Ko E, Martin RH. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reprod Biol Endocrinol* 2006;4:1.
38. Strassburger D, Reichart M, Kaufman S, Kasterstein E, Komarovskiy D, Bern O, et al. Morphology assessment and fluorescence in situ hybridization of the same spermatozoon using a computerized cell-scanning system. *Hum Reprod* 2007;22:201–9.
39. Oliver-Bonet M, Benet J, Sun F, Navarro J, Abad C, Liehr T, et al. Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Hum Reprod* 2005;20:683–8.
40. Lejeune J. Autosomal disorders. *Pediatrics* 1963;32:326–37.
41. Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 2000;106:500–5.
42. Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod* 2004;19:1345–51.
43. Douet-Guilbert N, Bris MJ, Amice V, Marchetti C, Delobel B, Amice J, et al. Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature. *Int J Androl* 2005;28:372–9.
44. Machev N, Gosset P, Warter S, Treger M, Schillinger M, Viville S. Fluorescence in situ hybridization sperm analysis of six translocation carriers provides evidence of an interchromosomal effect. *Fertil Steril* 2005;84:365–73.
45. Kirkpatrick G, Ferguson KA, Gao H, Tang S, Chow V, Yuen BH, et al. A comparison of sperm aneuploidy rates between infertile men with normal and abnormal karyotypes. *Hum Reprod* 2008;23:1679–83.
46. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Honda N, Hara T, Ohama K. Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers.

- t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triple-color fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1999;105:428–36.
47. Rives N, Jarnot M, Mousset-Siméon N, Joly G, Macé B. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis of chromosome segregation and inter-chromosomal effect in spermatozoa of a reciprocal translocation t(9;10)(q11;p11.1) carrier. *J Hum Genet* 2003;48:535–40.
  48. Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J. Preferential alternate segregation in the common t(11;22)(q23;q11) reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers. *Reprod Biomed Online* 2004;9:637–44.
  49. Anton E, Vidal F, Blanco J. Reciprocal translocations: tracing their meiotic behaviour. *Genet Med* 2008;10:730–8.
  50. Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion inv(6p23q25) carrier using FISH on decondensed sperm nuclei. *Cytogenet Genome Res* 2002;97:149–54.
  51. Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J. Genetic reproductive risk in inversion carriers. *Fertil Steril* 2006;85:661–6.
  52. Boué J, Taillente JL, Hazael-Massieux P, Léonard C, Boué A. Association of pericentric inversion of chromosome 9 and reproductive failure in ten unrelated families. *Humangenetik* 1975;30:217–24.
  53. Teo SH, Tan M, Knight L, Yeo SH, Ng I. Pericentric inversion 9—incidence and clinical significance. *Ann Acad Med Singapore* 1995;24:302–4.
  54. Collodel G, Moretti E, Capitani S, Piomboni P, Anichini C, Estenoz M, et al. TEM, FISH and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia* 2006;38:122–7.
  55. Eiben B, Leipoldt M, Rammelsberg O, Krause W, Engel W. High incidence of minor chromosomal variants in teratozoospermic males. *Andrologia* 1987;19:684–7.
  56. Nakamura Y, Kitamura M, Nishimura K, Koga M, Kondoh N, Takeyama M, et al. Chromosomal variants among 1790 infertile men. *Int J Urol* 2001;8:49–52.
  57. Penna Videau S, Araujo H, Ballesta F, Ballescà JL, Vanrell JA. Chromosomal abnormalities and polymorphisms in infertile men. *Arch Androl* 2001;46:205–10.
  58. Yakin K, Balaban B, Urman B. Is there a possible correlation between chromosomal variants and spermatogenesis? *Int J Urol* 2005;12:984–9.
  59. Martin RH. Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2008;16:523–31.
  60. Blanco J, Egozcue J, Vidal F. 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. *Hum Reprod* 2001;16:887–92.
  61. Blanco J, Farreras A, Egozcue J, Vidal F. Meiotic behavior of the sex chromosomes in a 45,X/46,X,r(Y)/46,X,dic r(Y) patient whose semen was assessed by fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 2003;79:913–8.
  62. Buwe A, Guttenbach M, Schmid M. Effect of paternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:213–28.
  63. Rubes J, Vozdova M, Oravcova E, Perreault SD. Individual variation in the frequency of sperm aneuploidy in humans. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:229–36.
  64. Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Amheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9601–6.
  65. Plastira K, Angelopoulou R, Mantas D, Msaouel P, Lyrakou S, Plastiras A, et al. The effects of age on the incidence of aneuploidy rates in spermatozoa of oligoasthenozoospermic patients and its relationship with ICSI outcome. *Int J Androl* 2007;30:65–72.
  66. Guttenbach M, Martinez-Expósito MJ, Michelmann HW, Engel W, Schmid M. Incidence of diploid and disomic sperm nuclei in 45 infertile men. *Hum Reprod* 1997;12:468–73.
  67. Bernardini L, Borini A, Preti S, Conte N, Flamigni C, Capitatio GL, et al. Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. *Hum Reprod* 1998;13:3406–13.
  68. Asada H, Sueoka K, Hashiba T, Kuroshima M, Kobayashi N, Yoshimura Y. The effects of age and abnormal sperm count on the non-disjunction of spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:51–9.
  69. Moosani N, Pattinson HA, Carter MD, Cox DM, Rademaker AW, Martin RH. Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 1995;64:811–7.
  70. Carrell DT, Emery BR, Liu L. Characterization of aneuploidy rates, protamine levels, ultrastructure, and functional ability of round-headed sperm from two siblings and implications for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999;71:511–6.
  71. Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, et al. Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999;14:1266–73.
  72. Pfeffer J, Pang MG, Hoegerman SF, Osgood CJ, Stacey MW, Mayer J, et al. Aneuploidy frequencies in semen fractions from ten oligoasthenoteratozoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999;72:472–8.
  73. Martin RH, Greene C, Rademaker A, Barclay L, Ko E, Chernos J. Chromosome analysis of spermatozoa extracted from testes of men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000;15:1121–4.
  74. Ushijima C, Kumasako Y, Kihalle PE, Hirotsuru K, Usunomiya T. Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2000;15:1107–11.
  75. Carrell DT, Wilcox AL, Udoff LC, Thorp C, Campbell B. Chromosome 15 aneuploidy in the sperm and conceptus of a sibling with variable familial expression of round-headed sperm syndrome. *Fertil Steril* 2001;76:1258–60.
  76. Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J. Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001;76:479–84.
  77. Martin RH, Greene C, Rademaker AW. Sperm chromosome aneuploidy analysis in a man with globozoospermia. *Fertil Steril* 2003;79:1662–4.
  78. Tempest HG, Homa ST, Dalakouridou M, Christopikou D, Wright D, Zhai XP, et al. The association between male infertility and sperm disomy: evidence for variation in disomy levels among individuals and a correlation between particular semen parameters and disomy of specific chromosome pairs. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:82.
  79. Pang MG, Kim YJ, Lee SH, Kim CK. The high incidence of meiotic errors increases with decreased sperm count in severe male factor infertilities. *Hum Reprod* 2005;20:1688–94.
  80. Mebdi M, Smatti B, Saad A, Guerin JF, Benchaib M. Analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) of the relationship between gonosomic aneuploidy and the results of assisted reproduction in men with severe oligozoospermia. *Andrologia* 2006;38:137–41.
  81. Martin RH, Rademaker A. The frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements. *Cytogenet Cell Genet* 1990;53:103–7.
  82. Ferguson KA, Wong EC, Chow V, Nigro M, Ma S. Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum Mol Genet* 2007;16:2870–9.
  83. Burrello N, Vicari E, Shin P, Agarwal A, De Palma A, Graziano C, et al. Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes. *Hum Reprod* 2003;18:1371–6.
  84. Nicopoulos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Homa S, Nice L, Tempest H, et al. The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? *Hum Reprod* 2008;23:240–50.
  85. Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, et al. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 2002;17:2600–14.
  86. Devroey P, Van Steirteghem A. A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update* 2004;10:19–28.





**7.2. Informe del Servei d'Estadística de la Universitat Autònoma de Barcelona**





## Informe Estadístic

**Elaborat per a:** Zaida Sarrate, Joan Blanco, Francesca Vidal  
Unitat de Biologia Cel·lular  
Facultat de Biociències

**Disseny i anàlisi:** Oliver Valero  
Servei d'Estadística UAB  
Edifici D - Campus UAB  
Tel. 935 81 13 47  
08193 Cerdanyola del Vallès  
(Barcelona)

**Data:** Maig - Octubre de 2009

---

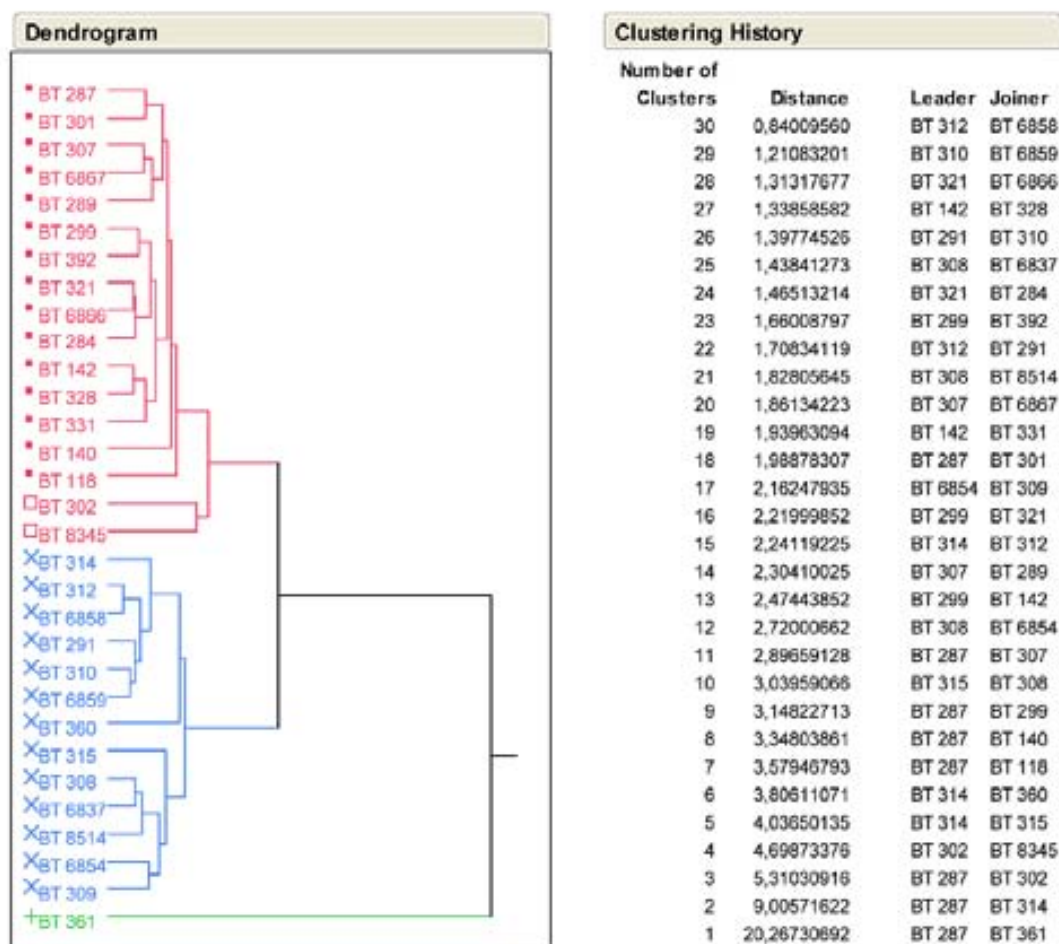
## Índex

<b>7.2.1 ANÀLISI DE CLÚSTERS</b>	<b>3</b>
<b>A. CONSIDERANT TOTS ELS INDIVIDUS</b>	<b>3</b>
<b>B. SENSE CONSIDERAR L'INDIVIDU 361</b>	<b>4</b>
<b>C. ANÀLISI MULTIVARIANT I CARACTERITZACIÓ DELS GRUPS</b>	<b>5</b>
<b>7.2.2 ANÀLISI DE QUIASMES</b>	<b>7</b>
<b>A. ANÀLISI SEGONS CLÚSTER</b>	<b>8</b>
- CONSIDERANT ELS INDIVIDUS AMB CARIOTIP NO AVALUAT	8
- SENSE CONSIDERAR ELS INDIVIDUS AMB CARIOTIP NO AVALUAT	9
<b>B. ANÀLISI SEGONS CARIOTIP</b>	<b>11</b>
<b>C. ANÀLISI SEGONS SEMINOGRAMA</b>	<b>13</b>
- CONSIDERANT ELS INDIVIDUS AMB CARIOTIP NO AVALUAT	13
- SENSE CONSIDERAR ELS INDIVIDUS AMB CARIOTIP NO AVALUAT	14
<b>D. ANÀLISI D'INTEGRACIÓ DE VARIABLES</b>	<b>16</b>
- CONSIDERANT NOMÉS ELS INDIVIDUS DEL GRUP 1	16
- CONSIDERANT NOMÉS ELS INDIVIDUS DEL GRUP 2	17
<b>7.2.3 ANÀLISI DE PROXIMITAT</b>	<b>19</b>
<b>A. TOTS ELS BIVALENTS</b>	<b>19</b>
<b>B. BIVALENTS AGRUPATS</b>	<b>22</b>
<b>C. ANÀLISI MULTIVARIANT</b>	<b>24</b>

## 7.2.1 Anàlisi de clústers

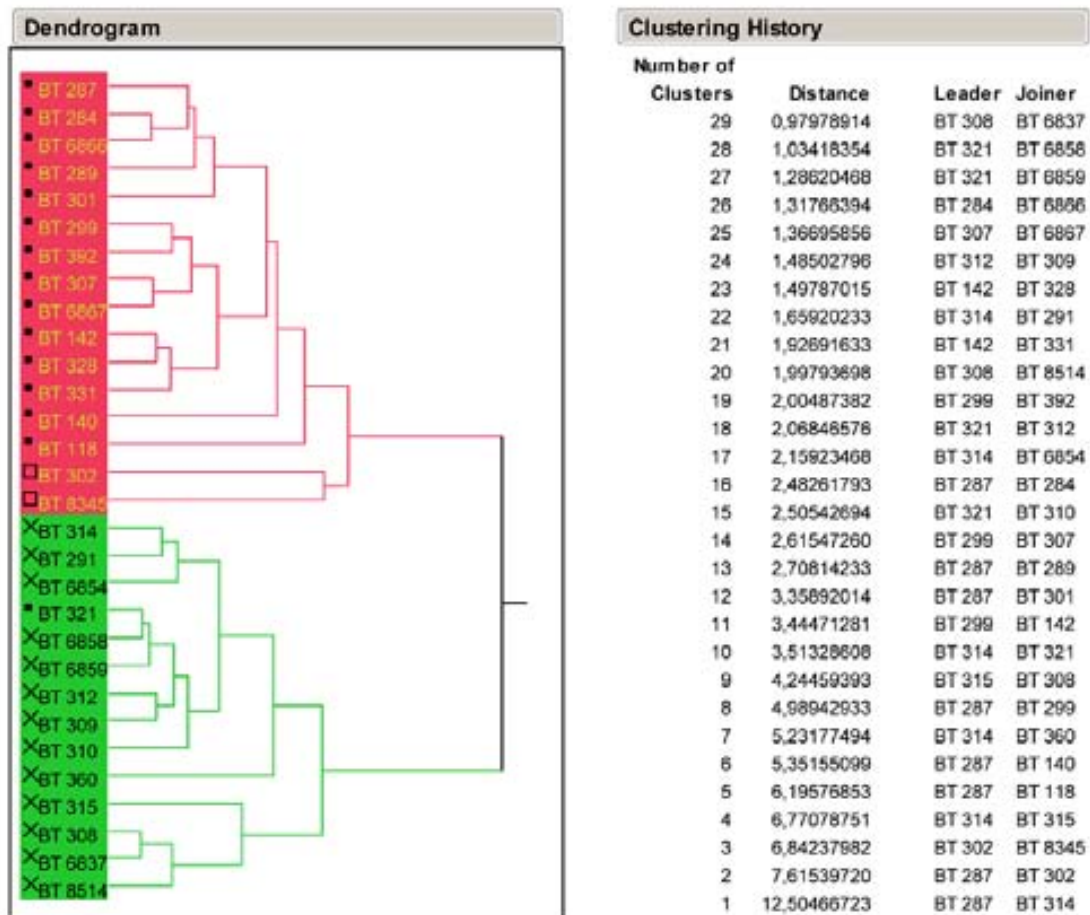
### A. Considerant tots els individus

Per tal d'identificar grups d'individus similars s'ha realitzat un anàlisi de clústers.



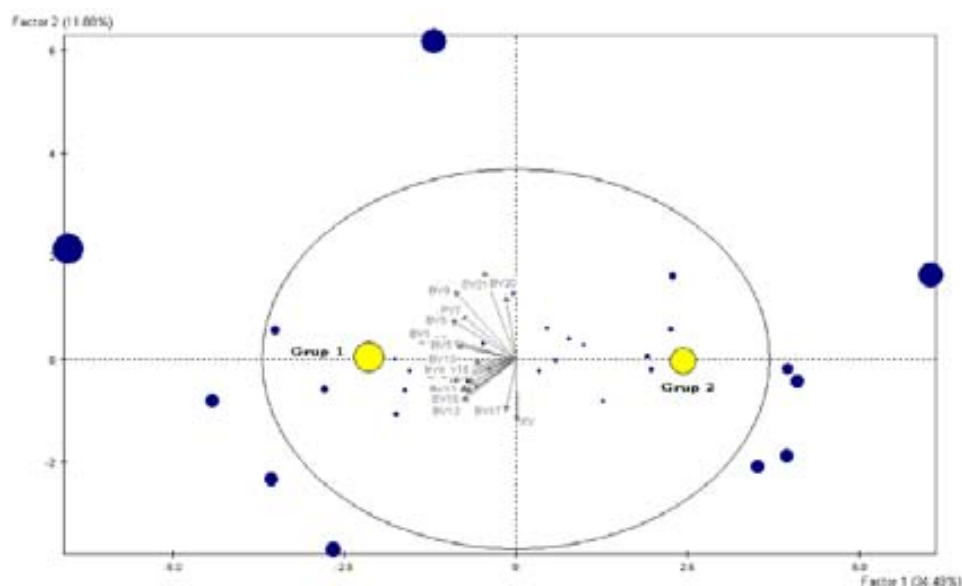
L'individu BT 361 presenta unes característiques molt diferents de la resta, per això s'ha agrupat en l'últim nivell del dendrograma. Analitzant aquest registre s'observa que pren valor 0 per a la majoria de variables, per aquest motiu es decideix eliminar-lo.

## B. Sense considerar l'individu 361



## C. Anàlisi multivariant i caracterització dels grups

El següent gràfic resumeix tota la informació en dos eixos factorials:



Caracterització dels grups:

### Grup 1 (n=16)

Variables	Mitjana grup	Mitjana global	Desviació grup	Desviació global	T-test	p-valor
BV1	3,775	3,460	0,263	0,410	4,43	0,000
BV3	3,244	3,030	0,232	0,312	3,94	0,000
BV2	3,525	3,253	0,334	0,436	3,58	0,000
BV9	2,481	2,327	0,219	0,249	3,58	0,000
BV12	2,613	2,450	0,234	0,269	3,47	0,000
BV13	2,156	2,063	0,141	0,158	3,38	0,000
BV6	2,756	2,577	0,242	0,327	3,16	0,001
BV8	2,456	2,330	0,247	0,251	2,90	0,002
BV4	2,906	2,760	0,259	0,296	2,84	0,002
BV15	2,169	2,060	0,257	0,227	2,75	0,003
BV5	2,881	2,750	0,213	0,285	2,65	0,004
BV10	2,506	2,370	0,290	0,315	2,49	0,006
BV18	2,044	1,950	0,226	0,223	2,42	0,008
BV7	2,575	2,440	0,273	0,324	2,40	0,008

## Grup 2 (n=14)

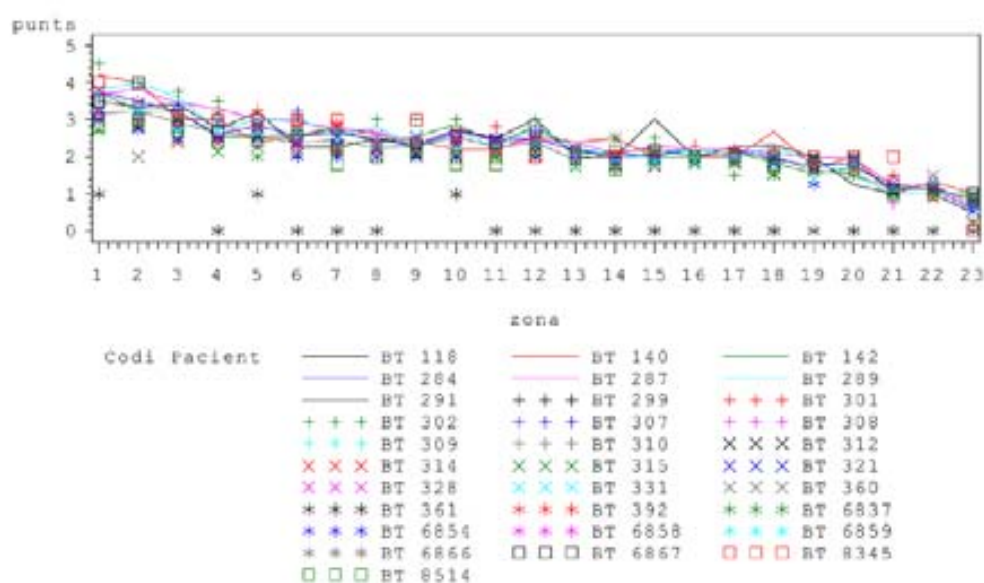
Variables	Mitjana grup	Mitjana global	Desviació grup	Desviació global	T-test	p-valor
BV7	2,286	2,440	0,309	0,324	-2,40	0,008
BV18	1,843	1,950	0,164	0,223	-2,42	0,008
BV10	2,214	2,370	0,267	0,315	-2,49	0,006
BV5	2,600	2,750	0,283	0,285	-2,65	0,004
BV15	1,936	2,060	0,081	0,227	-2,75	0,003
BV4	2,593	2,760	0,243	0,296	-2,84	0,002
BV8	2,186	2,330	0,160	0,251	-2,90	0,002
BV6	2,371	2,577	0,289	0,327	-3,16	0,001
BV13	1,957	2,063	0,098	0,158	-3,38	0,000
BV12	2,264	2,450	0,167	0,269	-3,47	0,000
BV9	2,150	2,327	0,140	0,249	-3,58	0,000
BV2	2,943	3,253	0,316	0,436	-3,58	0,000
BV3	2,786	3,030	0,188	0,312	-3,94	0,000
BV1	3,100	3,460	0,193	0,410	-4,43	0,000



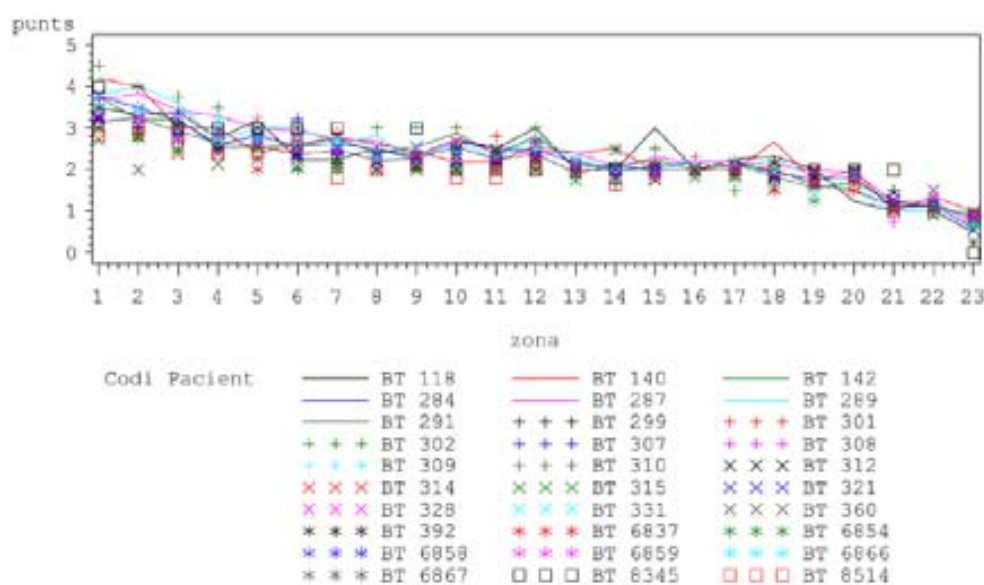
## 7.2.2 Anàlisi de quiasmes

S'ha analitzat el recompte de quiasmes tenint en compte les mesures repetides de les diferents cèl·lules en els 23 bivalents.

El següent gràfic representa les mitjanes de quiasmes observades en cada bivalent per individu:



Si s'exclou l'individu BT 361 de l'anàlisi:



## A. Anàlisi segons clúster

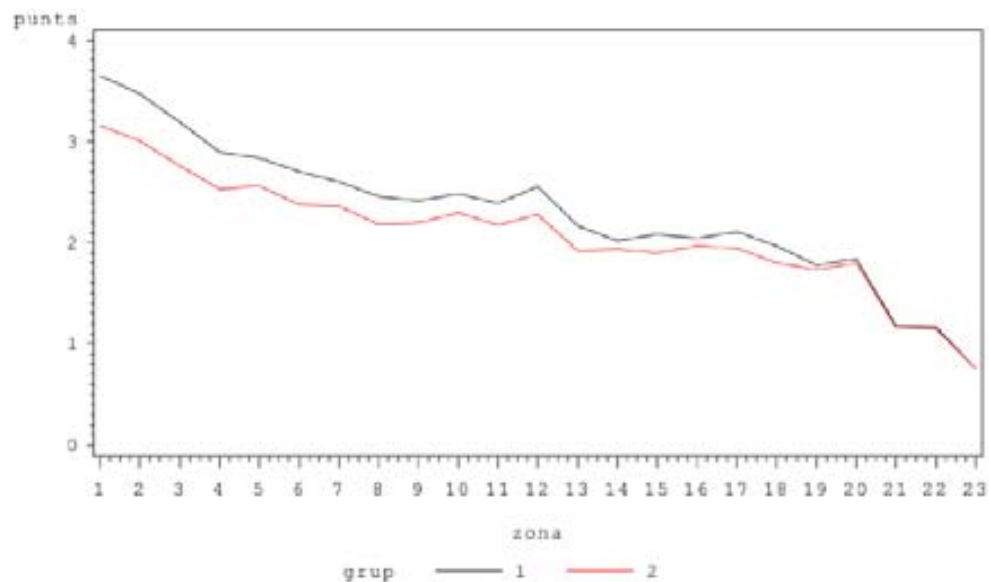
S'ha analitzat la variable nombre de quiasmes considerant la variable explicativa:

→ Grups definits en l'anàlisi de clústers (dues categories: Grup 1 (A) i Grup 2 (B)).

S'han considerat les mesures repetides de les diferents cèl·lules en els 23 bivalents.

Donada la naturalesa de la variable resposta (un comptatge) s'han establert models de regressió de Poisson. S'ha corregit el problema de la baixa variabilitat en la variable resposta (*under dispersion*).

### - Considerant els individus amb cariotip no avaluat



Es detecten diferències significatives segons grup:

Type III Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
grup	1	7896	102.61	<.0001
zona	22	7896	559.69	<.0001

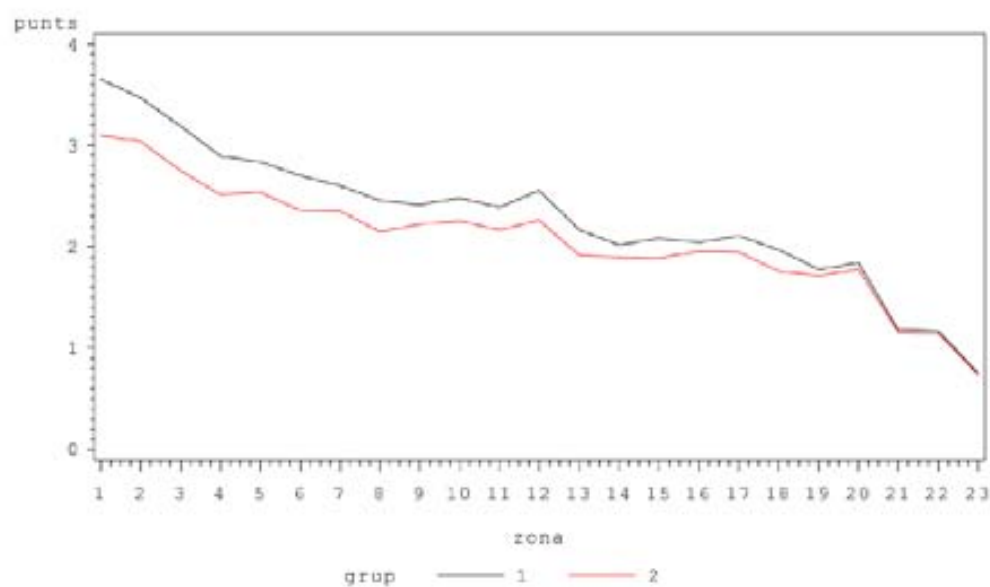
Servei d'Estadística UAB

sem Least Squares Means							
grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Mean	Standard Error Mean
1	0.7792	0.006666	7896	116.88	<.0001	2.1796	0.01453
2	0.6820	0.006981	7896	97.69	<.0001	1.9778	0.01381

Differences of sem Least Squares Means							
grup	grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	RR
1	2	0.09716	0.009591	7896	10.13	<.0001	1,10203

El valor esperat de recompte de quiasmes per cèl·lula (pels 23 bivalents) és de 50.1 pel grup A i de 45.5 pel grup B.

#### - Sense considerar els individus amb cariotip no avaluat



Es detecten diferències significatives segons grup:

Type III Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
grup	1	7053	77.73	<.0001
zona	22	7053	488.04	<.0001

sem Least Squares Means							
grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Mean	Standard Error Mean
1	0.7778	0.007712	7053	100.85	<.0001	2.1787	0.01679
2	0.6730	0.009126	7053	73.74	<.0001	1.9600	0.01789

Differences of sem Least Squares Means							
grup	grup	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	RR
1	2	0.1048	0.01189	7053	8.82	<.0001	1,11056

El valor esperat de recompte de quiasmes per cèl·lula (pels 23 bivalents) és de 50.1 pel grup A i de 45.1 pel grup B.

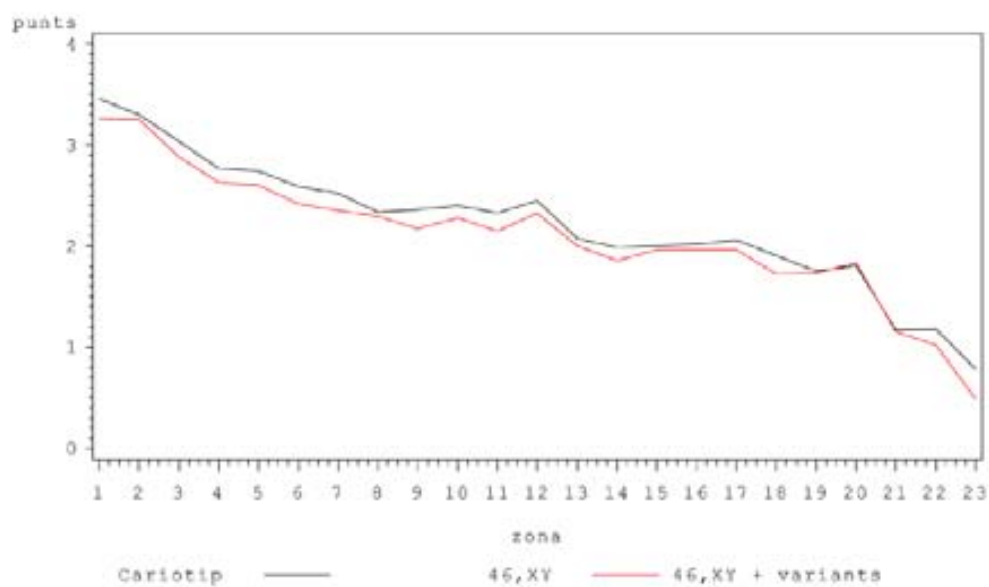
## B. Anàlisi segons CARIOTIP

S'ha analitzat la variable nombre de quiasmes considerant la variable explicativa:

→ CARIOTIP (s'ha recodificat en dues categories: 46-XY (46,XY), 46-XY+variants (46,XYpolimorfismes)).

S'han considerat les mesures repetides de les diferents cèl·lules en els 23 bivalents.

Donada la naturalesa de la variable resposta (un comptatge) s'han establert models de regressió de Poisson. S'ha corregit el problema de la baixa variabilitat en la variable resposta (*under dispersion*).



Es detecten diferències significatives segons CARIOTIP:

Type III Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
car	1	7053	14.92	0.0001
zona	22	7053	487.58	<.0001

car Least Squares Means							
car	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Mean	Standard Error Mean
46,XY	0.7442	0.008941	7053	107.22	<.0001	2.1048	0.01461
46,XY+variants	0.6766	0.01612	7053	41.97	<.0001	1.9672	0.03171

Differences of car Least Squares Means							
car	car	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	RR
46,XY	46,XY+variants	0.06763	0.01751	7053	3.86	0.0001	1.06995

El valor esperat de recompte de quiasmes per cèl·lula (pels 23 bivalents) és de 48.4 pels cariotips 46,XY i de 45.2 pels cariotips 46,XY (polimorfisme).

## C. Anàlisi segons SEMINOGRAMA

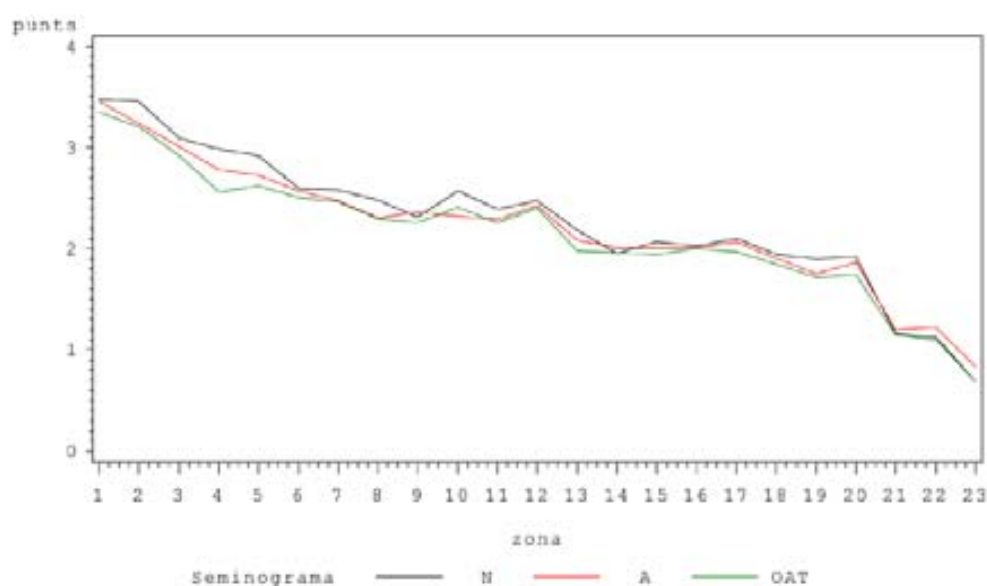
S'ha analitzat la variable nombre de quiasmes considerant la variable explicativa:

→ SEMINOGRAMA (s'ha recodificat en tres categories: N (Normal), A (Anormal no OAT) i OAT (Anormal OAT)).

S'han considerat les mesures repetides de les diferents cèl·lules en els 23 bivalents.

Donada la naturalesa de la variable resposta (un comptatge) s'han establert models de regressió de Poisson. S'ha corregit el problema de la baixa variabilitat en la variable resposta (*under dispersion*).

### - Considerant els individus amb cariotip no avaluat



Es detecten diferències significatives segons SEMINOGRAMA:

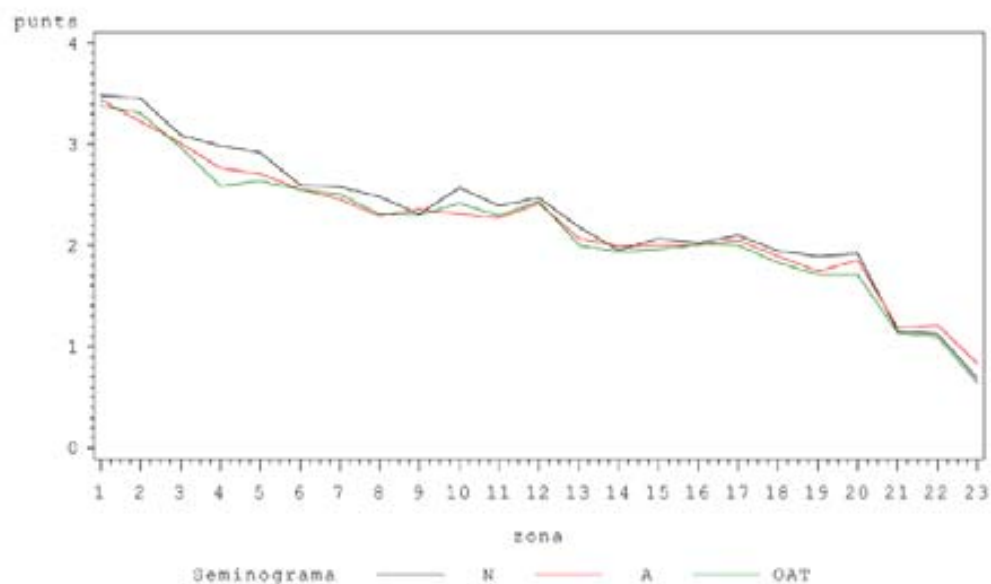
Type III Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
sem	2	7896	9.50	<.0001
zona	22	7896	558.85	<.0001

sem Least Squares Means							
sem	Estimato	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Mean	Standard Error Mean
A	0.7422	0.007958	7896	93.26	<.0001	2.1005	0.01672
N	0.7734	0.01393	7896	55.52	<.0001	2.1671	0.03019
OAT	0.7085	0.008087	7896	87.62	<.0001	2.0310	0.01642

Differences of sem Least Squares Means							
sem	sem	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Adj P	RR
A	N	-0.03118	0.01600	7896	-1.95	0.1254	0.96927
A	OAT	0.03365	0.01130	7896	2.98	0.0082	1.03422
N	OAT	0.06483	0.01606	7896	4.04	0.0002	1.06701

El valor esperat de recompte de quiasmes per cèl·lula (pels 23 bivalents) és de 49.8 pel seminograma normal, 48.3 pel seminograma anormal no OAT i 46.7 pel seminograma anormal OAT.

#### - Sense considerar els individus amb cariotip no avaluat



Es detecten diferències significatives segons SEMINOGRAMA:



Type III Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
sem	2	7053	4.46	0.0116
zona	22	7053	487.33	<.0001

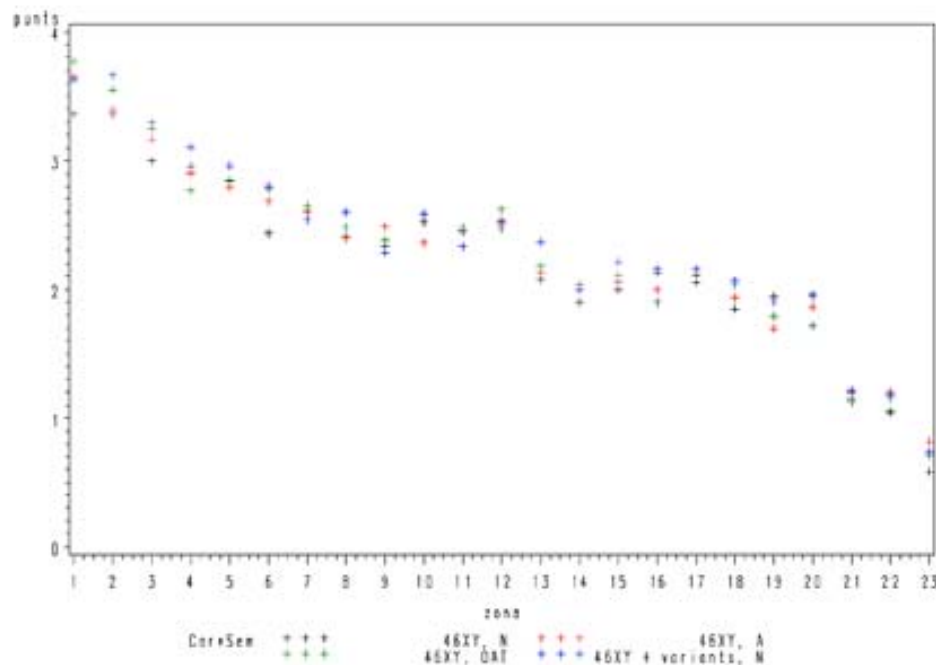
sem Least Squares Means							
sem	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Mean	Standard Error Mean
A	0.7351	0.009158	7053	80.27	<.0001	2.0856	0.01910
N	0.7720	0.01602	7053	48.19	<.0001	2.1641	0.03467
OAT	0.7146	0.01078	7053	66.26	<.0001	2.0433	0.02204

Differences of sem Least Squares Means							
sem	sem	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Adj P	RR
A	N	-0.03694	0.01841	7053	-2.01	0.1108	0.96373
A	OAT	0.02049	0.01410	7053	1.45	0.3138	1.02070
N	OAT	0.05743	0.01927	7053	2.98	0.0081	1.05912

El valor esperat de recompte de quiasmes per cèl·lula (pels 23 bivalents) és de 49.8 pel seminograma normal, 48.0 pel seminograma anormal no OAT i 47.0 pel seminograma anormal OAT.

## D. Anàlisi d'integració de variables

### - Considerant només els individus del grup 1



En el grup 1 les diferències entre cariotip i seminograma són significatives. Observem que no hi ha cap individu amb cariotip 46XY+variants i seminograma anormal no OAT o OAT.

Type III Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
car*sem	3	4078	3.81	0.0096
zona	22	4078	355.73	<.0001

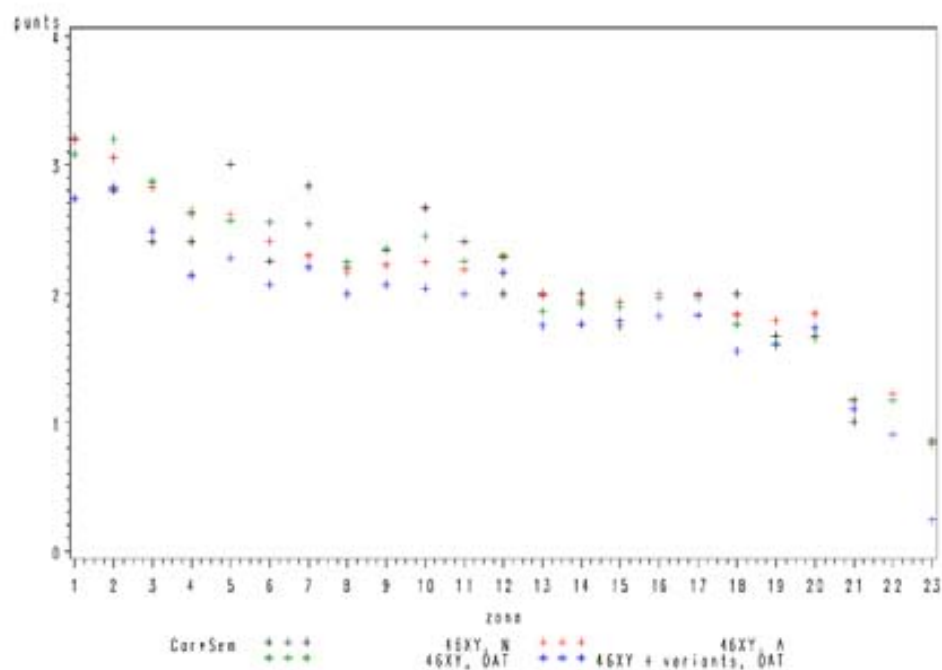
car*sem Least Squares Means							
car* sem	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Mean	Standard Error Mean
46XY + variants, N	0.8015	0.01323	4078	60.56	<.0001	2.2288	0.02950
46XY, A	0.7668	0.007105	4078	107.92	<.0001	2.1529	0.01530
46XY, N	0.7453	0.01393	4078	53.51	<.0001	2.1071	0.02935
46XY, OAT	0.7852	0.008434	4078	93.09	<.0001	2.1928	0.01849

Differences of g Least Squares Means							
Car*Sem	Car*Sem	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Adj P	RR
46XY + variants, N	46XY, A	0.03466	0.01493	4078	2.32	0.0933	1.03525
46XY + variants, N	46XY, N	0.05615	0.01913	4078	2.94	<b>0.0176</b>	1.05776
46XY + variants, N	46XY, OAT	0.01630	0.01560	4078	1.05	0.7228	1.01642
46XY, A	46XY, N	0.02149	0.01555	4078	1.38	0.5107	1.02174
46XY, A	46XY, OAT	-0.01836	0.01092	4078	-1.68	0.3340	0.98180
46XY, N	46XY, OAT	-0.03985	0.01620	4078	-2.46	0.0664	0.96092

Nombre esperat pels 23 bivalents:

car	sem	Estimate
46XY + variants	N	51.2624
46XY	A	49.5167
46XY	N	48.4633
46XY	OAT	50.4344

## - Considerant només els individus del grup 2



En el grup 2 les diferències entre cariotip i seminograma són significatives. Observem que no hi ha cap individu amb cariotip 46XY+variants i seminograma normal.

Type III Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
car*sem	3	2953	7.40	<.0001
zona	22	2953	149.80	<.0001

car*sem Least Squares Means							
car* sem	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Mean	Standard Error Mean
46XY + variants, OAT	0.5600	0.02752	2953	20.35	<.0001	1.7506	0.04818
46XY, A	0.7028	0.01622	2953	43.34	<.0001	2.0195	0.03275
46XY, N	0.7082	0.06169	2953	11.48	<.0001	2.0304	0.1253
46XY, OAT	0.7073	0.02670	2953	26.49	<.0001	2.0285	0.05416

Differences of g Least Squares Means							
Car*Sem	Car*Sem	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Adj P	RR
46XY + variants, OAT	46XY, A	-0.1428	0.03191	2953	-4.48	<.0001	0.86685
46XY + variants, OAT	46XY, N	-0.1483	0.06754	2953	-2.20	0.1247	0.86219
46XY + variants, OAT	46XY, OAT	-0.1473	0.03830	2953	-3.85	0.0007	0.86300
46XY, A	46XY, N	-0.00541	0.06376	2953	-0.08	0.9998	0.99463
46XY, A	46XY, OAT	-0.00449	0.03118	2953	-0.14	0.9989	0.99556
46XY, N	46XY, OAT	0.000918	0.06719	2953	0.01	1.0000	1.00094

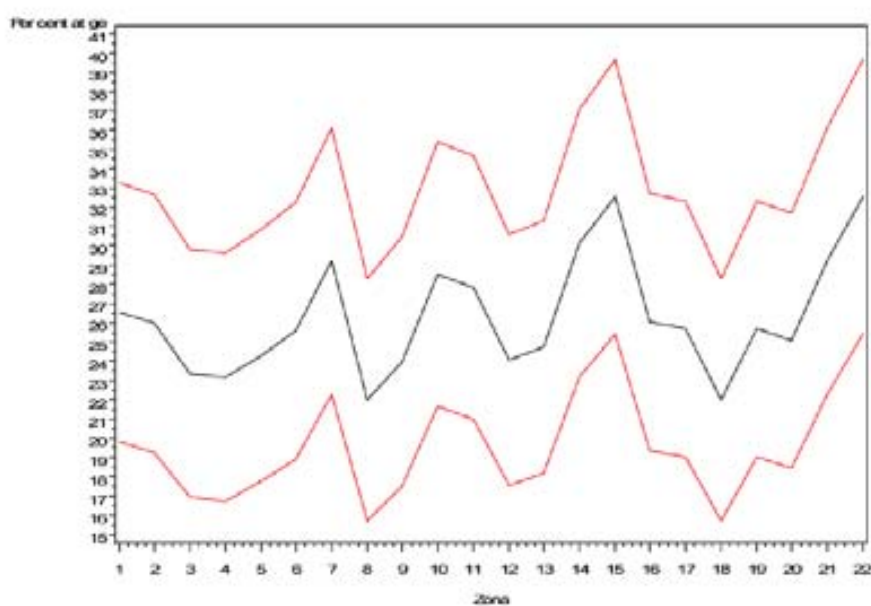
Nombre esperat pels 23 bivalents:

car	sem	Estimate
46XY + variants	OAT	40.2638
46XY	A	46.4485
46XY	N	46.6992
46XY	OAT	46.6555

## 7.2.3 Anàlisi de proximitat

### A. Tots els bivalents

Per a cada bivalent s'ha calculat el percentatge de bivalents pròxims amb un interval de confiança del 99% (no es tenen en compte les mesures repetides).



Zona	Lower 99% CL	Mean	Upper 99% CL
8	0.16	0.22	0.28
18	0.16	0.22	0.28
4	0.17	0.23	0.30
3	0.17	0.23	0.30
9	0.17	0.24	0.30
12	0.18	0.24	0.31
5	0.18	0.24	0.31
13	0.18	0.25	0.31
20	0.18	0.25	0.32
6	0.19	0.26	0.32
17	0.19	0.26	0.32
19	0.19	0.26	0.32
2	0.19	0.26	0.33

Zona	Lower 99% CL	Mean	Upper 99% CL
16	0.19	0.26	0.33
1	0.20	0.27	0.33
11	0.21	0.28	0.35
10	0.22	0.29	0.35
7	0.22	0.29	0.36
21	0.22	0.29	0.36
14	0.23	0.30	0.37
15	0.25	0.33	0.40
22	0.25	0.33	0.40

Per tenir en compte les mesures repetides s'ha fet servir un model de regressió logística amb mesures repetides. S'ha considerat la variable indicadora de proximitat com a variable resposta i la zona com a variable explicativa.

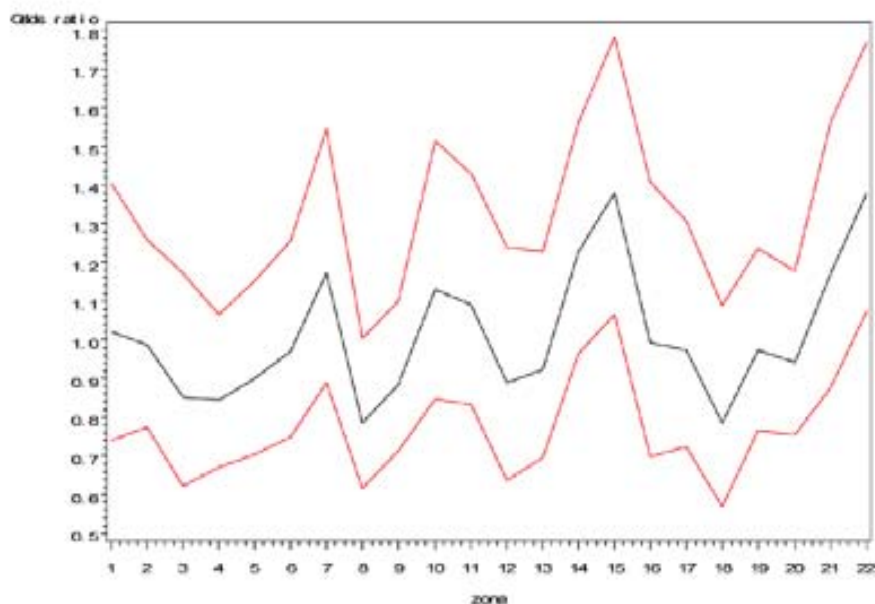
Response Profile		
Ordered Value	proxim	Total Frequency
1	Si	1683
2	No	4720

Globalment no s'han detectat diferències significatives entre bivalents (p-valor=0.4253).

Score Statistics For Type 3 GEE Analysis			
Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
zona	21	21.56	0.4253

Per comparar els diferents bivalents entre ells s'han calculat els *odds ratio*, que representen el risc que té un bivalent de ser proper respecte dels altres.

El següent gràfic mostra els *odds ratio* per a cada bivalent:



Label	Estimate	Lower Confidence Limit	Upper Confidence Limit	Pr > ChiSq
zona 8	0.7865	0.6162	1.0038	0.0536
zona 18	0.7865	0.5687	1.0875	0.1463
zona 4	0.8448	0.6698	1.0657	0.1547
zona 3	0.8538	0.6212	1.1734	0.3298
zona 9	0.8840	0.7115	1.0983	0.2656
zona 12	0.8884	0.6364	1.2403	0.4871
zona 5	0.9015	0.7049	1.1529	0.4086
zona 13	0.9238	0.6953	1.2273	0.5844
zona 20	0.9417	0.7538	1.1765	0.5970
zona 6	0.9692	0.7479	1.2561	0.8133
zona 17	0.9732	0.7240	1.3082	0.8571
zona 19	0.9732	0.7651	1.2378	0.8247
zona 2	0.9880	0.7750	1.2597	0.9226
zona 16	0.9916	0.6964	1.4079	0.9622
zona 1	1.0206	0.7410	1.4058	0.9006
zona 11	1.0920	0.8335	1.4307	0.5229
zona 10	1.1316	0.8463	1.5131	0.4043
zona 21	1.1720	0.8771	1.5659	0.2831

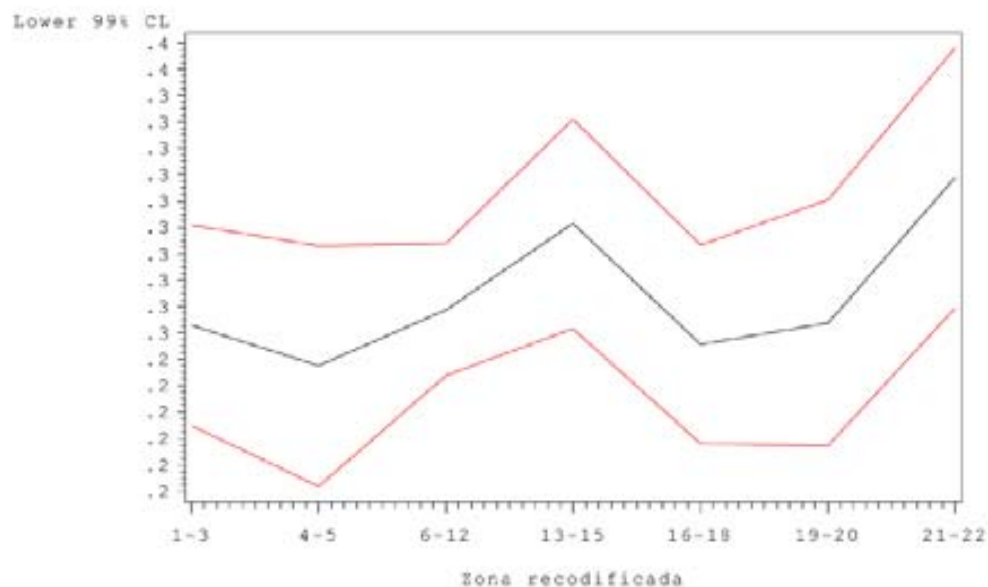
Label	Estimate	Lower Confidence Limit	Upper Confidence Limit	Pr > ChiSq
zona 7	1.1720	0.8890	1.5450	0.2604
zona 14	1.2275	0.9638	1.5633	0.0967
<b>zona 22</b>	<b>1.3795</b>	<b>1.0753</b>	<b>1.7698</b>	<b>0.0114</b>
<b>zona 15</b>	<b>1.3795</b>	<b>1.0664</b>	<b>1.7845</b>	<b>0.0143</b>

## B. Bivalents agrupats

S'ha considerat la següent recodificació de la variable bivalent:

Zona recodificada				
zonaR2	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
1-3	879	13.64	879	13.64
4-5	586	9.09	1465	22.73
6-12	2051	31.82	3516	54.55
13-15	879	13.64	4395	68.18
16-18	879	13.64	5274	81.82
19-20	586	9.09	5860	90.91
21-22	586	9.09	6446	100.00

Per a cada grup de bivalents s'ha calculat el percentatge de bivalents pròxims amb un interval de confiança del 99% (no es tenen en compte les mesures repetides).





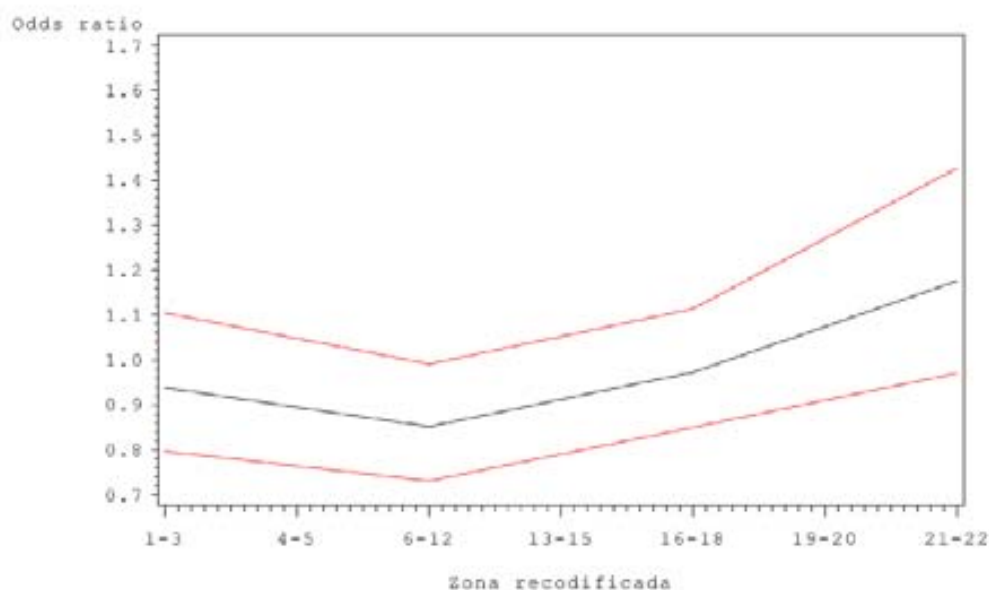
Zona recodificada	Lower 99% CL	Mean	Upper 99% CL
1-3	0.21	0.25	0.29
4-5	0.19	0.24	0.28
6-12	0.23	0.26	0.28
13-15	0.25	0.29	0.33
16-18	0.21	0.25	0.28
19-20	0.21	0.25	0.30
21-22	0.26	0.31	0.36

En el model considerant mesures repetides, globalment no s'han detectat diferències significatives entre bivalents ( $p$ -valor=0.5352).

Score Statistics For Type 3 GEE Analysis			
Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
zonaR2	6	5.07	0.5352

Per comparar els diferents bivalents entre ells s'han calculat els *odds ratio*, que representen el risc que té un bivalent de ser proper respecte dels altres.

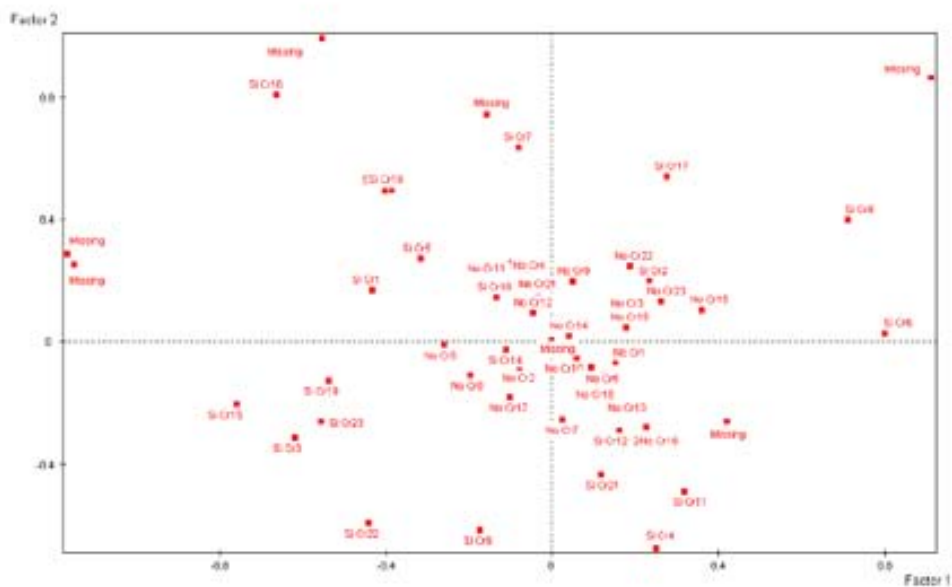
El següent gràfic mostra els *odds ratio* per a cada bivalent:



Label	Estimate	Lower Confidence Limit	Upper Confidence Limit	Pr > ChiSq
zona 1-3	0.9377	0.0785	0.7959	0.4422
zona 4-5	<b>0.8511</b>	<b>0.0662</b>	<b>0.7307</b>	<b>0.0381</b>
zona 6-12	0.9724	0.0672	0.8492	0.6854
zona 13-15	1.1766	0.1155	0.9707	0.0975
zona 16-18	0.8964	0.0971	0.7249	0.3128
zona 19-20	0.9431	0.0859	0.7889	0.5202
zona 21-22	<b>1.2955</b>	<b>0.1548</b>	<b>1.0250</b>	<b>0.0303</b>

### C. Anàlisi multivariant

Per tal d'analitzar si hi ha patrons de proximitat dels diferents grups de bivalents al bivalent sexual característics d'individu, s'ha realitzat un anàlisi de correspondències múltiples considerant cadascun dels grups de bivalents com a variables (sense tenir en compte les mesures repetides).



Caracterització dels grups:

**Grup 1 (N=80, 27,30%)**

Variables	Modalitats	% de la modalitat dins la classe	% de la modalitat (total)	% de la classe dins la modalitat	Pes
CR.4	Si	71,25	22,87	85,07	67
CR.13	No	95,00	74,74	34,70	219
CR.16	No	92,50	73,72	34,26	216
CR.11	Si	46,25	27,65	45,68	81
CR.12	Si	41,25	23,89	47,14	70
<b>CR.21</b>	Si	42,50	29,01	40,00	85
CR.1	No	85,00	72,70	31,92	213
CR.18	No	88,75	77,47	31,28	227

**Grup 2 (N=122, 41,64%)**

Variables	Modalitats	% de la modalitat dins la classe	% de la modalitat (total)	% de la classe dins la modalitat	Pes
CR.4	No	94,26	75,77	51,80	222
CR.8	Si	38,52	21,84	73,44	64
CR.6	Si	42,62	25,26	70,27	74
CR.22	No	81,97	67,24	50,76	197
CR.18	No	89,34	77,47	48,02	227
CR.16	No	86,07	73,72	48,61	216
CR.15	No	80,33	67,24	49,75	197
CR.12	No	86,89	75,43	47,96	221
CR.21	No	81,15	70,31	48,06	206
CR.5	No	85,25	75,43	47,06	221

**Grup 3 (N=91, 31,06%)**

Variables	Modalitats	% de la modalitat dins la classe	% de la modalitat (total)	% de la classe dins la modalitat	Pes
CR.16	Si	59,34	25,94	71,05	76
CR.18	Si	47,25	21,84	67,19	64
<b>CR.13</b>	Si	49,45	24,57	62,50	72
CR.4	No	92,31	75,77	37,84	222
CR.22	Si	51,65	32,42	49,47	95
<b>CR.15</b>	Si	50,55	32,42	48,42	95
CR.8	No	92,31	77,47	37,00	227
CR.6	No	89,01	73,38	37,67	215
CR.11	No	81,32	71,67	35,24	210

Individus per grup:

**Grup 1**

		Freqüència	Percentatge
Vàlids	BT 140	2	2,5
	BT 142	4	5,0
	BT 284	2	2,5
	BT 287	3	3,8
	BT 289	2	2,5
	BT 291	3	3,8
	BT 302	1	1,3
	BT 307	2	2,5
	BT 308	2	2,5
	BT 309	3	3,8
	BT 310	2	2,5
	BT 312	14	17,5
	BT 314	1	1,3
	BT 321	3	3,8
	BT 328	8	10,0
	BT 331	3	3,8
	BT 360	1	1,3
	BT 392	3	3,8
	BT 6854	1	1,3
	BT 6858	8	10,0
	BT 6859	8	10,0
	BT 6866	1	1,3
	BT 6867	2	2,5
	BT 8514	1	1,3
	Total	80	100,0

Servei d'Estadística UAB

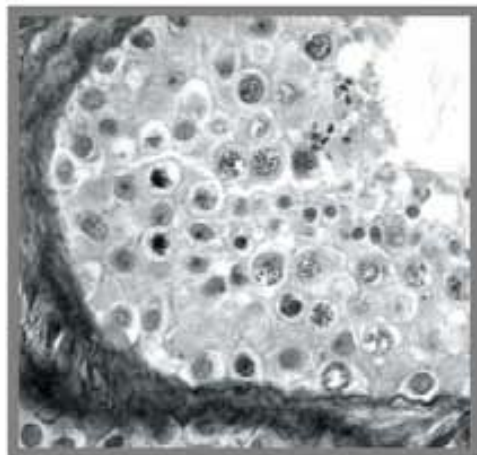
## Grup 2

	Frequència	Percentatge
Vàlids		
BT 140	1	,8
BT 142	3	2,5
BT 284	6	4,9
BT 287	3	2,5
BT 289	4	3,3
BT 291	4	3,3
BT 299	4	3,3
BT 301	2	1,6
BT 302	1	,8
BT 307	5	4,1
BT 308	1	,8
BT 309	1	,8
BT 310	6	4,9
BT 312	18	14,8
BT 314	3	2,5
BT 315	7	5,7
BT 321	3	2,5
BT 328	8	6,6
BT 331	6	4,9
BT 360	1	,8
BT 392	4	3,3
BT 6854	1	,8
BT 6858	11	9,0
BT 6859	10	8,2
BT 6866	3	2,5
BT 6867	3	2,5
BT 8514	3	2,5
Total	122	100,0

## Grup 3

		Freqüència	Percentatge
Vàlids	BT 118	2	2,2
	BT 140	1	1,1
	BT 142	1	1,1
	BT 284	1	1,1
	BT 287	4	4,4
	BT 291	5	5,5
	BT 299	2	2,2
	BT 301	1	1,1
	BT 307	3	3,3
	BT 308	1	1,1
	BT 310	3	3,3
	BT 312	12	13,2
	BT 314	2	2,2
	BT 315	3	3,3
	BT 321	4	4,4
	BT 328	10	11,0
	BT 331	10	11,0
	BT 392	3	3,3
	BT 6837	3	3,3
	BT 6858	9	9,9
	BT 6859	5	5,5
	BT 6866	3	3,3
	BT 6867	1	1,1
	BT 8514	2	2,2
	Total	91	100,0

## 8. Bibliografia







**A**

- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2002) Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion inv6p23q25 carrier using FISH on decondensed sperm nuclei. *Cytogenet Genome Res* 97, 149-154.
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2004a) Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod* 19, 1345-1351.
- Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J (2004b) Preferential alternate segregation in the common t(11;22)(q23;q11) reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers. *Reprod Biomed Online* 9, 637-644.
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2005) Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 111, 297-304.
- Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J (2006) Genetic reproductive risk in inversion carriers. *Fertil Steril* 85, 661-666.
- Anton E (2008a) Reorganitzacions cromosòmiques: segregació, efecte intercromosòmic i risc reproductiu. Universitat Autònoma de Barcelona. Tesi doctoral en xarxa accessible a: <http://www.tdcat.cesca.es/>.
- Anton E, Vidal F, Blanco J (2008b) Reciprocal translocations: tracing their meiotic behaviour. *Genet Med* 10, 730-738.
- Anton E, Blanco F, Vidal F (2010) Meiotic behavior of three D;G Robertsonian translocations: segregation and interchromosomal effect. *Journal of Human genetics* (en premsa).
- Arán B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, Egozcue J, Veiga A (1999) Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril* 72, 696-701.
- Arnheim N, Calabrese P, Tiemann-Boege I (2007) Mammalian meiotic recombination hot spots. *Annu Rev Genet* 41, 369-399.
- Asada H, Sueoka K, Hashiba T, Kuroshima M, Kobayashi N, Yoshimura Y (2000) The effects of age and abnormal sperm count on the nondisjunction of spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 17, 51-59.

**B**

- Baarends WM, Wassenaar E, van der Laan R, Hoogerbrugge J, Sleddens-Linkels E, Hoeijmakers JH, de Boer P, Grootegoed JA (2005) Silencing of unpaired chromatin and histone H2A ubiquitination in mammalian meiosis. *Mol Cell Biol* 25, 1041-1053.
- Barlow AL, Hultén MA Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human spermatocytes (1996) *Chromosome Res* 4, 562-573.
- Bernardini L, Borini A, Preti S, Conte N, Flamigni C, Capitanio GL, Venturini PL (1998) Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. *Hum Reprod* 13, 3406-3413.
- Bernardini LM, Calogero AE, Bottazzi C, Lanteri S, Venturini PL, Burrello N, De Palma A, Conte N, Ragni N (2005) Low total normal motile count values are associated with increased sperm disomy and diploidy rates in infertile patients. *Int J Androl* 28, 328-336.
- Binz SK, Sheehan AM, Wold MS (2004) Replication protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 3, 1015-1024.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F (1996) Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 11, 722-726.
- Blanco J, Rubio C, Simon C, Egozcue J, Vidal F (1997) Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XYY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Hum Genet* 99, 413-416.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2000) Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 106, 500-505.

- Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2001) Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47,XXY, mosaic 46,XY/47,XXY and 47,XYY) assessed by fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 16, 887-892.
- Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I (2002) Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 17, 2600-2614.
- Bosch M, Rajmil O, Martínez-Pasarell O, Egozcue J, Templado C (2001) Linear increase of diploidy in human sperm with age: a four-colour FISH study. *Eur J Hum Genet* 9, 533-538.
- Boué J, Taillemite JL, Hazael-Massieux P, Léonard C, Boué A (1975) Association of pericentric inversion of chromosome 9 and reproductive failure in ten unrelated families. *Humangenetik* 30, 217-224.
- Brown WR, MacKinnon PJ, Villasanté A, Spurr N, Buckle VJ, Dobson MJ (1990) Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell* 63, 119-132.
- Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Turner JM (2009) The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat Rev Genet* 10, 207-216.
- Burk RD, Szabo P, O'Brien S, Nash WG, Yu L, Smith KD (1985) Organization and chromosomal specificity of autosomal homologs of human Y chromosome repeated DNA. *Chromosoma* 92, 225-233.
- Burrello N, Vicari E, Shin P, Agarwal A, De Palma A, Grazioso C, D'Agata R, Calogero AE (2003) Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes. *Hum Reprod* 18, 1371-1376.
- Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, Di Benedetto D, De Palma A, Romeo R, D'Agata R, Calogero AE (2004) Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum Reprod* 19, 2298-2302.
- Burrello N, Vicari E and Calogero AE (2005) Chromosome abnormalities in spermatozoa of patients with azoospermia and normal somatic karyotype. *Cytogenet Genome Res* 111, 363-365.
- Buwe A, Guttenbach M, Schmid M (2005) Effect of paternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 111, 213-228.

## C

- Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Romeo R, Rappazzo G, D'Agata R (2001) Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum Reprod* 16, 1172-1179.
- Cameron A, Trivedi K (1998) Regression analysis of count data. Cambridge: Cambridge University Press.
- Carrell DT, Emery BR, Liu L (1999) Characterization of aneuploidy rates, protamine levels, ultrastructure, and functional ability of round-headed sperm from two siblings and implications for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 71, 511-516.
- Carrell DT, Wilcox AL, Udoff LC, Thorp C, Campbell B (2001) Chromosome 15 aneuploidy in the sperm and conceptus of a sibling with variable familial expression of round-headed sperm syndrome. *Fertil Steril* 76, 1258-1260.
- Chandley AC, Maclean N, Edmond P, Fletcher J, Watson GS (1976) Cytogenetics and infertility in man. II. Testicular histology and meiosis. *Ann Hum Genet* 40, 165-176.
- Codina-Pascual M, Kraus J, Speicher MR, Oliver-Bonet M, Murcia V, Sarquella J, Egozcue J, Navarro J, Benet J (2004) Characterization of all human male synaptonemal complexes by subtelomere multiplex-FISH. *Cytogenet Genome Res* 107, 18-21.
- Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Campillo M, García F, Egozcue S, Abad C, Egozcue J, Benet J (2005) Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum Reprod* 20, 2133-2139.
- Codina-Pascual M, Navarro J, Oliver-Bonet M, Kraus J, Speicher MR, Arango O, Egozcue J, Benet J (2006a) Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes. *Hum Reprod* 21, 1490-1497.

- Codina-Pascual M, Navarro J, Egozcue J, Benet J (2006b) A human tetraploid pachytene spermatocyte as the possible origin of diploid sperm: a case report. *Hum Reprod* 21, 1795-1797.
- Collodel G, Moretti E, Capitani S, Piomboni P, Anichini C, Estenoz M, Baccetti B (2006) TEM, FISH and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia* 38, 122-127.
- Collodel G, Capitani S, Baccetti B, Pammolli A, Moretti E (2007) Sperm aneuploidies and low progressive motility. *Hum Reprod* 22, 1893-1898.
- Cornforth MN (2001) Analyzing radiation-induced complex chromosome rearrangements by combinatorial painting. *Radiat Res* 155, 643-659.
- Cremer T, Cremer M (2010) Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* doi: 10.1101/cshperspect.a003889

## D

- De Braekeleer M, Dao TN (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6, 245-250.
- De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lécureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven G (2004) A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1327-1332.
- De Kretser DM (1997) Male infertility. *Lancet* 349, 787-790.
- De la Chapelle A, Schröder J, Stenstrand K, Fellman J, Herva R, Saarni M, Anttolainen I, Tallila I, Tervilä L, Husa L, Tallqvist G, Robson EB, Cook PJ, Sanger R (1974) Pericentric inversions of human chromosomes 9 and 10. *Am J Hum Genet* 26, 746-766.
- Devroey P, Van Steirteghem A (2004) A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update* 10, 19-28.
- Ding DQ, Haraguchi T, Hiraoka Y (2009) From meiosis to postmeiotic events: alignment and recognition of homologous chromosomes in meiosis. *FEBS J* 277, 565-570.
- Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, van den Ouwel AM, Pieters MH, Weber RF, Govaerts LC (2002) Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod* 17, 13-16.
- Douet-Guilbert N, Bris MJ, Amice V, Marchetti C, Delobel B, Amice J, Braekeleer MD, Morel F (2005) Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature. *Int J Androl* 28, 372-379.
- Durakbasi-Dursun HG, Zamani AG, Kutlu R, Görkemli H, Bahce M, Acar A (2008) A new approach to chromosomal abnormalities in sperm from patients with oligoasthenoteratozoospermia: detection of double aneuploidy in addition to single aneuploidy and diploidy by five-color fluorescence in situ hybridization using one probe set. *Fertil Steril* 89, 1709-1717.

## E

- Egozcue J, Templado C, Vidal F, Navarro J, Morer-Fargas F, Marina S (1983a) Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum Genet* 65, 185-188.
- Egozcue J (1983b) Patología de la meiosis. En: *Diagnóstico de la esterilidad masculina*. ASES (Barcelona), 167-177.
- Egozcue J, Blanco J, Vidal F (1997) Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 3, 441-452.
- Egozcue J, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Sarrate Z, Vidal F (2003) Genetic analysis of sperm and implications of severe male infertility--a review. *Placenta* 24, S62-65.
- Egozcue J, Sarrate Z, Codina-Pascual M, Egozcue S, Oliver-Bonet M, Blanco J, Navarro J, Benet J, Vidal F (2005) Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet Genome Res* 111, 337-342.

- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J (2000a) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 6, 93-105.
- Egozcue S, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Egozcue J (2000b) Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 17, 307-309.
- Egozcue S, Blanco J, Vidal F, Egozcue J (2002) Diploid sperm and the origin of triploidy. *Hum Reprod* 17, 5-7.
- Eiben B, Leipoldt M, Rammelsberg O, Krause W, Engel W (1987) High incidence of minor chromosomal variants in teratozoospermic males. *Andrologia* 19, 684-687.
- Evans EP, Breckon G, Ford CE (1964) An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* 15, 289-294.

## F

- Faure AK, Aknin-Seifer I, Frérot G, Pelletier R, De Robertis C, Cans C, Levy R, Jimenez C, Lejeune H, Terrier N, Bergues U, Hennebicq S, Rousseaux S (2007). Predictive factors for an increased risk of sperm aneuploidies in oligo-astheno-teratozoospermic males. *Int J Androl* 30, 153-162.
- Ferlin A, Vinanzi C, Garolla A, Selice R, Zuccarello D, Cazzadore C, Foresta C (2006) Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65, 606-610.
- Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C (2007a) Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online* 14, 734-745.
- Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, Lenzi A, Foresta C (2007b) Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 762-770.
- Finkelstein S, Mukamel E, Yavetz H, Paz G, Avivi L (1998) Increased rate of nondisjunction in sex cells derived from low-quality semen. *Hum Genet* 102, 129-137.
- Ford HER (1973) Meiosis and Meiotic Chromosomes. *Human chromosomes*, 53-78. Academic Press, London and New York.
- Foresta C, Moro E, Ferlin A (2001) Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 22, 226-239.
- Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L and Dallapiccola B (2002) Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum Genet* 10, 303-312.
- Foresta C, Garolla A, Bartoloni L, Bettella A, Ferlin A (2005) Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 152-156.

## G

- Gardner RJ, Sutherland GR (2004) *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. 3rd edition, Oxford University Press, New York.
- Georgiou I, Syrrou M, Pardalidis N, Karakitsios K, Mantzavinos T, Giotitsas N, Loutradis D, Dimitriadis F, Saito M, Miyagawa I, Tzoumis P, Sylakos A, Kanakas N, Moustakareas T, Baltogiannis D, Touloupides S, Giannakis D, Fatouros M, Sofikitis N (2006) Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. *Asian J Androl* 8, 643-673.
- Gerton JL, Hawley RS (2005) Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nat Rev Genet* 6, 477-487.
- Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, Menchini Fabris GF, Voliani S, Ferraretti AP (2005) Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum Reprod* 20, 2140-2152.
- Gole LA, Wong PF, Ng PL, Wang XQ, Ng SC, Bongso A (2001) Does sperm morphology play a significant role in increased sex chromosomal disomy? A comparison between patients with teratozoospermia and OAT by FISH. *J Androl* 22, 759-763.

- Guichaoua MR, Speed RM, Luciani JM, Delafontaine D, Chandley AC (1992) Infertility in human males with autosomal translocations. II. Meiotic studies in three reciprocal rearrangements, one showing tertiary monosomy in a 45-chromosome individual and his father. *Cytogenet Cell Genet* 60, 96-101.
- Guttenbach M, Schmid M (1990) Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 46, 553-558.
- Guttenbach M, Martinez-Expósito MJ, Michelmann HW, Engel W, Schmid M (1997) Incidence of diploid and disomic sperm nuclei in 45 infertile men. *Hum Reprod* 12, 468-473.

## H

- Handel MA, Schimenti JC (2010) Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet* 11, 124-136.
- Härkönen K, Suominen J, Lähdetie J (2001) Aneuploidy in spermatozoa of infertile men with teratozoospermia. *Int J Androl* 24, 197-205.
- Hassold T, Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2, 280-291.
- Higgins MJ, Wang HS, Shtromas I, Haliotis T, Roder JC, Holden JJ, White BN (1985) Organization of a repetitive human 1.8 kb KpnI sequence localized in the heterochromatin of chromosome 15. *Chromosoma* 93, 77-86.
- Honda H, Miharuru N, Ohashi Y, Honda N, Hara T, Ohama K (1999) Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers, t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triple-color fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 105, 428-436.
- Hosmer D, Lemeshow S (2000) Applied logistic regression. New York: John Wiley & Sons, cop.
- Hristova R, Ko E, Greene C, Rademaker A, Chernos J, Martin R (2002) Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with asthenoteratozoospermia. *Biol Reprod* 66, 1781-1783.
- Hultén M, Eliasson R, Tillinger KG (1970) Low chiasma count and other meiotic irregularities in two infertile 46, XY men with spermatogenic arrest. *Hereditas* 65, 285-290.
- Hultén M, Solari AJ, Skakkebaek NE (1974) Abnormal synaptonemal complex in an oligochiasmatic man with spermatogenic arrest. *Hereditas* 78, 105-116.
- Hultén M, Goldman ASH, Saadallah N, Wallace BMN, Creasy MR (1992) Meiotic studies in man. Rooney DE, Czepulkowski BH (eds): *Human Cytogenetics. A Practical Approach, Vol 1, Constitutional Analysis*. IRL Press at Oxford University Press, New York.
- Hultén M, Barlow AL, Tease C (2001) Meiotic studies in humans. Rooney DE (ed): *Human Cytogenetics: Constitutional Analysis*. Oxford University Press, New York.
- Hunt PA, Hassold TJ (2002) Sex matters in meiosis. *Science* 296, 2181-2183.
- Hunter N, Kleckner N (2001) The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell* 106, 59-70.

## J

- Joseph AM, Gosden JR, Chandley AC (1984) Estimation of aneuploidy levels in human spermatozoa using chromosome specific probes and in situ hybridisation. *Hum Genet* 66, 234-238.

## K

- Kaiser P (1984) Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics. *Hum Genet* 68, 1-47.
- Keeney S (2001) Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr Top Dev Biol* 52, 1-53.
- Keeney S, Neale MJ (2006) Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem Soc Trans* 34, 523-525.

- Kirkpatrick G, Ferguson KA, Gao H, Tang S, Chow V, Yuen BH, Ma S (2008) A comparison of sperm aneuploidy rates between infertile men with normal and abnormal karyotypes. *Hum Reprod* 23, 1679-1683.
- Klein F, 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.
- Kouznetsova A, Lister L, Nordenskjöld M, Herbert M, Höög C (2007) Bi-orientation of achiasmatic chromosomes in meiosis I oocytes contributes to aneuploidy in mice. *Nat Genet* 39, 966-968.
- Koulischer L, Schoysman R, Gillerot Y, Derby JM (1982) Meiotic chromosome studies in human male infertility. Genetic control of gamete production and function. Crosignani PG i Rubin BL. New York, USA. Academic Press, 239-260.
- Kühl H, Röttger S, Heilbronner H, Enders H, Schempp W (2001) Loss of the Y chromosomal PAR2-region in four familial cases of satellited Y chromosomes (Yqs). *Chromosome Res* 9, 215-222.

## L

- Lamb NE, Feingold E, Savage A, Avramopoulos D, Freeman S, Gu Y, Hallberg A, Hersey J, Karadima G, Pettay D, Saker D, Shen J, Taft L, Mikkelsen M, Petersen MB, Hassold T, Sherman SL (1997) Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. *Hum Mol Genet* 6, 1391-1399.
- Lamont MA, Faed MJ, Baxby K (1981) Comparative studies of spermatogenesis in fertile and subfertile men. *J Clin Pathol* 34, 145-150.
- Laurie DA, Hultén MA (1985a) Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann Hum Genet* 49, 189-201.
- Laurie DA, Hultén MA (1985b) Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Ann Hum Genet* 49, 203-214.
- Lebart L, Morineau A, Piron M (2000) *Statistique exploratoire multidimensionnelle*, 3e éd. Paris: Dunod.
- Lejeune J (1963) Autosomal disorders. *Pediatrics* 32, 326-337.
- Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J (2001) Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 76, 479-484.
- Li XC, Barringer BC, Barbash DA (2009) The pachytene checkpoint and its relationship to evolutionary patterns of polyploidization and hybrid sterility. *Heredity* 102, 24-30.
- Lipshultz LI, Howards SS (1997) *Infertility in the Male*. St. Louis USA, Mosby-Year Book Inc.
- Longhese MP, Bonetti D, Guerini I, Manfrini N, Clerici M (2009) DNA double-strand breaks in meiosis: checking their formation, processing and repair. *DNA Repair (Amst)* 8, 1127-1138.

## M

- Machev N, Gosset P, Viville S (2005a) Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 111, 352-357.
- Machev N, Gosset P, Warter S, Treger M, Schillinger M, Viville S (2005b) Fluorescence in situ hybridization sperm analysis of six translocation carriers provides evidence of an interchromosomal effect. *Fertil Steril* 84, 365-373.
- Maduro MR, Lo KC, Chuang WW, Lamb DJ (2003) Genes and male infertility: what can go wrong? *J Androl*. 24, 485-493.
- Mahadevaiah SK, Bourc'his D, de Rooij DG, Bestor TH, Turner JM, Burgoyne PS (2008) Extensive meiotic asynapsis in mice antagonises meiotic silencing of unsynapsed chromatin and consequently disrupts meiotic sex chromosome inactivation. *J Cell Biol* 182, 263-276.
- Maiato H, Lince-Faria M (2010) The perpetual movements of anaphase. *Cell Mol Life Sci*. doi:10.1007/s00018-010-0327-5.

- Martin Lucas MA, Pérez Castillo A, Abrisqueta JA (1984) Origin and structure of a satellited Y chromosome. *Ann Genet* 27, 184-186.
- Martin RH, Lin CC, Balkan W, Burns K (1982) Direct chromosomal analysis of human spermatozoa: preliminary results from 18 normal men. *Am J Hum Genet*, 34, 459-468.
- Martin RH, Greene C, Rademaker A, Barclay L, Ko E, Chernos J (2000) Chromosome analysis of spermatozoa extracted from testes of men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 15, 1121-1124.
- Martin RH, Rademaker AW, Greene C, Ko E, Hoang T, Barclay L, Chernos J (2003a) A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. *Biol Reprod* 69, 535-539.
- Martin RH, Greene C, Rademaker AW (2003b) Sperm chromosome aneuploidy analysis in a man with globozoospermia. *Fertil Steril* 79, 1662-1664.
- Martin RH (2006) Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. *Reprod Toxicol* 22, 142-147.
- Martin RH (2008) Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 16, 523-531.
- Matzuk MM, Lamb DJ (2008) The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 14, 1197-1213.
- Mau-Holzmann UA (2005) Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res* 111, 317-336.
- McCallum T, Milunsky J, Munarriz R, Carson R, Sadeghi-Nejad H, Oates R (2001) Unilateral renal agenesis associated with congenital bilateral absence of the vas deferens: phenotypic findings and genetic considerations. *Hum Reprod* 16, 282-288.
- McDermott A (1973) The frequency and distribution of chiasmata in man. *Ann Hum Genet* 37, 13-20.
- McInnes B, Rademaker A, Greene CA, Ko E, Barclay L, Martin RH (1998) Abnormalities for chromosomes 13 and 21 detected in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod* 13, 2787-2790.
- Mehdi M, Smatti B, Saad A, Guerin JF, Benchaib M (2006) Analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) of the relationship between gonosomic aneuploidy and the results of assisted reproduction in men with severe oligozoospermia. *Andrologia* 38, 137-141.
- Metzler-Guillemain C, Mignon C, Depetris D, Guichaoua MR, Mattei MG (1999) Bivalent 15 regularly associates with the sex vesicle in normal male meiosis. *Chromosome Res* 7, 369-378.
- Miharu N (2005) Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 111, 347-351.
- Moosani N, Pattinson HA, Carter MD, Cox DM, Rademaker AW, Martin RH (1995) Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 64, 811-817.
- Mroz K, Hassold TJ, Hunt PA (1998) Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors. *Hum Reprod* 14, 1151-1156.

## **N**

- Nagvenkar P, Zaveri K, Hinduja I (2005) Comparison of the sperm aneuploidy rate in severe oligozoospermic and oligozoospermic men and its relation to intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 84, 925-931.
- Nakamura Y, Kitamura M, Nishimura K, Koga M, Kondoh N, Takeyama M, Matsumiya K, Okuyama A (2001) Chromosomal variants among 1790 infertile men. *Int J Urol* 8, 49-52.
- Nallella KP, Sharma RK, Aziz N and Agarwal A (2006) Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril* 85, 629-634.
- Nath J, Tucker JD, Hando JC (1995) Y chromosome aneuploidy, micronuclei, kinetochores and aging in men. *Chromosoma* 103, 725-731.
- Navarro J, Vidal F, Guitart M, Egozcue J (1981) A method for the sequential study of synaptonemal complexes by light and electron microscopy. *Hum Genet* 59, 419-421.

- Navarro J, Vidal F, Templado C, Benet J, Marina S, Pomerol JM, Egozcue J (1986) Meiotic chromosome studies and synaptonemal complex analyses by light and electron microscopy in 47 infertile or sterile males. *Hum Reprod* 1, 523-527.
- Navarro J, Templado C, Benet J, Lange R, Rajmil O, Egozcue J (1990) Sperm chromosome studies in an infertile man with partial, complete asynapsis of meiotic bivalents. *Hum Reprod* 5, 227-229.
- Navarro J, Vidal F, Benet J, Templado C, Marina S, Egozcue J (1991) XY-trivalent association and synaptic anomalies in a male carrier of a Robertsonian t(13;14) translocation. *Hum Reprod* 6, 376-381.
- Navarro-Costa P, Gonçalves J, Plancha CE (2010) The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Hum Reprod Update*. doi:10.1093/humupd/dmq005.
- Nicopoulos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Homa S, Nice L, Tempest H, Ramsay JW (2008) The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? *Hum Reprod* 23, 240-250.
- Nishikawa N, Murakami I, Ikuta K, Suzumori K (2000) Sex chromosomal analysis of spermatozoa from infertile men using fluorescence in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet* 17, 97-102.
- Nuti F, Krausz C (2008) Gene polymorphisms/mutations relevant to abnormal spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 16, 504-513.

## O

- O'Flynn O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A (2010) The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril* 93, 1-12.
- Ohashi Y, Miharu N, Honda H, Samura O, Ohama K (2001) High frequency of XY disomy in spermatozoa of severe oligozoospermic men. *Hum Reprod* 16, 703-708.
- Oliver-Bonet M, Liehr T, Nietzel A, Heller A, Starke H, Claussen U, Codina-Pascual M, Pujol A, Abad C, Egozcue J, Navarro J, Benet J (2003) Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *Eur J Hum Genet* 11, 879-883.
- Oliver-Bonet M, Benet J, Sun F, Navarro J, Abad C, Liehr T, Starke H, Greene C, Ko E, Martin RH (2005) Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Hum Reprod* 20, 683-688.

## P

- Page SL, Hawley RS (2003) Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301, 785-789.
- Paigen K, Petkov P (2010) Mammalian recombination hot spots: properties, control and evolution. *Nat Rev Genet* 11, 221-233.
- Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, Kearns WG (1999) Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 14, 1266-1273.
- Pang MG, Kim YJ, Lee SH, Kim CK (2005) The high incidence of meiotic errors increases with decreased sperm count in severe male factor infertilities. *Hum Reprod* 20, 1688-1694.
- Pearson PL, Ellis JD, Evans HJ (1970) A gross reduction in chiasma formation during meiotic prophase and a defective DNA repair mechanism associated with a case of human male infertility. *Cytogenetics* 9, 460-467.
- Pellestor F, Andréo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J (2002) Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Hum Reprod* 17, 2134-2145.
- Pellestor F, Andréo B, Anahory T, Hamamah S (2006) The occurrence of aneuploidy in human: lessons from the cytogenetic studies of human oocytes. *Eur J Med Genet* 49, 103-116.



- Penna Videau S, Araujo H, Ballesta F, Ballezá JL, Vanrell JA (2001) Chromosomal abnormalities and polymorphisms in infertile men. *Arch Androl* 46, 205-210.
- Petronczki M, Siomos MF, Nasmyth K (2003) Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112, 423-440.
- Pfeffer J, Pang MG, Hoegerman SF, Osgood CJ, Stacey MW, Mayer J, Oehninger S, Kearns WG (1999) Aneuploidy frequencies in semen fractions from ten oligoasthenoteratozoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 72, 472-478.
- Pieters MH, Geraedts JP, Meyer H, Dumoulin JC, Evers JL, Jongbloed RJ, Nederlof PM, van der Flier S (1990) Human gametes and zygotes studied by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 53, 15-19.
- Plastira K, Angelopoulou R, Mantas D, Msaouel P, Lyrakou S, Plastiras A, Bolaris S, Baka S, Papanastasiou N (2007) The effects of age on the incidence of aneuploidy rates in spermatozoa of oligoasthenozoospermic patients and its relationship with ICSI outcome. *Int J Androl* 30, 65-72.
- Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S (2009) Genetics of human male infertility. *Singapore Med J* 50, 336-347.

## R

- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066-1073.
- Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Sibert L, Simeon N, Joly G, Mace B (1999) Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet* 105, 266-272.
- Rives N, Siméon N, Milazzo JP, Barthélémy C, Macé B (2003a) Meiotic segregation of sex chromosomes in mosaic and non-mosaic XYY males: case reports and review of the literature. *Int J Androl* 26, 242-249.
- Rives N, Jarnot M, Mousset-Siméon N, Joly G, Macé B (2003b) Fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis of chromosome segregation and interchromosomal effect in spermatozoa of a reciprocal translocation t(9,10)(q11;p11.1) carrier. *J Hum Genet* 48, 535-540.
- Rives NM (2005) Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: asthenozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 111, 358-362.
- Rockmill B, Voelkel-Meiman K, Roeder GS (2006) Centromere-proximal crossovers are associated with precocious separation of sister chromatids during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 174, 1745-1754.
- Roeder GS (1997) Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev* 11, 2600-2621.
- Roeder GS, Bailis JM (2000) The pachytene checkpoint. *Trends Genet* 16, 395-403.
- Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Minguez Y, Remohi J, Pellicer A (2001) Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 16, 2084-2092.
- Rubes J, Vozdova M, Oracova E, Perreault SD (2005) Individual variation in the frequency of sperm aneuploidy in humans. *Cytogenet Genome Res* 111, 229-236.
- Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi R (1978) Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 274, 911-913.

## S

- Saadallah N, Hultén M (1986) EM investigations of surface spread synaptonemal complexes in a human male carrier of a pericentric inversion inv(13)(p12q14): the role of heterosynapsis for spermatocyte survival. *Ann Hum Genet* 50, 369-383.
- Sandalinas M, Márquez C, Munné S (2002) Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Mol Hum Reprod* 8, 580-585.
- Sarrate Z, Blanco J, Egozcue S, Vidal F, Egozcue J (2004) Identification of meiotic anomalies with multiplex fluorescence in situ hybridization: Preliminary results. *Fertil Steril* 82, 712-717.

- Sarrate Z, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Egozcue J, Vidal F (2005) FISH studies of chromosome abnormalities in germ cells and its relevance in reproductive counseling. *Asian J Androl* 7, 227-236.
- Sarrate Z, Anton E, Blanco J, Vidal F (2008) Anàlisi citogenètica d'espermatozoides humans. *Biologia de la reproducció. Treballs de la Societat Catalana de Biologia* 59, 177-184.
- Sarrate Z, Anton E (2009) Fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol in human sperm. *J Vis Exp*. Sep 1;(31). pii: 1405. doi: 10.3791/1405.
- Sarrate Z, Vidal F, Blanco J (2010) Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. *Fertil Steril* 93, 1892-1902.
- Schimenti J (2005) Synapsis or silence. *Nat Genet* 37, 11-13.
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273,494-497.
- Shintomi K, Hirano T (2010) Sister chromatid resolution: a cohesin releasing network and beyond. *Chromosoma*. doi:10.1007/s00412-010-0271-z.
- Siffroi JP, Benzacken B, Straub B, Le Bourhis C, North MO, Curotti G, Bellec V, Alvarez S, Dadoune JP (1997) Assisted reproductive technology and complex chromosomal rearrangements: the limits of ICSI. *Mol Hum Reprod* 3, 847-851.
- Simchen G (2009) Commitment to meiosis: what determines the mode of division in budding yeast? *Bioessays* 31, 169-177.
- Skakkebaek NE, Philip J, Hammen R (1969) Meiotic chromosomes in Klinefelter's syndrome. *Nature* 221, 1075-1076.
- Skakkebaek NE, Bryant JI, Philip J (1973) Studies on meiotic chromosomes in infertile men and controls with normal karyotypes. *J Reprod Fertil* 35, 23-36.
- Skakkebaek NE, Giwercman A, de Kretser D (1994) Pathogenesis and management of male infertility. *Lancet* 343, 1473-1479.
- Smeets DF, Merkx GF, Hopman AH (1991) Frequent occurrence of translocations of the short arm of chromosome 15 to other D-group chromosomes. *Hum Genet* 87, 45-48.
- Smith A, Fraser IS, Elliott G (1979) An infertile male with balanced Y;19 translocation. Review of Y;autosome translocations. *Ann Genet* 22, 189-194.
- Snowden T, Shim KS, Schmutte C, Acharya S, Fishel R (2008) hMSH4-hMSH5 adenosine nucleotide processing and interactions with homologous recombination machinery. *J Biol Chem* 283, 145-154.
- Solari AJ (1980) Synaptosomal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma* 81, 315-337.
- Solari AJ, Ponzio R, Rey Valzacchi G (1991) Synaptonemal complex karyotyping in an oligospermic patient with heterochromatin duplication in chromosome n. 9. *Medicina (B Aires)* 51, 217-221.
- Speed RM, Faed MJ, Batstone PJ, Baxby K, Barnetson W (1991) Persistence of two Y chromosomes through meiotic prophase and metaphase I in an XYY man. *Hum Genet* 87, 416-420.
- Speicher MR, Ballard SG, Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12, 368-375.
- Stergianou K, Gould CP, Waters JJ, Hultén M (1992) High population incidence of the 15p marker D15Z1 mapping to the short arm of one homologue 14. *Hum Genet* 88, 364.
- Stouffs K, Tournaye H, Liebaers I, Lissens W (2009) Male infertility and the involvement of the X chromosome. *Hum Reprod Update* 15, 623-637.
- Strassburger D, Reichart M, Kaufman S, Kasterstein E, Komarovskiy D, Bern O, Friedler S, Schachter M, Ron-El R, Raziell A (2007) Morphology assessment and fluorescence in situ hybridization of the same spermatozoon using a computerized cell-scanning system. *Hum Reprod* 22, 201-209.
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker A, Navarro J, Benet J, Martin RH (2004) Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am J Hum Genet* 74, 521-531.

- Sun F, Ko E, Martin RH (2006) Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reprod Biol Endocrinol* 4, 1.
- Székvolgyi L, Nicolas A (2010) From meiosis to postmeiotic events: homologous recombination is obligatory but flexible. *FEBS J* 277, 571-589.

## T

- Teixeira MR (2002) Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer. *Eur J Cancer* 38, 1580-1584.
- Tempest HG, Griffin DK (2004a) The relationship between male infertility and increased levels of sperm disomy. *Cytogenet Genome Res* 107, 83-94.
- Tempest HG, Homa ST, Dalakiouridou M, Christopikou D, Wright D, Zhai XP, Griffin DK (2004b) The association between male infertility and sperm disomy: evidence for variation in disomy levels among individuals and a correlation between particular semen parameters and disomy of specific chromosome pairs. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 82.
- Templado C, Marina S, Egozcue J (1976) Three cases of low chiasma frequency associated with infertility in man. *Andrologia* 8, 285-289.
- Templado C (1981a) Estudios meióticos en la infertilidad masculina (tesi). Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona. Tesi doctoral.
- Templado C, Vidal F, Marina S, Pomerol JM, Egozcue J (1981b) A new meiotic mutation: desynapsis of individual bivalents. *Hum Genet* 59, 345-348.
- Templado C, Vidal F, Navarro J, Marina S, Egozcue J (1984) Meiotic studies and synaptonemal complex analysis in two infertile males with a 13/14 balanced translocation. *Hum Genet* 67, 162-165.
- Templado C, Hoang T, Greene C, Rademaker A, Chernos J, Martin R (2002) Aneuploid spermatozoa in infertile men: teratozoospermia. *Mol Reprod Dev* 61, 200-204.
- Teo SH, Tan M, Knight L, Yeo SH, Ng I (1995) Pericentric inversion 9--incidence and clinical significance. *Ann Acad Med Singapore* 24, 302-304.
- Turner JM, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A, Xu X, Deng CX, Burgoyne PS (2005) Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet* 37, 41-47.
- Turner JM (2007) Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* 134, 1823-1831.

## U

- Uroz L, Rajmil O, Templado C (2008) Premature separation of sister chromatids in human male meiosis. *Hum Reprod* 23, 982-987.
- Uroz L (2009) Freqüència i origen d'anomalies meiótiques en individus infèrtils: Mecanismes de no disjunció. Universitat Autònoma de Barcelona. Tesi doctoral.
- Ushijima C, Kumasako Y, Kihai PE, Hirotsuru K, Utsunomiya T (2000) Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 15, 1107-1111.

## V

- 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. *Hum Reprod* 15, 351-365.
- Velissariou V, Antoniadis T, Patsalis P, Christopoulou S, Hatzipoulou A, Donoghue J, Bakou K, Kaminopetros P, Athanassiou V, Petersen MB (2001) Prenatal diagnosis of two rare de novo structural aberrations of the Y chromosome: cytogenetic and molecular analysis. *Prenat Diagn* 21, 484-487.
- Velissariou V, Sismani C, Christopoulou S, Kaminopetros P, Hatzaki A, Evangelidou P, Koumbaris G, Bartsocas CS, Stylianidou G, Skordis N, Diakoumakos A, Patsalis PC (2007) Loss of the Y chromosome PAR2 region and additional rearrangements in two familial cases of satellited Y chromosomes: cytogenetic and molecular analysis. *Eur J Med Genet* 50, 291-300.

- Vendrell JM, García F, Veiga A, Calderón G, Egozcue S, Egozcue J, Barri PN (1999) Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Hum Reprod* 14, 375-378.
- Verma RS, Gogineni SK, Kleyman SM, Conte RA (1997) Characterisation of a satellited non-fluorescent Y chromosome (Y[nfqs]) by FISH. *J Med Genet* 34, 817-818.
- Vidal F, Templado C, Navarro J, Marina S, Egozcue J (1982a) Meiotic and synaptonemal complex studies in a 14/21 translocation carrier. *Int J Androl* 5, 21-26.
- Vidal F, Templado C, Navarro J, Brusadin S, Marina S, Egozcue J (1982b) Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males. *Hum Genet* 60, 301-304.
- Vidal F, Navarro J, Templado C, Brusadin S, Egozcue J (1984) Synaptonemal complex studies in a mosaic 46,XY/47,XXY male. *Hum Genet* 66, 306-308.
- Vogt E, Kirsch-Volders M, Parry J, Eichenlaub-Ritter U (2008) Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutat Res* 651, 14-29.
- Vogt P (1990) Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on a highly conserved "chromatin folding code". *Hum Genet* 84, 301-336.
- Vogt PH (2005) Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 10, 81-93.

## W

- Walsh TJ, Pera RR, Turek PJ (2009) The genetics of male infertility. *Semin Reprod Med* 27, 124-136.
- Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, Page DC (2001) An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet* 27, 422-426.
- Wilkinson TA, Crolla JA (1993) Molecular cytogenetic characterization of three familial cases of satellited Y chromosomes. *Hum Genet* 91, 389-391.
- World Health Organization (1999): WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th Edition, Cambridge University Press; New York.
- Wyrobek AJ, Alhborn T, Balhorn R, Stanker L, Pinkel D (1990) Fluorescence in situ hybridization to Y chromosomes in decondensed human sperm nuclei. *Mol Reprod Dev* 27, 200-208.
- Wyrobek AJ, Robbins WA, Mehraein Y, Pinkel D, Weier HU (1994) Detection of sex chromosomal aneuploidies X-X, Y-Y, and X-Y in human sperm using two-chromosome fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 53, 1-7.
- Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, Glaser RL, Pearson FS, Evenson D (2006) Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 9601-9606.

## Y

- Yakin K, Balaban B, Urman B (2005) Is there a possible correlation between chromosomal variants and spermatogenesis? *Int J Urol* 12, 984-989.

## Z

- Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A, Hassold TJ (2000) Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. *Am J Hum Genet* 66, 1807-1820.
- Zijno A, Leopardi P, Marcon F, Crebelli R (1996) Sex chromosome loss and non-disjunction in women: analysis of chromosomal segregation in binucleated lymphocytes. *Chromosoma* 104, 461-467.

**Agraiments**



Per fi arriba un dia en que allò en que has posat tants esforços s'acaba materialitzant i la satisfacció és realment gran, de veritat que sí. Però aquest dia també et fa pensar en el llarg camí recorregut i sobretot en totes aquelles persones que, d'una manera o altra, ho han fet possible. I és aleshores quan et sents amb la necessitat de compartir-ho amb totes elles i de donar-los, sincerament, les gràcies.

El dia que vaig apropar-me a la Unitat de Biologia Cel·lular per demanar informació sobre les opcions de màsters, cursos, tesis, o qualsevol cosa que em permetés apropar-me una mica al món de la recerca, poc m'imaginava que sortiria amb una proposta de Tesi sota el braç i a punt de començar una de les experiències més gratificants de tota la meua vida.

De fet, si puc dir que l'experiència ha estat positiva, en gran part és gràcies als "jefes" que he tingut. Què dir de la Fanny i el Joan!?, sempre implicats, predisposats, amb una imprescindible visió crítica, i sobretot amb una facilitat de tracte que han fet que treballar amb ells sigui un veritable plaer. Gràcies per la confiança i *també* per l'oportunitat. De l'Egozcue, destacar l'entusiasme, l'energia, la proximitat i sobretot l'enriquiment, no només científic, que va significar treballar amb ell.

Però també he compartit coneixements i experiències amb altres membres d'un equip de treball (i de molt més que treball!), que un bon dia es va anomenar "CC". A l'Ester (*línia espermatozoides*) agrair-li totes les hores compartides, tant de feina, com de congressos, seminaris, cursos de l'IDES (no ho hauria suportat sense tu al costat!), Ítaques, Argons, i sobretot, totes les converses, confidències i hores de despatx que ens han unit al llarg d'aquests anys. De la Mònica (*línia embrions*), tinc ben present els divertits i una mica desorientats inicis que vam compartir, i que de fet, van servir per establir l'amistat que encara tenim. I com sovint passa en totes les Tesis, la meua (línia meiosi), ha passat per dificultats i entrebancs. M'agradaria doncs, donar les gràcies a l'Òscar, a la Marta P i a la Lydia, per interessar-se i fer costat en aquests moments. A la Cris, voldria agrair-li totes les converses i hores de despatx compartides, la veritat és que han fet el camí molt més entretingut. A l'Albert i a l'Anna, només dir-los que no sempre he fet feina davant d'un ordinador, i que em moro de ganes de passar-me una tarda sencera trastejant pel laboratori.

A aquells que constitueixen els diferents "graus" de veterania de la Unitat (Anna, Carme, Dolors, Elena, Josep, Laura, Leo i Montse), entenent la veterania com un grau, voldria agrair-vos les aportacions que heu anat fent en el dia a dia, tant en la recerca com en la docència; però sobretot, perquè m'heu ensenyat que tot resulta més fàcil si es treballa en un entorn agradable.

Què dir als de la meua quinta (menys veterans que els anteriors tot i que ja "dèu-n'hi-do")? Doncs a l'Assumpta, a la Marta M, a la Nerea i al Nuno, agrair-vos les estones disteses que hem

passat conversant, tant de feina com de tants altres aspectes de la vida. Gràcies pel suport i l'interès que sempre m'heu demostrat, especialment en els moments més complicats.

També vull agrair a les generacions que s'han anat incorporant en els últims anys que hagin format part, d'una manera o altra, d'aquest projecte (David, Eli, Irene, Judit, Mariona, Marta F, Sergi i Sheyla), ja sigui compartint hores de laboratori, de microscopi, de pràctiques o d'altres activitats menys laborals.

Als tècnics de la casa, al Jonatan i al Marc, agrair-vos el vostre suport en les incomptables hores de laboratori, de microscopi i de preparació de pràctiques.

I de ben segur, tot això no hagués estat possible sense la valuosa i imprescindible ajuda de la Sílvia, que tant m'ha ajudat en les tedioses però necessàries gestions de paperassa.

Finalment, a les incorporacions més recents (Anna M, Cristina F, Daniel, Laia, Puri i Tània), voldria explicar-vos que us heu incorporat en un dels moments menys sociables i més avorrits de la meva vida. Crec que haurem de posar-hi remei a partir del 22 de juny.

Però al llarg d'aquests anys són moltes les persones que han anat passant per la Unitat i que, tot i que ara no hi són, també han format part del recorregut. Malgrat que els camins s'han anat bifurcant i separant, les experiències compartides encara fan que mantinguem una bona amistat (Amine, Aurora, Cèsar, Laia M, Laura L, Pep, Pilar...).

I per si m'hagués deixat a algú, vull fer un agraïment extensiu a tothom per les nombroses estones lúdico-festives que han fet el camí molt més divertit. Em refereixo a les bicicletades, seminaris blancs, calçotades, matances del porc, celebracions de Sants i aniversaris, fotografies de carnestoltes, edicions de "tasteig culinari", barbacoes, jornades, excursions al Pedraforca, celebracions de Sant Wenceslao, i fins i tot, graellades de gambes al menjador de la Unitat! Sense oblidar-nos de que compartir un doble trasllat és una experiència que crec que uneix definitivament a les persones per a tota la vida.

D'altra banda, vull també donar les gràcies a tota la "gent" de Prenatal Genetics, especialment a l'Agustí, a l'Esther, al Joan, a la Manoli i al Vicenç, per tot el que em van ensenyar en els meus primers passos pel laboratori. No només em refereixo a la part més "tècnica", sinó també a tots els bons hàbits de treball que tant m'han servit al llarg d'aquests anys. Però sobretot, vull agrair-vos sincerament l'oportunitat que em vareu donar, perquè sense ella avui no estaria on sóc ara.



Pels que no viuen el dia a dia de la recerca, a vegades es fa difícil comprendre la dedicació que requereix, i per això vull agrair a tota la meua família, tant la de sempre com la més recent, l'esforç que han fet per comprendre i donar-me suport en aquesta llarga empresa que vaig decidir iniciar. Al David vull agrair-li especialment que sempre m'hagi fet costat en el difícil camí de la ciència, i de fet, en tants altres camins; fins i tot en els més inversemblants.

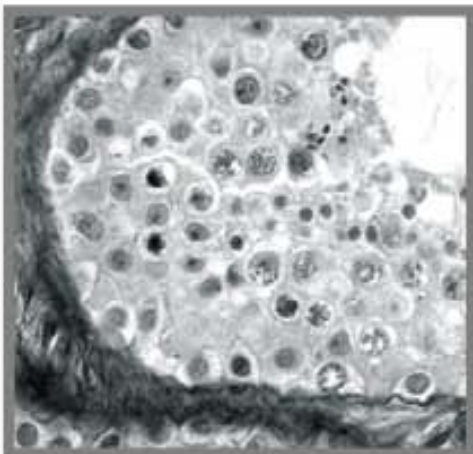
A tots els amics, tant als d'aquí, com als de Menorca, com als de l'altre banda del "bassal", vull donar-vos les gràcies pel suport, la paciència i les llargues converses compartides que han fet molt més portable algunes de les etapes del trajecte.

En fi, que tot i que quan comences una Tesi no tens n'hi idea de què implica ni d'on et portarà, ara que sembla que l'he enllestida, haig de dir que el balanç és absolutament positiu.

Gràcies a tots!







Universitat Autònoma de Barcelona, Juny 2010.