



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma  
de Barcelona

**Efecte de l'edat paterna  
en les anomalies cromosòmiques  
numèriques i estructurals  
de l'espermatozoide humà**

Memòria presentada per  
**Anna Donate López**

Per optar al títol de  
**Doctor en Biologia Cel·lular**

Tesi dirigida per  
**Dra. Cristina Templado Meseguer**

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

**Directora**

**Doctoranda**

**Cristina Templado**

**Anna Donate**

Bellaterra, juny de 2016



*Al meu pare,  
per ensenyar-me que tot el que es comença  
s'ha d'acabar.*

*A la meva mare,  
per ensenyar-me que a impossible  
li sobren dues lletres.*

*Al meu germà,  
per tenir la màgia de robar-me somriures.*



*A l'Edu,  
per acompanyar-me sempre i  
donar-me el seu suport incondicional,*

*A la Clàudia i l'Eduard,  
per ser el meu tresor.*



*A la Cristina i a l'Anna,  
perquè sense elles no hagués estat possible.*





*“Dónde haya un árbol que plantar, plántalo tú.  
Dónde haya un error que enmendar, enmiéndalo tú.  
Dónde haya un esfuerzo que todos esquivan, hazlo tú.  
Sé tú el que aparta la piedra del camino”*

Gabriela Mistral







# Sumari

<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>3</b>
1.1. Les anomalies cromosòmiques a l'espècie humana	3
1.2. Anàlisi citogenètic de l'espermatozoide humà	14
1.3. Origen patern de les anomalies cromosòmiques	18
1.4. Estudis citogenètics en individus d'edat avançada	21
1.5. Objectius	29
<b>2. MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>35</b>
2.1 Material biològic	35
2.2. Congelació de mostres	35
2.3. Extensió d'espermatozoides	36
2.4. Tractaments previs a la hibridació del DNA	36
2.5. Protocol de la tècnica de FISH amb sondes subtelomèriques	37
2.6. Panel de sondes subtelomèriques <i>ToTelVysion</i>	39
2.7. Captura i anàlisi d'imatges	42
2.8. Criteris de recompte de senyals d'hibridació	42
2.9. Anàlisi citogenètic	43
2.10. Anàlisi estadístic de les dades	45
<b>3. RESULTATS</b>	<b>51</b>
3.1 Anàlisi d'anomalies numèriques en espermatozoides	51
3.2. Anàlisi d'anomalies estructurals en espermatozoides	56

<b>4. DISCUSSIÓ</b>	<b>69</b>
4.1. Valoracions de la tècnica de FISH amb sondes subtelomèriques	69
4.2. Variabilitat interindividual en la freqüència d'anomalies cromosòmiques	73
4.3. Anomalies cromosòmiques en espermatozoides d'individus de la població	75
4.4. Efecte de la edat paterna en les anomalies cromosòmiques de l'espermatozoide	79
<b>5. CONCLUSIONS</b>	<b>89</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>95</b>

## **ARTICLES**

1. Advanced age increases chromosome structural abnormalities in human spermatozoa
2. Paternal age and numerical chromosome abnormalities in human spermatozoa

## **AGRAÏMENTS**







# 1. Introducció

2. Material i Mètodes

3. Resultats

4. Discussió

5. Conclusions

6. Bibliografia



### 1.1. Les anomalies cromosòmiques a l'espècie humana

A l'espècie humana, les anomalies cromosòmiques causen retard mental i del desenvolupament, infertilitat, esterilitat i mortalitat, mostrant una freqüència de l'1% en nounats, 6% en morts perinatals i 50% en avortaments espontanis (Jacobs i Hassold 1995) (Taula 1). El percentatge d'embrions portadors d'anomalies cromosòmiques és més elevat en humans que en altres espècies de mamífers, estimant-se que el 8,1% dels embarassos clínicament reconeguts presenten anomalies cromosòmiques, de les quals, un 7,1% són anomalies numèriques (aneuploïdia i poliploïdia) i un 0,8% anomalies estructurals.

**Taula 1.** Supervivència de les diferents anomalies cromosòmiques a l'espècie humana <sup>a</sup>

Estadi	Anomalies cromosòmiques (%)					TOTAL
	Trisomies	Monosomia X	Poliploïdies	Anomalies estructurals	Altres	
<b>Embarassos reconeguts <sup>b</sup></b>	4,3	1,3	1,5	0,8	0,2	<b>8,1</b>
<b>Avortaments espontanis</b>	26,8	8,6	9,8	2,0	0,7	<b>47,9</b>
<b>Morts perinatals</b>	3,9	0,3	0,6	0,4	0,6	<b>5,7</b>
<b>Nounats</b>	0,3	<0,01	<0,01	0,60	0,02	<b>0,9</b>

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

<sup>b</sup> Freqüències estimades considerant un 15% d'avortaments espontanis i un 1% de morts perinatals, sense tenir en compte les taxes de pèrdua preimplantacional d'embrions

Les anomalies estructurals són més freqüents en nounats i mostren un major grau de supervivència que les trisomies, com s'observa a la taula 1. Les úniques aneuploïdies compatibles amb la vida són les trisomies pels cromosomes 13 (síndrome de Patau), 18 (síndrome de Edwards), 21 (síndrome de Down) i pels cromosomes sexuals, així com la monosomia del cromosoma X (síndrome de Turner). Totes les anomalies cromosòmiques, incloses les viables, solen donar lloc a avortaments espontanis.

La freqüència d'anomalies cromosòmiques en el moment de la concepció està subestimada, ja que moltes d'elles són letals en els primers estadis del desenvolupament embrionari (veure Taula 1) i no són detectades clínicament. Les anomalies cromosòmiques s'originen durant la gametogènesi i, menys freqüentment, en etapes post-fecundació, donant lloc en aquest cas a anomalies cromosòmiques en mosaic. Per aquest motiu, per conèixer la freqüència real d'anomalies cromosòmiques en embrions, es necessari l'estudi citogenètic dels gàmetes.

### ***1.1.1. Anomalies cromosòmiques numèriques: aneuploïdia i poliploïdia***

#### Aneuploïdia

L'aneuploïdia consisteix en la pèrdua o guany d'un o més cromosomes, donant lloc sempre a un nombre de cromosomes diferent al nombre haploide normal ( $n=23$  cromosomes). En les cèl·lules somàtiques, el guany d'un cromosoma resulta en trisomia ( $2n+1$ ) i la pèrdua, en monosomia ( $2n-1$ ), mentre que en el cas dels gàmetes, el guany i la pèrdua d'un cromosoma donen lloc a disomia ( $n+1$ ) i nul·lisomia ( $n-1$ ), respectivament. L'aneuploïdia és l'anomalia cromosòmica numèrica més freqüent a l'espècie humana. S'estima que el 5% de tots els embarassos reconeguts són aneuploides (Hassold i Hunt 2001). Dintre de les aneuploïdies, les més freqüents són les trisomies, sobretot aquelles que afecten als cromosomes sexuals.

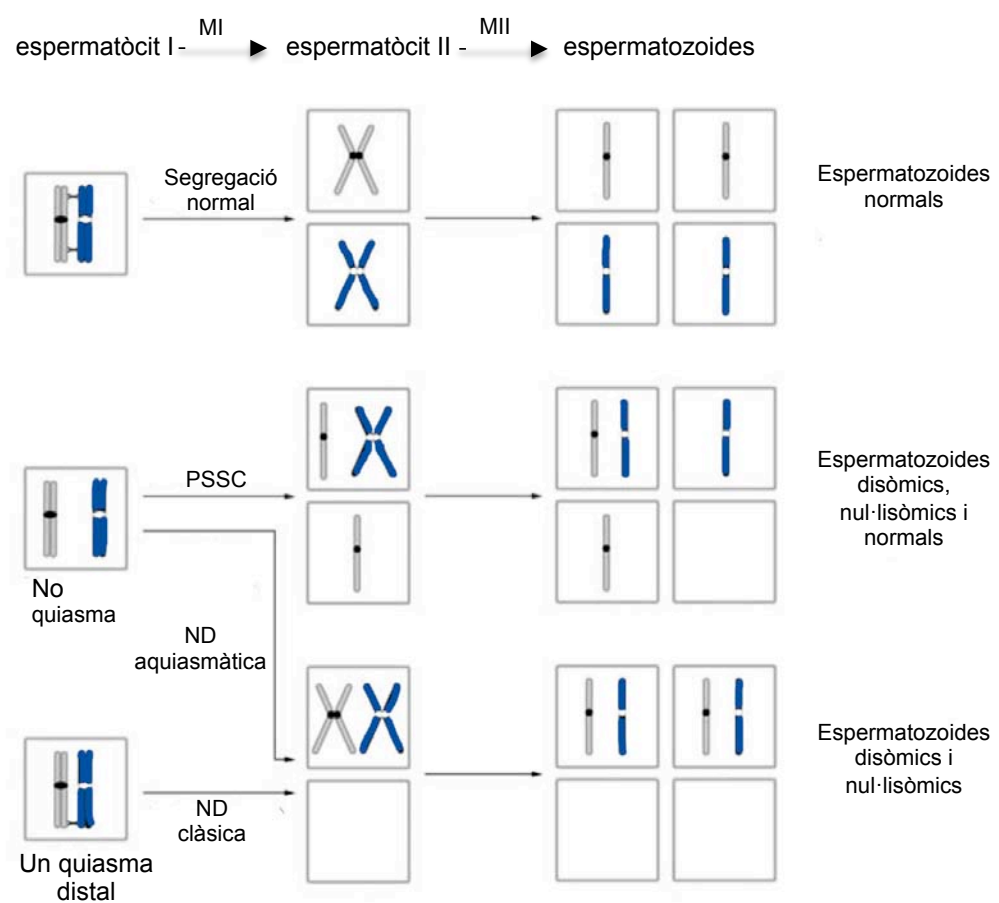
#### *Origen de l'aneuploïdia*

A la majoria dels casos, l'aneuploïdia s'origina *de novo* per errors en la segregació cromosòmica durant l'ovogènesi o l'espermatogènesi, en progenitors amb cariotip normal. La resta de casos, o s'hereten d'un progenitor portador (trisomies sexuals), o s'originen a la mitosi durant la embriogènesi, donant lloc a individus mosaics amb dues o més línies cel·lulars amb diferent cariotip.

Es coneixen dos tipus d'errors en la segregació cromosòmica que donen lloc a cèl·lules aneuploides: la pèrdua anafàsica i la no disjunció. La pèrdua anafàsica només origina cèl·lules somàtiques amb monosomia total o gàmetes amb nul·lisomia, mentre que la no disjunció produeix tots els tipus d'aneuploïdies, sent la principal causa d'aneuploïdia l'espècie humana (Márquez et al. 2000).

La no disjunció es caracteritza per la no separació dels cromosomes homòlegs (meiosi I) o cromàtides germanes (meiosi II), donant lloc a gàmetes nul·lisòmics (22 cromosomes) i disòmics (24 cromosomes) en proporció 1:1.

S'han descrit tres mecanismes principals de no disjunció a la meiosi I (revisat per Hassold i Hunt 2001; Uroz i Templado 2012) (Figura 1): la **no disjunció clàssica**,



**Figura 1.** Mecanismes principals de no disjunció durant la meiosi I masculina: Separació prematura de cromàtides (PSSC), no disjunció (ND) aquiasmàtica i no disjunció clàssica (Uroz i Templado 2012) (MI=meiosi I; MII=meiosi II)

on ambdós cromosomes homòlegs es dirigeixen al mateix pol cel·lular; la **no disjunció aquiasmàtica**, on es segreguen independentment els cromosomes homòlegs al mateix pol de forma aleatòria (probabilitat del 50%); i la **separació prematura de cromàtides** (PSSC) durant la segregació dels cromosomes

homòlegs, on un cromosoma i una de les dues cromàtides germanes del seu homòleg migren al mateix pol a metafase I.

Recentment, la anàlisi de SNPs (single nucleotide polymorphisms) d'oòcits i corpuscles polars descartats en tècniques de reproducció assistida, ha permès descriure un nou mecanisme de segregació cromosòmica anomenada **segregació cromosòmica inversa** (Ottolini et al. 2015). Segons aquest mecanisme, els dos cromosomes homòlegs separen les cromàtides germanes a la anafase I, a diferència del procés de PSSC, on únicament un dels dos cromosomes homòlegs separa les seves cromàtides. A més, aquests autors descriuen una segregació preferencial de les cromàtides no recombinants al segon corpuscle polar en meiosi II, per tant són eliminades de la línia germinal. Segon aquest estudi, els bivalents sense recombinació mai segueixen un patró de segregació normal, sinó que pateixen PSSC o segregació cromosòmica inversa (Ottolini et al. 2015).

Perquè la segregació cromosòmica es realitzi correctament, és imprescindible que durant la meiosi I tingui lloc, de forma efectiva, l'aparellament, sinapsi i recombinació dels cromosomes homòlegs, la pèrdua gradual de la cohesió entre cromàtides germanes i la coorientació dels centròmers (Brar i Amon 2008). A l'estadi de metafase I la presència dels quiasmes manté la tensió entre els cromosomes homòlegs, afavorint la correcta orientació dels bivalents a la placa metafàsica (Page et al. 2003). El nombre dels quiasmes s'ha associat àmpliament amb el procés de no disjunció. S'ha descrit una reducció del nombre de quiasmes en el cromosoma extra present en individus amb trisomia 21 (Warren et al. 1987), trisomia 16 (Hassold et al. 1991a), trisomia 18 (Fisher et al. 1995) i trisomies sexuals (Hassold et al. 1991b). Alguns autors han relacionat la localització dels quiasmes (distal o proximal) respecte al centròmer amb errors en la segregació meiótica dels cromosomes homòlegs (Lamb et al. 2005). Un quiasma molt pròxim al centròmer pot afavorir la separació prematura de cromàtides germanes en anafase I, ja que només es troben unides per cohesines en la regió centromèrica (revisat per Hassold et al. 2000; Sun et al. 2004). Per la seva part, un quiasma molt proper al telòmer pot resoldre's de manera prematura i donar lloc a no disjunció aquiasmàtica (revisat per McDougall et al. 2005).

En els últims anys, la cohesió cromosòmica ha adquirit un paper rellevant en el procés de la segregació cromosòmica durant la meiosi, ja que assegura la unió dels cromosomes homòlegs durant la profase I i de les cromàtides germanes fins

l'anafase II. A la meiosi I, les cromàtides germanes es mantenen unides gràcies als eixos de cohesines presents al llarg de tota la seva longitud (inclòs el centròmer), excepte en els llocs dels quiasmes (Koehler et al. 1996; Hodges et al. 2005; Nagaoka et al. 2012). Perquè la segregació del parell d'homòlegs es realitzi de forma efectiva és essencial l'eliminació gradual de les cohesines entre cromàtides germanes a l'anafase I i la pèrdua de les cohesines que resten als centròmers germans a l'anafase II (Nagaoka et al. 2012).

Estudis d'òcits de ratolins deficients en una cohesina específica de la meiosi (SMC1 $\beta$ ), van mostrar que la pèrdua de la cohesió prematura entre el parell d'homòlegs donava lloc a òcits aneuploides (Hodges et al. 2005) i que la deficiència en la cohesió entre cromàtides germanes originava aneuploïdia associada amb l'edat parental. Ottolini i col·laboradors (2015) mitjançant l'estudi de mapes de recombinació de diversos cromosomes en òcits humans, suggereixen la necessitat d'una localització correcta de la recombinació entre els cromosomes homòlegs per assegurar la pèrdua gradual de cohesió entre cromàtides germanes durant la meiosi.

Estudis meiòtics en espermatòcits de ratolins (Vrooman et al. 2014) van determinar que l'edat paterna incrementa els errors sinàptics en meiosi I dels cromosomes més petits i dels sexuals, probablement associada a una pèrdua prematura de cohesió cromosòmica més que a errors de recombinació.

Estudis *in vivo* en òcits humans han descrit que el procés de conformació de les fibres del fus acromàtic és molt lent (16 hores) comparat amb la mitosi (30 minuts) o la meiosi d'òcit de ratolí (3-5 hores) (Holubcová et al. 2015). Aquesta diferència en els temps de migració dels cromosomes homòlegs augmenta la possibilitat de retard d'alguns cromosomes durant l'anafase, donant lloc a l'aneuploïdia. Tot el que s'ha dit anteriorment obliga a reexaminar la relació entre recombinació, cohesió i segregació cromosòmica i posa de manifest la complexitat de l'origen de la aneuploïdia, no podent-se descartar que pugui tenir un origen heterogeni.

### Poliploïdia

La poliploïdia fa referència a la presència de més de dos complements haploides en cèl·lules somàtiques o més d'un complement en gàmetes. La poliploïdia es troba en el 1,5% dels embarassos reconeguts, 9,8% dels avortaments espontanis i el 0,6% de les morts perinatals (veure Taula 1). Aquesta anomalia es considera



letal, ja que els nounats que la presenten tenen un temps de supervivència molt curt (revisat per Kang i Rosenwaks 2008).

A l'espècie humana es coneixen dos tipus de poliploïdia: la triploïdia ( $3n=69$  cromosomes) i la tetraploïdia ( $4n=92$  cromosomes), sent la triploïdia el tipus més freqüent. L'origen més comú de la triploïdia és la fecundació d'un oòcit per dos espermatozoides (60% dels casos), procés conegut com dispèrmia. La resta de triploïdies s'originen per la fecundació de gàmetes diploides originades per errors en la meiosi masculina (36%) o femenina (26,2%), per la fusió d'oòcits (3,2%) o per errors en la mitosi postzigòtica (1,6%), la qual dona lloc a mosaics (Zaragoza et al. 2000).

### 1.1.2. Anomalies cromosòmiques estructurals

Les anomalies cromosòmiques estructurals poden ser equilibrades, sense pèrdua ni guany de material cromosòmic o desequilibrades, amb pèrdua o guany de material (Figura 2). Les anomalies estructurals equilibrades presenten normalment un fenotip normal, mentre que les anomalies desequilibrades estan associades a retard mental i malformacions. Les anomalies més freqüents són les translocacions recíproques en les equilibrades i els cromosomes marcadors en les desequilibrades (Taula 2).

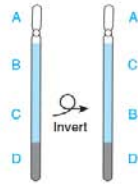
**Taula 2.** Incidència d'anomalies cromosòmiques estructurals equilibrades i desequilibrades en avortaments espontanis, nounats i a la població general <sup>a</sup>

Anomalies estructurals	Incidència d'anomalies estructurals		
	Avortaments espontanis	Nounats	Població general
<b>Equilibrades</b>			
Translocacions recíproques	1/625	1/1000	-
Translocacions Robertsonianes	1/1000	1/1000	-
Inversions	1/2500	1/5000	-
<b>Desequilibrades</b>			
Cromosomes marcadors	0	1/5000	1/2000
Delecions intersticials			1/4000
Duplicacions intersticials			1/4000
Delecions terminals			1/5000

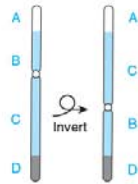
<sup>a</sup> revisat per Jacobs, 1981; Shaffer i Lupski, 2000

### Anomalies estructurals equilibrades

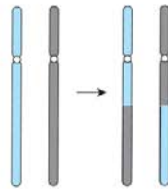
Inversió paracèntrica



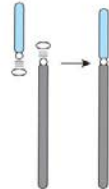
Inversió pericèntrica



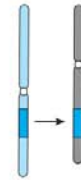
Translocació recíproca



Translocació Robertsoniana

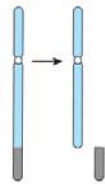


Inserció

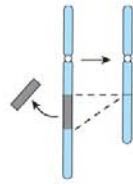


### Anomalies estructurals desequilibrades

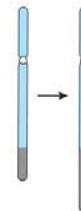
Deleció terminal



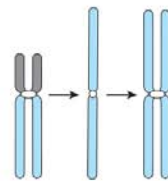
Deleció intersticial



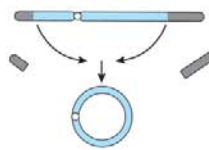
Duplicació



Isocromosoma



Cromosoma en anell



Cromosoma marcador



**Figura 2.** Anomalies cromosòmiques estructurals equilibrades i desequilibrades.

Les anomalies cromosòmiques estructurals són el resultat de trencaments de doble cadena (*double-strand breaks*, DSB) en el DNA seguit d'errors o absència de reparació del DNA, donant lloc a reorganitzacions estructurals i a la formació de fragments acèntrics que es perden en posteriors divisions cel·lulars.

Estudis dels punts de trencament d'anomalies estructurals, tant en espermatozoides com en limfòcits, demostren una distribució no a l'atzar dels punts de trencament del DNA. S'ha descrit una correlació positiva entre els punts de trencament de lesions cromosòmiques i els llocs fràgils en espermatozoides (Benet et al. 1989) i els punts de reorganitzacions cromosòmiques equilibrades *de novo* detectades en diagnòstic prenatal (Warburton 1991, revisat per Estop et al. 1991).

En els últims anys, estudis genòmics han aprofundit en l'origen d'anomalies estructurals que afecten a nivell gènic (Shaffer i Lupski 2000; revisat per Gu et al. 2008). Principalment, aquests estudis han descrit dos mecanismes que originen reorganitzacions estructurals:

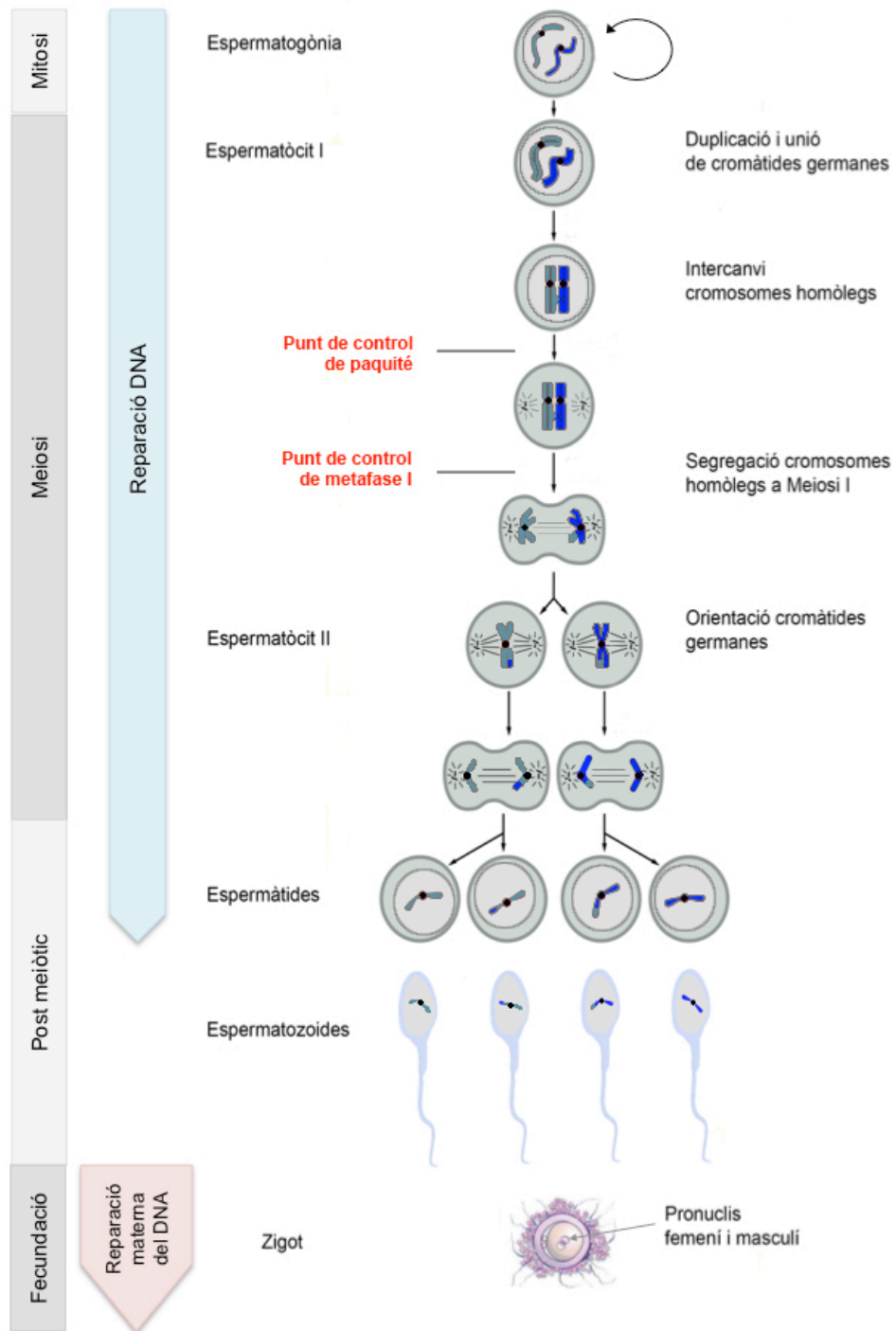
1. Recombinació homòloga no al·lèlica (NAHR, *nonallelic homologous recombination*) mitjançant l'aparellament de regions amb un alt grau d'homologia (LCR, *low-copy repeats*). Quan les dues seqüències LCR estan situades en el mateix cromosoma i en orientació directa, la recombinació entre aquestes regions homòlogues no al·lèliques provoca duplicació i deleció del fragment flanquejat per les dues LCRs. En canvi, quan la orientació de seqüències LCR és oposada, la recombinació resulta en la inversió del fragment flanquejat per aquestes seqüències. Si la NAHR es realitza entre les LCRs situades en diferents cromosomes pot generar anomalies estructurals intercromosòmiques. Aquest és el mecanisme més comú que dona lloc a reorganitzacions estructurals recurrents.
2. Unió d'extrems cromosòmics no homòlegs (NHEJ, *nonhomologous end joining*,) origina reorganitzacions estructurals no recurrents. Aquest model es basa en errors en els sistemes de reparació del DNA, els quals detecten DSB i modifiquen els extrems, fent-los compatibles per la seva unió posterior (revisat per Lieber 2010).

Aquests dos mecanismes podrien donar lloc a reorganitzacions a nivell cromosòmic (revisat per Kurahashi et al. 2009). No obstant, no està demostrat encara que els mecanismes que generen les alteracions gèniques siguin els mateixos que els que originen les anomalies cromosòmiques estructurals en l'espermatozoide.

### 1.1.3 Anomalies cromosòmiques durant l'espermatogènesi

Durant la meiosi, existeixen punts de control o checkpoints de la supervivència cel·lular que bloquegen o, fins i tot, eliminen les cèl·lules “amb errors”, reduint la freqüència de gàmetes anormals, incloent-hi les portadores d'anomalies cromosòmiques. Fins al moment, s'han descrit dos punts de control meiótics: el punt de control de paquitè (*Pachytene Checkpoint*) (Roeder 1997) i el punt de control de la metafase I (*Spindle Assembly Checkpoint*) (Burke 2000) (veure figura 3). El punt de control de paquitè fa el seguiment dels processos d'aparellament, sinapsi i recombinació meiótica, aturant el procés meiótic de les regions del DNA sense aparellar i les lesions en el DNA que no s'han reparat. El punt de control de la metafase assegura la correcta segregació cromosòmica durant la meiosi I i II (revisat per Malmanche et al. 2006), ja que controla errors generats durant la formació del fus i l'alineament dels cromosomes a la placa metafàsica. Aquest punt de control impedeix l'eliminació de cohesines fins que la tensió en el fus acromàtic és suficient com per assegurar la orientació correcta dels cromosomes. La meiosi continua quan aquest dos processos es realitzen correctament. Si no es repara l'error, s'indueix la cèl·lula a un procés d'apoptosi (revisat per Roeder i Bailis, 2000). A l'espècie humana, l'eficiència dels *checkpoints* meiótics és superior en la meiosi masculina que no pas en la meiosi femenina (revisat per Hunt i Hassold, 2002; Morelli i Cohen, 2005; Vrooman et al. 2014). Aquest fet podria explicar l'increment d'anomalies cromosòmiques en oòcits i el major origen matern de les trisomies. Estudis d'espermatòcits I i II en individus fèrtils realitzats pel nostre grup (Uroz i Templado 2012) han mostrat una freqüència d'aneuploidia conservativa en espermatòcits II (14%) similar a la observada en oòcits no inseminats de dones joves (13-19%) (Garcia-Cruz et al. 2010; Sandalinas et al. 2002). Aquests resultats suggereixen que les diferències entre l'aneuploidia materna i paterna no són causades per diferències en errors de segregació cromosòmica, sinó per la existència d'un possible punt de control postmeiótic en la espermatogènesi, no present en la ovogènesi.

L'alta contribució paterna en l'origen de les anomalies estructurals *de novo* pot ser deguda a l'elevat nombre de divisions de les espermatogònies al llarg de la vida reproductiva, juntament amb l'absència de mecanismes de reparació en estadis finals de l'espermatogènesi. Les espermatogònies d'un home amb 20 anys d'edat



**Figura 3.** Esquema de la espermatogènesi masculina, fecundació i formació del pronucli (adaptat de Alberts et al, 2015).

s'han dividit mitòticament 150 vegades i un home amb 50 anys ho han fet 850 vegades, amb un increment lineal de 23 divisions cel·lulars per any en individus adults (Crow, 2000).

La reparació del DNA durant la gametogènesi masculina és efectiva, però, a mesura que avança cap al final de l'espermioogènesi, l'habilitat per reparar les lesions en el DNA es redueix molt dràsticament. L'alt nivell de compactació de la cromatina en el nucli de la espermatòide i de l'espermatozoide, gràcies a la presència en la seva estructura de proteïnes denominades protamines, dificulta l'accés dels enzims de reparació al DNA (Sega et al. 1976; Marchetti i Wyrobek 2008). Les possibles lesions cromosòmiques generades en els diferents estadis de l'espermatogènesi, que no són reparades pels sistemes de reparació del DNA de l'espermatozoide, podrien ser reparades en l'estadi de zigot aprofitant els sistemes de reparació de l'òocit (Sega 1979; Balhorn 1982; revisat per Marchetti et al. 2015) (veure Figura 3).

## 1.2. Anàlisi citogenètic de l'espermatozoide humà

L'alt grau de condensació de la cromatina de l'espermatozoide, gràcies a les protamines, dificulta l'estudi del seu complement cromosòmic. Per estudiar els cromosomes de l'espermatozoide humà, s'han descrit dues tècniques que aconseguen la descondensació de la cromatina del cap dels espermatozoides: tècnica de fecundació *in vitro* hámster-humà i tècnica de FISH multicolor.

### 1.2.1. Fecundació *in vitro* hámster-humà

Va ser la primera tècnica que va possibilitar l'estudi dels cromosomes de l'espermatozoide humà (Martin et al. 1982; Rudak et al. 1978). Consisteix en la fusió d'oòcits de hámster amb espermatozoides humans capacitats *in vitro* amb bloqueig del procés a l'estadi de la primera metafase mitòtica del zigot format. En aquest moment, la cromatina dels espermatozoides es troba condensada en forma de cromosomes metafàsics, fent possible realitzar el seu cariotip i detectar anomalies cromosòmiques, tant numèriques com estructurals. Aquesta tècnica no permet distingir la nul·lisomia real de la causada per la pèrdua artefactual de cromosomes durant la preparació de les extensions. Per aquest motiu, els autors utilitzen l'aneuploidia conservativa (2xdisomia). Tampoc pot avaluar la diploidia que pot ser el resultat de polispèrmia, procés freqüent en aquesta tècnica, ja que l'oòcit, en el moment de la fecundació, està desproveït de la seva zona pel·lúcida i no bloqueja l'entrada d'espermatozoides (Martin et al. 1982).

Utilitzant el sistema hámster-humà, les sèries més grans realitzades en individus control (Brandriff et al. 1988; Estop et al. 1995; Martin et al. 1987; Templado et al. 1996) han establert que la freqüència d'aneuploidia conservativa en el espermatozoide és 1,8% i la d'anomalies estructurals 6,6% (Taula 3). Les anomalies estructurals més freqüentment observades en el cariotip de l'espermatozoide són, en ordre decreixent, trencaments de cromosoma, fragments acèntrics i delecions. Els cromosomes amb major freqüència de disomia difereix entre els autors: cromosoma 1 (Brandriff et al. 1990), 21 (Templado et al. 1996), 9 i sexuals (Martin i Rademaker 1990). Els cromosomes més afectats per anomalies estructurals són el 3, 5 i 9 (Brandriff et al. 1988) i els cromosomes 3, 9 i 17 (Estop et al. 1995). El cromosoma 9, analitzat en ambdós estudis, presenta una tendència als trencaments cromosòmics major a la esperada. Aquestes tres sèries (Brandriff et al. 1988; Estop et al. 1995; Martin et al. 1987) no tenen en compte les aberracions de tipus

cromàtide, ja que podrien ser produïdes per les condicions de cultiu en la tècnica hámster-humà.

**Taula 3.** Anomalies numèriques i estructurals en cariotips d'espermatozoide d'individus control obtinguts amb la tècnica de fecundació hámster-humà.

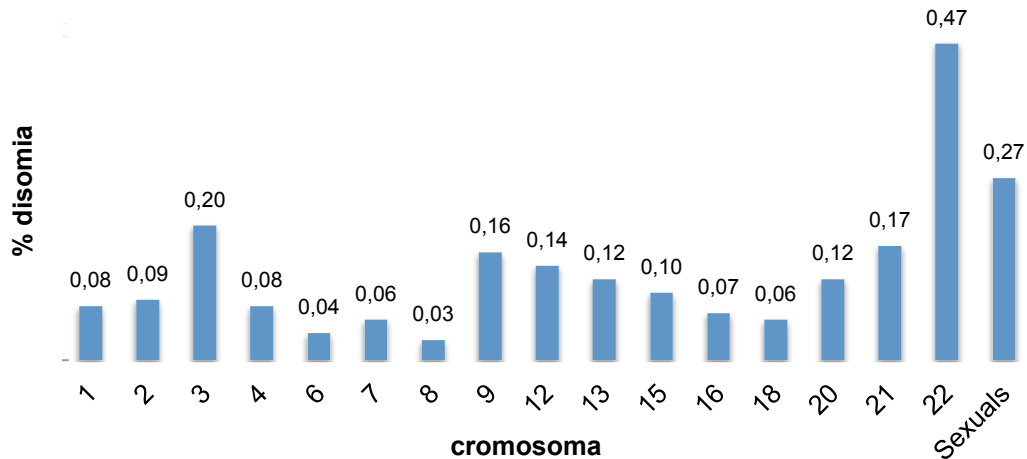
Estudi	Individus estudiats	Edat	Espermatozoides analitzats	% disomia total	% aneuploidia (2x disomia)	% anomalies estructurals
<b>Anomalies numèriques</b>						
Martin i Rademaker, 1990	98	-	6.821	0,7	1,4	-
Brandriff et al. 1990	24	-	5.997	1,0	2,0	-
Templado et al. 1996	24	18-44	3.446	1,7	3,3	-
<b>Mitjana</b>				<b>0,9</b>	<b>1,8</b>	
<b>Anomalies estructurals</b>						
Martin et al. 1987	30	22-55	1.582	-	-	5,3
Brandriff et al. 1988	20	19-65	5.000	-	-	6,4
Estop et al. 1995	19	18-40	2.389	-	-	8,7
<b>Mitjana</b>						<b>6,6</b>

### 1.2.2. Tècnica de FISH multicolor

La tècnica de FISH multicolor en nuclis descondensats d'espermatozoides, utilitzant 2 o 3 sondes de DNA de manera simultània (Martin et al. 1993; Williams et al. 1993), va significar un gran avanç respecte el sistema hámster-humà donat que permet l'anàlisi ràpida d'anomalies numèriques i estructurals en un número elevat d'espermatozoides. La majoria d'estudis de FISH multicolor en espermatozoides d'individus control només analitzen la disomia, ja que amb aquesta tècnica no es pot diferenciar la nul·lisomia causada per l'absència de la senyal, de la causada per la manca artefactual d'hibridació. Recentment, Templado i col·laboradors (2013) han revisat les freqüències de disomia en espermatozoides en sèries d'individus control, amb un total de 388 donants d'edat compreses entre 18-80 anys. Aquesta revisió només inclou les sèries que estudien un mínim de 5 donants i 10.000 espermatozoides analitzats per individu (Figura 4).



**Figura 4.** Percentatges de disomia per cromosoma en espermatozoides d'individus control analitzats amb la tècnica de FISH amb sondes <sup>a</sup>



<sup>a</sup> Només inclou sèries amb un mínim de 5 donants i 10000 espermatozoides analitzats per individu (Templado et al. 2013)

<sup>b</sup> Només reportada en un treball (Downie et al. 1997)

<sup>c</sup> Només 2 grups van estudiar la disomia del cromosoma 22, obtenint valors molt dispars: 1,21% (Martin i Rademaker 1999) i 0,06% (Soares et al. 2001)

Els autors, basant-se en els valors de disomia en 16 autosomes més els cromosomes sexuals, estimen que la disomia total en espermatozoide és de 2,3% i la d'aneuploïdia conservativa de 4,6%, més elevades que les determinades en cariotips d'espermatozoides obtinguts amb el sistema hàmmster-humà (0,9% i 1,8%, respectivament) (revisat per Templado et al. 2005). El percentatge mitjà de disomia per autosoma és aproximadament 0,1% (entre 0,03% pel cromosoma 8 i 0,47% pel cromosoma 22) i 0,27% pels cromosomes sexuals. Els cromosomes que presenten la freqüència de disomia més elevada són el 3, 21, 22 i sexuals, encara que la freqüència de disomia pel cromosoma 3 només s'ha reportat en una sèrie (Downie et al. 1997) i pel cromosoma 22 en dos sèries que aporten valors molt dispars: 1,21% (Martin i Rademaker 1999) i 0,06% (Soares et al. 2001). El increment de disomia 21 i cromosomes sexuals està confirmat per estudis meiòtics en espermatozoides d'individus fèrtils (Uroz i Templado 2012), on el parell de cromosomes homòlegs 21 i XY apareixien més freqüentment separats com univalents en metafase I i estaven implicats en disomia en metafase II amb més freqüència que la resta de parells cromosòmics. No hi han dades pels cromosomes 5, 10, 11, 14 17 i

19. Per determinar una freqüència més fiable de disomia total en caps d'espermatozoides seria necessari més estudis amb FISH.

La freqüència de diploïdia en espermatozoides analitzada mitjançant la tècnica de FISH, varia entre 0,01% i 0,38%, amb una mitjana de 0,19% (revisat per Templado et al. 2005), encara que són pocs els estudis que discuteixen les dades obtingudes de la diploïdia. Per poder discernir millor entre disomia i diploïdia, a l'hora de determinar la freqüència de diploïdia, s'aconsella utilitzar la tècnica de FISH amb 3 o més sondes que analitzin simultàniament 2 o més cromosomes (Bosch et al. 2001).

La tècnica de FISH en nuclis d'espermatozoides, utilitzant a la mateixa vegada sondes centromèriques i telomèriques per un mateix cromosoma, permet detectar anomalies estructurals en nuclis interfàsics d'espermatozoides (Van Hummelen et al. 1996). Fins al moment, la majoria d'estudis d'anomalies estructurals en caps d'espermatozoides amb la tècnica de FISH, s'han portat a terme en individus portadors de translocacions recíproques i Robertsonianes per estudiar la segregació dels cromosomes implicats en la translocacions. Únicament s'han analitzat les anomalies estructurals de dos cromosomes d'individus control: cromosoma 1 (Van Hummelen et al. 1996; McInnes et al. 1998; Baumgartner et al. 1999; Schmid et al. 2004; Slotter et al. 2000 i 2007) i 9 (Bosch et al. 2003). Si s'extrapola la freqüència de duplicacions i delecions obtingudes pel cromosoma 1 a la resta de cromosomes, la freqüència d'anomalies estructurals detectada amb FISH (1,4%) (Slotter et al. 2000) és inferior a la detectada amb la tècnica de hámster-humà (1,9%-14,5%) (Brandriff et al. 1988). Aquesta diferència pot ser deguda, en part, a que la tècnica de FISH en nuclis interfàsics detecta únicament les anomalies desequilibrades, a diferència de la tècnica de hámster-humà que detecta tant les anomalies desequilibrades com les equilibrades i a que el sistema hámster-humà pot induir algunes anomalies, degut a les condicions de cultiu d'aquesta tècnica (Brandriff et al. 1988; Estop et al. 1995; Martin et al. 1987).

### 1.3. Origen patern de les anomalies cromosòmiques

#### 1.3.1. Origen patern de l'aneuploidia

L'origen parental de les aneuploidies, analitzades mitjançant polimorfismes de DNA en avortaments i en nounats (Hassold et al. 2007) es representa a la taula 4. El 90% de les trisomies autosòmiques s'originen durant la meiosi materna, mentre que la resta dels

**Taula 4.** Origen parental i postzigòtic de l'aneuploidia a l'espècie humana <sup>a</sup>

Trisomia	Nº individus	% Origen meiòtic matern	% Origen meiòtic patern	% Origen postzigòtic
2	18	66,6	27,8	5,6
7	14	42,9	0,0	57,1
8	12	50,0	0,0	50,0
13	74	90,5	8,1	1,4
14	26	63,6	19,2	7,7
15	34	85,3	14,7	0,0
16	104	100,0	0,0	0,0
18	150	92,0	0,0	8,0
21	782	93,3	4,0	2,7
22	130	96,4	1,8	1,8
XXX	46	80,4	0,0	19,6
XXY	224	40,6	50,9	8,5
XYY	19	0,0	84,2	15,8
45,X	93	25,8	74,2	-

<sup>a</sup> Adaptat de Hall et al. 2006, 2007; Zaragoza et al. 1998, 2000; Page i Shaffer, 1997

casos són d'origen patern. Les trisomies autosòmiques amb un major percentatge d'origen patern són les que afecten al cromosoma 2 (Zaragoza et al. 1998) i als cromosomes acrocèntrics, sobretot el 14 i 15 (revisat per Hassold et al. 2007). En el cas de les trisomies dels cromosomes sexuals, el 50% dels casos amb trisomia 47,XXY i el 100% dels homes 47, XYY són d'origen patern. En canvi, el 90% dels casos de les dones 47,XXX són d'origen matern. En el 70-80% dels pacients amb la síndrome de Turner, la pèrdua del cromosoma sexual és d'origen patern (Jacobs et al. 1997; Martínez-Pasarell et al. 1999). Recentment, s'ha proposat que totes les dones amb cariotip 45,X són mosaics amb una línia cel·lular normal no detectada en els teixits estudiats (revisat per Hook i Warburton 2014).

L'estudi dels polimorfismes de DNA, a part de determinar l'origen parental de les anomalies numèriques, també s'utilitza per conèixer l'estadi meiòtic on es produeixen les aneuploïdies (Abruzzo i Hassold 1995; Hassold 1998): les trisomies d'origen matern es generen majoritàriament per errors en la meiosi I, mentre que les trisomies d'origen patern ho fan més freqüentment per errors en la meiosi II. Aquestes diferències parentals en l'origen de les trisomies podrien indicar diferents mecanismes de no disjunció en cada sexe (Abruzzo i Hassold 1995) o diferents punts de control durant la gametogènesi (Uroz i Templado 2012).

### ***1.3.2. Origen patern de les anomalies cromosòmiques estructurals***

L'estudi d'heteromorfismes cromosòmics va posar de manifest que el 84% de les anomalies estructurals *de novo* s'originen durant la gametogènesi paterna (Olson i Magenis 1988; Thomas et al. 2006). Estudis més recents (Page i Shaffer 1997; Thomas et al. 2006, 2010) descriuen un origen patern de les anomalies estructurals que varia entre 6,7% i 93,3%, depenent del tipus d'anomalia estructural (Taula 5). Les anomalies estructurals desequilibrades d'origen patern més freqüents són les delecions intersticials (84%). En el cas de les translocacions equilibrades *de novo*, el 96,6% de les translocacions recíproques són d'origen patern, arribant al 100% en el cas de la translocació t(11;22) (Thomas et al. 2010). No obstant, el 3,3% de les translocacions Robertsonianes són d'origen matern (Page i Shaffer 1997).

**Taula 5.** Origen parental de les anomalies estructurals *de novo* a l'espècie humana<sup>a</sup>

Anomalies estructurals	Número Anomalies detectades	Origen patern (%)	Origen matern (%)
Translocacions recíproques equilibrades	10	96,6	3,4
Delecions intersticials	44	84,0	16,0
Delecions terminals	39	69,0	31,0
Translocacions desequilibrades	21	62,0	38,0
Duplicacions	12	58,0	42,0
Translocacions Robertsonianes	15	6,7	93,3

<sup>a</sup> Adaptat de Thomas et al. 2006, 2010; Page i Shaffer 1997

#### 1.4. Estudis citogenètics en individus d'edat avançada

L'augment de les expectatives de vida, factors socioeconòmics i la incorporació de la dona al món laboral, ha suposat el retard en la paternitat en la majoria de parelles. A més, l'avanç en les tecnologies de reproducció assistida fa que parelles d'edat avançada que anteriorment no podien tenir fills, tinguin la possibilitat de tenir descendència. Tot això, explica l'especial interès en conèixer si l'augment de l'edat paterna és un factor de risc en l'aparició de anomalies cromosòmiques a la descendència.

L'edat paterna s'ha relacionat amb problemes de fertilitat i d'avortaments espontanis (Kushnir i Frattarelli 2009; Neusser et al. 2015), amb canvis en la funció reproductiva masculina (Sartorius i Nieschlag 2010), malalties monogèniques (Bray et al. 2006), inclús amb patologies com l'autisme (Croen et al. 2007) i trastorns psiquiàtrics (D'Onofrio et al. 2014). No obstant, l'efecte de l'edat paterna sobre la freqüència d'anomalies cromosòmiques en l'espermatozoide encara no està ben establerta, donat que els resultats obtinguts fins el moment, són escassos i controvertits, tant per les anomalies numèriques com per les estructurals.

##### 1.4.1. Aneuploidia i edat paterna

Fins al moment, l'edat materna és l'únic factor de risc conegut en l'etiologia de l'aneuploidia en humans (revisat per Hassold i Hunt 2001 i per Nagaoka et al. 2012). Per determinar si l'edat paterna és un factor de risc per l'aneuploidia, s'han dut a terme estudis epidemiològics en famílies i estudis citogenètics en l'espermatozoide humà.

##### *Estudis epidemiològics*

Els estudis epidemiològics presenten la limitació de que un possible efecte de l'edat paterna es pot confondre amb l'efecte de l'edat materna, donat que l'edat en la majoria de les parelles acostuma a ser similar.

Estudis en fetus o fills amb trisomies 13, 16, 18 i 21 no detecten cap efecte de l'edat paterna en la incidència d'aquestes síndromes (revisat per Fonseka i Griffin 2011). Recentment, s'ha descrit una correlació negativa entre l'edat paterna i descendència aneuploide. Parelles molt joves tenen una probabilitat dues vegades major de tenir descendència afectada amb trisomia 21 (Steiner et al. 2015).

En el cas dels cromosomes sexuals, els resultats obtinguts en relació amb l'edat són més controvertits. No s'ha determinat cap relació entre l'increment de l'edat paterna i les trisomies XXX o XYY (Sloter et al. 2004). En quant a la trisomia XXY hi ha autors que determinen que l'edat paterna avançada incrementa el risc de tenir descendència o avortaments amb cariotip 47,XXY, mentre que altres autors no observen aquesta relació (Lorda-Sanchez et al. 1992; De Souza i Morris 2010).

#### *Estudis en l'espermatozoide*

Els estudis citogenètics en el espermatozoide permeten separar l'efecte de l'edat paterna i materna en l'aneuploïdia, ja sigui mitjançant la fecundació heteròloga hámster-humà o la tècnica de FISH.

Només dos treballs han estudiat l'efecte de l'edat paterna en la freqüència d'anomalies cromosòmiques en sèries d'edat amb la tècnica de hámster-humà (Taula 6). Un d'ells va descriure un increment de disomia amb l'edat quan compara

**Taula 6.** Efecte de l'edat paterna en la freqüència de disomia analitzada en cariotips de espermatozoides d'individus de la població a

Autors	Nombre donants	Rang edat (anys)	Efecte edat paterna	Valor p
Martin i Rademaker, 1987	30	22-55	Si, correlació negativa	p<0,01
Prestes Sartorelli et al. 2001	12	23-74	Si	p=0,02

<sup>a</sup> Només estan representades sèries que inclouen donants amb edat superior a 50 anys

un grup de donants d'edat avançada (59-74 anys) amb un altre de més joves (23-39 anys) (Prestes Sartorelli et al. 2001). En canvi, els altres autors van observar una correlació negativa de l'aneuploïdia amb l'edat (Martin i Rademaker 1987).

Els estudis de FISH en caps d'espermatozoides, al igual que els del cariotip de l'espermatozoide, han aportar resultats controvertits sobre l'efecte de l'edat paterna en la freqüència de disomia (Taula 7). Pel cromosoma 1, un dels autosomes analitzats en més treballs, la majoria dels autors (Guttenbach et al. 2000; McInnes et al. 1998; Slotter et al. 2007) no observen cap efecte de l'edat sobre la disomia

d'aquest cromosoma. Únicament Martin i col·laboradors (1995) descriuen un increment de disomia 1 amb l'edat en espermatozoides d'una sèrie de 10 individus de 21-52 anys. No obstant, aquest increment de disomia podria ser degut a la utilització d'una sonda per la regió heterocromàtica 1q12 que té tendència a trencar-se en caps d'espermatozoides (Schmid et al. 2004; Slotter et al. 2000).

El cromosoma 9 només s'ha analitzat en dos treballs. En un d'ells (Luetjens et al. 2002) no va observar cap augment de disomia associada a l'edat, mentre que en l'altre es descriu un increment lineal de disomia 9 amb l'edat paterna (Bosch et al. 2003). Pel que fa referència al cromosoma 21, només un treball (Rousseaux et al. 1998) va descriure un increment de la freqüència de disomia 21 amb l'edat. En canvi, altres autors (Bosch et al. 2001; McInnes et al. 1998) no detecten cap increment de disomia 21 associada a l'edat. No s'han observat evidències d'augment de disomia amb l'edat pels cromosomes 8 (Robbins et al. 1995), 12 (Martin et al. 1995), 13 (McInnes et al. 1998; Shi i Martin 2000), 14 (Rousseaux et al. 1998), 17 (Guttenbach et al. 1994, 2000) i 18 (Robbins et al. 1997).

Els resultats de l'anàlisi de disomia dels cromosomes sexuals amb la tècnica de FISH són encara més discrepants que els obtinguts pels autosomes (veure Taula 7) (revisat per Fonseka i Griffin 2011). S'ha determinat un lleuger increment amb l'edat paterna de la freqüència de disomia XX (Griffin et al. 1995; Robbins et al. 1997), YY (Griffin et al. 1995; Martin et al. 1995) i XY (Griffin et al. 1995). Alguns autors descriuen una tendència a l'increment de disomia XY amb l'edat paterna, però sense arribar a la significació (Guttenbach et al. 2000; Bosch et al. 2001). Altres estudis no van observar cap increment de disomia pels cromosomes sexuals (Kinakin et al. 1997; Luetjens et al. 2002; Bosch et al. 2003).

D'acord amb la majoria d'estudis de FISH realitzats en espermatozoide, l'anàlisi meiótic de ratolins de diferents edats (Vrooman et al. 2014), no va detectar un augment d'aneuploïdia en espermatòcits II en relació a l'edat. Segons aquest treball, l'increment de l'edat paterna afectaria a l'aparellament, sinapsi i recombinació dels cromosomes homòlegs, però no a la freqüència d'aneuploïdia. La freqüència d'aneuploïdia estaria més relacionada amb la pèrdua prematura de cohesió amb l'edat que a errors de la recombinació.



**Taula 7.** Efecte de l'edat paterna en la freqüència de disomia en espermatozoides d'individus de la població en estudis de FISH <sup>a</sup>.

Autors	Cromosoma analitzat	Nombre donants	Rang edat (anys)	Nombre espermatozoides analitzats	Efecte edat paterna	Valor p
Martin et al. 1995	<b>1</b>	10	21-52	225,846	Si	p=0,01
McInnes et al. 1998		18	23-58	360,000	No	-
Guttenbach et al. 2000		3	>80	12,000	No	-
Sloter et al. 2007		10	22-80	100,000	No	-
Bosch et al. 2001	<b>6</b>	18	24-74	190,024	No	-
Robbins et al. 1995	<b>8</b>	14	22-59	205,218	No	-
Luetjens et al. 2002	<b>9</b>	23	<30 i >60	190,117	No	-
Bosch et al. 2003		18	24-74	335,665	Si	p<0,0001
Martin et al. 1995	<b>12</b>	10	21-52	225,846	No	-
McInnes et al. 1998	<b>13</b>	18	23-58	360,000	No	-
Rousseaux et al. 1998	<b>14</b>	11	<30 i >60	110,000	No	-
Griffin et al. 1995	18	24	18-60	390,096	No	-
Luetjens et al. 2002		23	<30 i >60	335,665	No	-
Rousseaux et al. 1998	<b>21</b>	11	<30 i >60	110,000	Sí	p=0,001
McInnes et al. 1998		18	23-58	360,000	No	-
Bosch et al. 2001		18	24-74	194,024	No	-
Griffin et al. 1995	<b>XX</b>	24	18-60	390,096	Sí	p=0,02
Martin et al. 1995		10	21-52	225,846	No	-
Kinakin et al. 1997		18	23-58	181,556	No	-
Luetjens et al. 2002		23	<30 i >60	184,000	No	-
Griffin et al. 1995	<b>XY</b>	24	18-60	390,096	Sí	p=0,007
Martin et al. 1995		10	21-52	225,846	No	-
Robbins et al. 1995		14	22-59	205,218	No	-
Guttenbach et al. 2000		3	>80	12,000	No	-
Bosch et al. 2001		18	24-74	194,094	No	-
Martin et al. 1995	<b>YY</b>	10	21-52	225,846	Sí	p=0,04
Griffin et al. 1995		24	18-60	390,096	Sí	p=0,06
Bosch et al. 2003		18	24-74	190,117	No	-

<sup>a</sup> Només estan representades sèries que inclouen donants amb edat superior a 50 anys

### 1.4.2. Diploïdia i edat paterna

Gràcies a l'ús de la tècnica de FISH amb dos o més sondes, es pot diferenciar entre un espermatozoide disòmic i un diploide. No obstant això, els treballs que estudien la freqüència de diploïdia en espermatozoides d'individus d'edat avançada són escassos i aporten resultats dispars (Taula 8).

**Taula 8.** Efecte de la edat paterna en la freqüència de diploïdia en espermatozoides d'individus de la població analitzats amb la tècnica de FISH <sup>a</sup>

Autors	Nombre donants	Rang edat (anys)	Efecte edat paterna	Valor p
Rousseaux et al. 1998	11	<30 i >60	Sí	p=0,001
Bosch et al. 2001, 2003	18	24-74	Sí	p=0,002
Robbins et al. 1995	14	22-59	Sí <sup>b</sup>	p=0,006 <sup>b</sup>
Martin et al. 1995	10	21-52	No	-
Griffin et al. 1995	24	18-60	No	-
Guttenbach et al. 2000	3	>80	No	-
Luetjens et al. 2002	23	<30 i >60	No	-

<sup>a</sup> Només estan representades sèries que inclouen donants amb edat superior a 50 anys

<sup>b</sup> Correlació negativa

Quatre dels treballs en individus control no troben cap correlació entre la freqüència de diploïdia i l'edat del donant (Griffin et al. 1995; Martin et al. 1995; Guttenbach et al. 2000; Luetjens et al. 2002). Bosch i col·laboradors (2001, 2003) van descriure un increment lineal de la freqüència de diploïdia amb l'edat paterna utilitzant la tècnica de FISH amb 4 sondes en una sèrie d'individus seleccionats per la seva edat (24-74 anys). Aquest increment amb l'edat paterna també ha estat observat en un estudi amb individus menors de 30 anys i majors de 60 anys (Rousseaux et al. 1998). Per contra, Robbins i col·laboradors (1995) van observar una correlació negativa entre l'edat i la incidència de diploïdia, amb una disminució del percentatge de diploïdia amb l'edat paterna en individus amb edats compreses entre 22 i 59 anys.

### 1.4.3. Anomalies estructurals i edat paterna

La relació entre anomalies estructurals i edat paterna s'han dut a terme mitjançant les tècniques del sistema hàmbster-humà i FISH amb sondes multicolor (Taula 9).

**Taula 9.** Efecte de l'edat en les anomalies estructurals en espermatozoides d'individus control utilitzant les tècniques de fecundació hàmbster-humà i FISH <sup>a</sup>

Autors	Nombre donants	Rang edat (anys)	Efecte edat paterna	Valor p	Tipus anomalies incrementades amb l'edat
<b>Tècnica hàmbster-humà</b>					
Martin i Rademaker, 1987	30	22-55	Si	p<0,001	Increment trencaments cromosòmics
Brandriff et al. 1988 <sup>b</sup>	20	19-65			Increment anomalies estructurals <sup>b</sup>
Prestes-Sartorelli et al. 2001	12	23-74	Si	p<0,011	Increment fragments acèntrics i figures radials complexes
<b>Tècnica FISH</b>					
McInnes et al. 1988	18	20 a >45	Si	p<0,05	Increment fragments acèntrics cromosoma 1
Bosch et al. 2003	18	24-74	Si	p<0,002	Increment del i dup cromosoma 9
Sloter et al. 2007	10	22-80	Si	p<0,001	increment del i dup cromosoma 1

<sup>a</sup> Només estan representades sèries que inclouen donants amb edat superior a 50 anys.

<sup>b</sup> No calcula la correlació entre l'edat i la freqüència d'anomalies estructurals, però els dos individus més grans de la seva sèrie (49 i 65 anys) presentaven la major incidència d'anomalies estructurals. del, delecions; dup, duplicacions

La majoria d'estudis en cariotips d'espermatozoide troben una associació entre l'edat paterna i l'increment de trencaments cromosòmics i fragments acèntrics.

Amb la tècnica de FISH, utilitzant de manera simultània sondes centromèriques i telomèriques per un mateix cromosoma, només s'han estudiat els cromosomes 1 i 9 en caps d'espermatozoide en relació amb l'edat (McInnes et al. 1998; Bosch et al. 2003; Sloter et al. 2007). Pel cromosoma 1 s'ha descrit un increment significatiu amb l'edat paterna de fragments acèntrics (McInnes et al. 1998), duplicacions i delecions

(Sloter et al. 2007). Bosch i col·laboradors (2003) van observar una tendència lineal amb l'edat en duplicacions i delecions del cromosoma 9.

Els resultats en sèries d'edat analitzades amb FISH són encara molt escassos per determinar amb precisió l'efecte de l'edat paterna en la freqüència d'anomalies estructurals, ni per determinar quins cromosomes estan més implicats en aquestes anomalies.



### **1.5. Objectius**

Estudis previs sobre l'efecte de l'edat paterna en les anomalies cromosòmiques presents en el cariotip i nucli interfàsic de l'espermatozoide humà, realitzats pel nostre grup i altres grups, van aportar resultats contradictoris. Per aquest motiu, ens vam proposar utilitzar la tècnica de FISH amb un nou panel de sondes subtelomèriques per estudiar l'efecte de l'edat paterna en la freqüència d'anomalies cromosòmiques numèriques i estructurals en espermatozoides d'individus de la població, separats en dos grups d'edat: menors de 40 i majors de 60 anys.

Aquest objectiu principal comprèn els següents objectius concrets:

1. Establir la freqüència d'anomalies cromosòmiques numèriques i estructurals per individu i per cromosoma
2. Determinar si hi ha diferències en la freqüència d'anomalies cromosòmiques numèriques i estructurals entre ambdós grups d'edat









1. Introducció

## **2. Material i Mètodes**

3. Resultats

4. Discussió

5. Conclusions

6. Bibliografia



## 2.1 Material biològic

En el present treball s'han analitzat espermatozoides procedents de mostres de semen de 10 individus d'edat compreses entre 23 i 74 anys, dividits en dos grups d'edat: un grup menor de 40 anys (<40 anys) i un altre major o igual a 60 anys ( $\geq 60$  anys). Cap dels 10 donants tenia historial conegut d'exposició a mutàgens, clastògens o drogues, i sis d'ells eren de fertilitat provada (Taula 10). Els individus C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C9 i C10 van analitzar-se prèviament per a l'estudi de la disomia dels cromosomes 6, 9, 21, X i Y i de les anomalies estructurals del cromosoma 9 (Bosch et al. 2001 i 2003). La obtenció de la mostra de semen es va realitzar mitjançant masturbació, després d'un període d'abstinència de 3 a 5 dies. Tots els donants que van facilitar les mostres al Servei d'Andrologia de la Fundació Puigvert de Barcelona van ser informats de l'estudi, donant el seu posterior consentiment per escrit.

Aquest estudi va ser aprovat pel Comitè d'experimentació animal i humana de la Universitat Autònoma de Barcelona i el Comitè d'Ètica de la Fundació Puigvert.

**Taula 10.** Edat, fertilitat i hàbit de fumar dels 10 individus analitzats en el present estudi.

	Grup d'edat <40 anys					Grup d'edat $\geq 60$ anys				
	C8	C3	C4	C9	C5	C7	C10	C2	C6	C1
<b>Edat</b>	23	24	25	30	37	60	62	64	72	74
<b>Fertilitat</b>	-	-	-	Si	-	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Fumador</b>	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	No

## 2.2. Congelació de mostres

La mostra de semen es barreja homogeneïtzant-se mitjançant una agitació suau amb medi de criopreservació (Yavetz et al. 1991) en proporció 1:1. Posteriorment, es reparteix en tubs de crioconservació de 1 ml, els quals romanen en un contenidor de congelació (Nalgene Cryo 1°C) a  $-80^{\circ}\text{C}$ , un mínim de 4 hores. Durant aquest temps s'ha aconseguit una congelació progressiva de la mostra que

permet transferir-la a un contenidor de nitrogen líquid (-196°C), fins el moment del seu processament.

### **2.3. Extensió d'espermatozoides**

Per la obtenció de les extensions d'espermatozoides s'ha utilitzat el protocol ja descrit anteriorment pel nostre grup (Bosch i col, 2001). Breument, la mostra de semen, una vegada descongelada, es distribueix en dos tubs de centrifuga i es sotmet a un tractament amb solució hipotònica (KCl 0,075M) per augmentar el volum cel·lular i afavorir l'extensió de la cromatina dintre del nucli de l'espermatozoide. Després de 15 minuts de tractament hipotònic, a temperatura ambient, es centrifuga 5 minuts a 600g. Es descarta el sobrenedant del tub de centrifuga per decantació i el botó cel·lular resultant es resuspèn en solució fixadora de Carnoy (3 metanol: 1 àcid acètic). El primer rentat es realitza deixant caure gota a gota el fixador, sempre en agitació continua en un vòrtex i es centrifuga 5 minuts a 600g. Es repeteix aquest rentat amb Carnoy tantes vegades com es consideri oportú, fins obtenir un botó cel·lular nítid (normalment dos o tres rentats). Finalitzats els rentats, es decanta el sobrenedant i es resuspèn el botó cel·lular en 0,5 ml de fixador acabat de fer. Es deixen caure ben separades, dues o tres gotes d'aquesta suspensió sobre un portaobjectes, prèviament desgreixat en alcohol, deixant assecar a temperatura ambient.

Aquestes extensions d'espermatozoides es preserven a -20°C, fins el moment de realitzar els tractaments previs a la hibridació del DNA.

### **2.4. Tractaments previs a la hibridació del DNA**

#### *Tractament enzimàtic de les extensions*

Abans de la hibridació, les extensions d'espermatozoides es tracten amb una solució de pepsina al 0,005% en 0,01N HCl a 37°C, durant 7 minuts, per eliminar les restes de citoplasma que podrien interferir en el procés d'hibridació. Es renten en una solució de 2xSSC durant 3 minuts en agitació i es deshidraten en sèrie d'etanols (70%, 85%, 100%, 1 minut cadascun). El temps de tractament amb

pepsina es controla sota un microscopi òptic de contrast de fases, fins aconseguir eliminar de les preparacions les restes de material citoplasmàtic.

### *Descondensació de la cromatina dels nuclis dels espermatozoides*

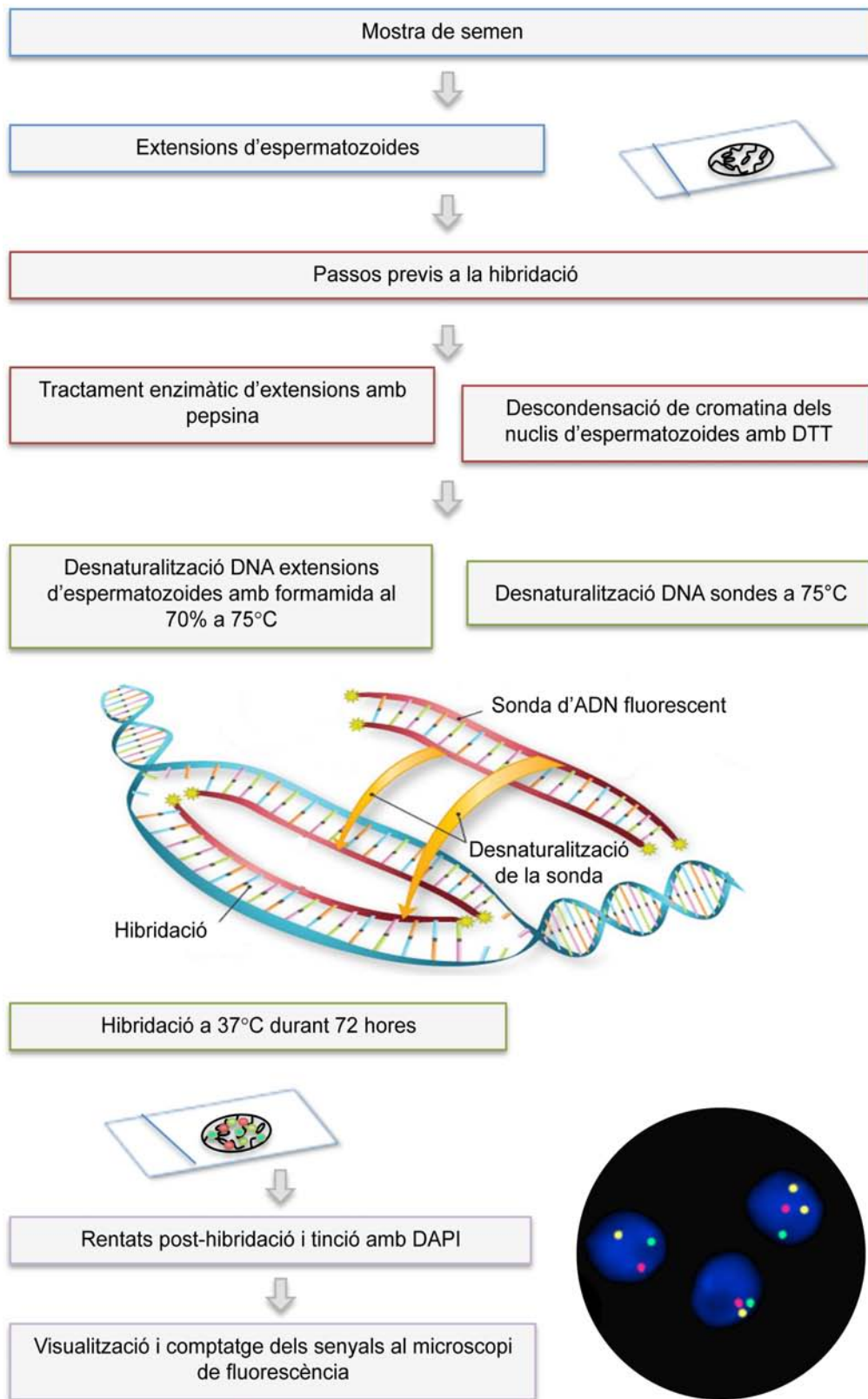
L'elevat nivell de compactació de la cromatina en el nucli de l'espermatozoide dificulta l'accés de les sondes durant la hibridació. Per reduir aquest alt nivell de compactació s'utilitza una solució de DTT (5mM dithiotreitol, 0,1M Tris, 0,1% Triton X-100, a pH 7,4) que permet descondensar la cromatina dels caps dels espermatozoides, trencant el punts disulfurs de les protamines.

Abans del tractament amb DTT, per tal d'eliminar les restes de fixador de les preparacions d'espermatozoides, es submergeixen en solució salina de 2xSSC durant 3 minuts, es deshidraten en banys successius d'etanol (70%, 90% i 100%, 2 minuts cadascun) i s'assequen a temperatura ambient. Posteriorment, es submergeixen en una solució de DTT (prèviament escalfat a 37°C) durant 15-35 minuts. Per eliminar les restes de DTT, els portaobjectes es col·loquen en solució salina (2xSSC) en agitació durant 3 minuts i es deshidraten en banys successius d'etanol (70%, 90% i 100%, 2 minuts cadascun), eixugant-se a temperatura ambient. El temps d'incubació en DTT varia segons l'envelliment de la mostra i la mida de la sonda. El nivell de descondensació de la cromatina dels caps dels espermatozoides es controla sota el microscopi de contrast de fases.

## **2.5. Protocol de la tècnica de FISH amb sondes subtelomèriques**

El protocol de la tècnica de FISH en nuclis descondensats d'espermatozoides aplicada en aquest treball és el descrit pel nostre grup (Bosch i col, 2001), seguint les recomanacions de la casa comercial (Vysis TotalVysion, Inc) per adaptar-lo al tipus de mostra i de sondes utilitzades (Figura 5).

Per desnaturalitzar la cromatina, els portaobjectes es tracten amb una solució de formamida al 70% en 20xSSC (pH=7,0) a 75°C, durant 5 minuts, es renten en banys successius d'etanol (70%, 85% i 100%, 1 minut cadascun) i es deixen assecar a temperatura ambient. Mentrestant, es desnaturalitza la barreja de sondes, dispensant 3 µL de cada alíquota en un tub esplendor a 75°C, durant 5 minuts. Es dipositen les sondes, ja desnaturalitzades, a sobre de la regió del portaobjectes que volem hibridar. Es col·loca un cobreobjectes de 20mmx20mm i



**Figura 5.** Protocol de la tècnica de FISH amb el panel de sondes subtelomèriques *ToTelVysion* en nuclis d'espermatozoides.

es segella amb cola (Paniker). Es deixa hibridant a 37°C en una cambra humida durant 72 hores, per assegurar la hibridació de les sondes amb les seqüències específiques del DNA del nucli de l'espermatozoide.

### **Tractament post-hibridació**

Passat el temps d'hibridació, les extensions d'espermatozoides es renten primer amb solució salina (1xSSC) a 75°C durant 2 minuts i després amb solució detergent (Tween-20 0,1%/ 2xSSC) a temperatura ambient durant 1 minut, per eliminar les sondes que no han hibridat. Es retira el cobreobjectes i la pasta selladora amb l'ajuda d'unes pinces. Es submergeixen les preparacions en solució salina 1XSSC a 75°C, durant 2 minuts, seguit d'un minut en agitació a temperatura ambient en solució detergent. Es deshidraten en banys successius d'etanol (70%, 90% i 100%, 2 minuts cadascun).

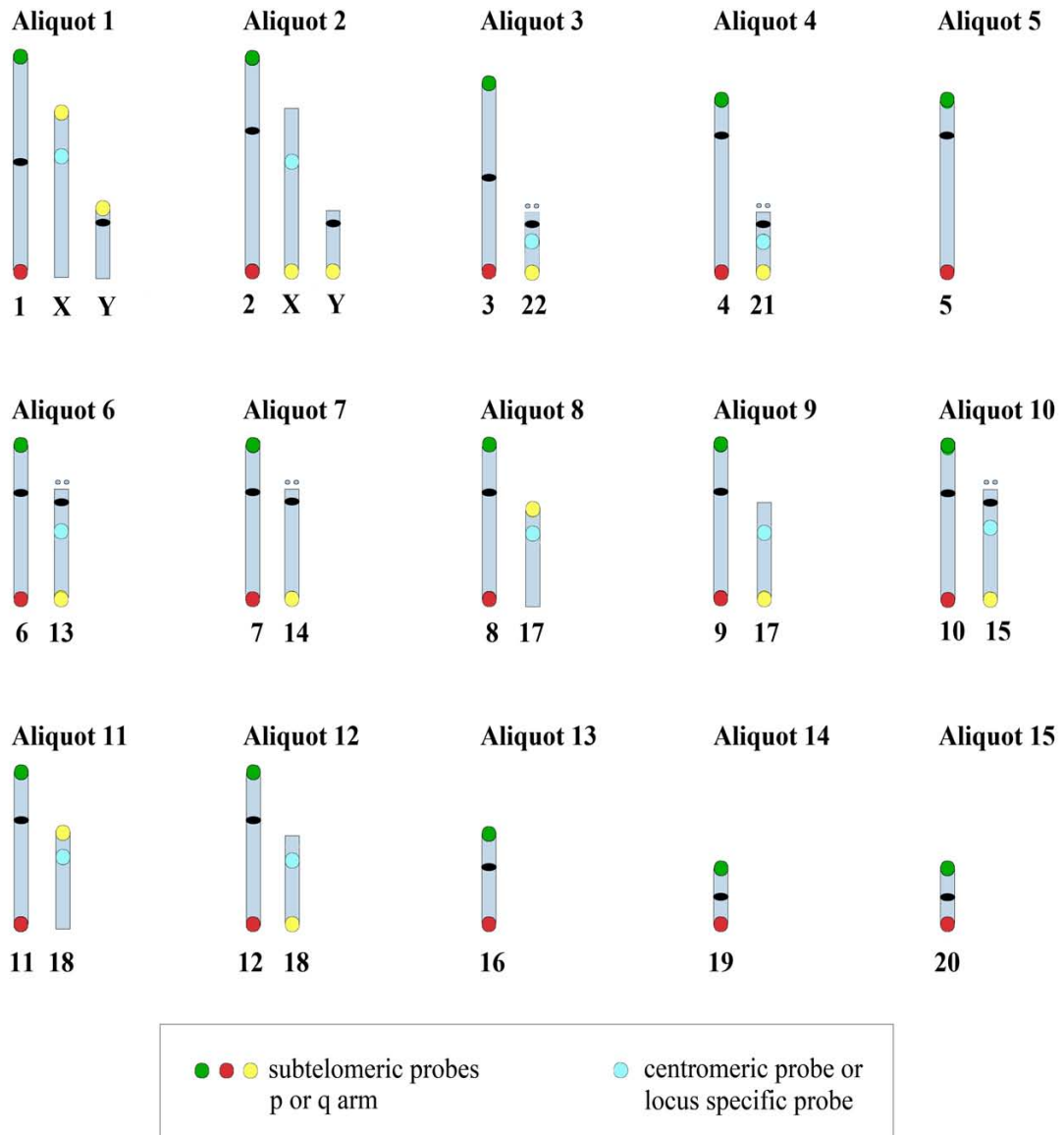
L'agitació enèrgica de les preparacions durant els rentats post-hibridació es un pas important per obtenir una hibridació sense soroll de fons, facilitant així el recompte de senyals al microscopi. Finalment, un cop assecades les preparacions, es tenyeixen amb DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) diluït amb Vectashield (37ng/ml), i es col·loca un cobreobjectes a sobre. Les preparacions es mantenen a 4°C i a les fosques fins a la seva observació al microscopi de fluorescència.

## **2.6. Panel de sondes subtelomèriques *ToTelVysion***

El panel de sondes subtelomèriques *ToTelVysion multi-color FISH* (Vysis) utilitzat en aquest treball està format per 15 alíquotes de sondes diferents, amb un total de 62 sondes (Figura 7):

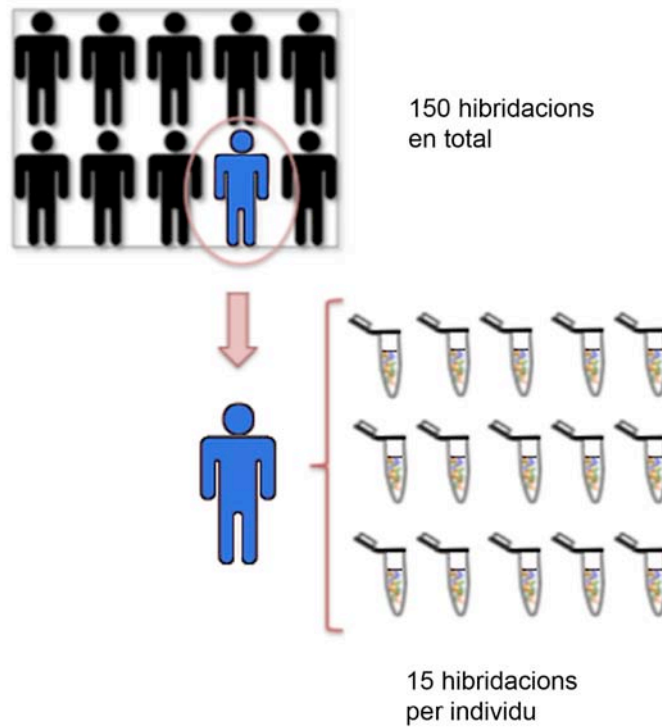
- Sondes subtelomèriques específiques pels braços cromosòmics p i q dels cromosomes 1 al 12 i del 16 al 20
- Sondes subtelomèriques pel braç q dels cromosomes acrocèntrics 13, 14, 15, 21 i 22.
- Sondes subtelomèriques de les regions pseudoautosòmiques dels cromosomes sexuals X i Y (Xp/Yp i Xq/Yq).
  - Sondes centromèriques (CEP) pels cromosomes 17, 18 i X
  - Sondes locus específiques (LSI) pels cromosomes 13, 15, 17, 18, 21 i 22





**Figura 6.** Les 15 alíquot de sondes que formen part del panel de sondes *ToTelVysion multi-color FISH* (Vysis) i els fluorocroms utilitzats per a cada sonda (fluorocroms aqua, green, orange i barreja de orange i green).

Per aquest panel de sondes es necessari realitzar 15 hibridacions per cada individu estudiat (Figura 6). En el nostre cas, s'han portat a terme un total de 150 hibridacions pels 10 individus analitzats.



**Figura 7.** Sèrie d'hibridacions realitzades per individu i en el total de l'estudi amb el panel de sondes *ToTelVysion*.

Aquest panel de sondes permet detectar les següents anomalies cromosòmiques numèriques i estructurals:

Anomalies numèriques

Disomia de 17 autosomes i dels cromosomes sexuals

Diploïdia

Anomalies estructurals

Duplicacions (dup) dels 22 autosomes del cariotip humà (excepte braços curts dels cromosomes acrocèntrics).

Delecions (del) dels 22 autosomes del cariotip humà (excepte braços curts dels cromosomes acrocèntrics).

Les duplicacions i les delecions detectades no estan limitades a les regions subtelo mèriques, sinó que també inclouen les que afecten a tot un braç cromosòmic o només a una part del braç. Les anomalies cromosòmiques estructurals que poden correspondre amb les duplicacions i delecions detectades són sempre anomalies desequilibrades: translocacions recíproques, translocacions Robertsonianes, cromosomes dicèntrics, isocromosomes, inversions, delecions i duplicacions terminals i d'ambdós braços cromosòmics, fragments acèntrics i cromosomes en anell. Les anomalies equilibrades no es poden analitzar en aquest treball mitjançant la tècnica de FISH perquè només detecta guanys o pèrdues de material genètic.

### **2.7. Captura i anàlisi d'imatges**

El recompte de les senyals d'hibridació s'ha portat a terme amb un microscopi d'epifluorescència Olympus BX70, equipat amb un joc de filtres específics per DAPI, FITC, Texas Red i Aqua, i d'un filtre triple per aquests tres últims fluorocroms. La captura d'imatges s'ha realitzat mitjançant una càmera CCD (*charge-coupled device*) d'alta sensibilitat (Photometrics Sensys/Olympus U-SPT) acoblada amb un sistema de processament d'imatges automàtic (*Cytovision Applied Imaging*).

### **2.8. Criteris de recompte de senyals d'hibridació**

El recompte de senyals d'hibridació només s'ha dut a terme en les extensions d'espermatozoides amb una eficiència mínima d'hibridació de 99%, nuclis ben definits, intactes, no solapats i amb una cua visible. Per individu, s'ha comptat un mínim de 1.000 espermatozoides per cadascuna de les 15 alíquotes amb un mínim de 10.000 espermatozoides per cromosoma estudiat. Per tal que el recompte fos el més objectiu possible, tots els senyals dubtosos eren analitzats, almenys, per un segon observador.

A l'hora de comptabilitzar les senyals d'hibridació s'han utilitzat el mateixos criteris de recompte, prèviament descrits pel nostre grup (Bosch et al. 2001; Templado et al. 2011). Segons aquests criteris, es considera:

Disomia o duplicació, quan dues senyals per a una mateixa sonda tenen el mateix color i brillantor, mida similar i es troben separades almenys per una distància igual o major al seu diàmetre.

Deleció quan no es detecta senyal per una sonda específica, però el nucli conté la resta de senyals que pertanyen a la alíquota corresponent.

Diploïdia quan s'observen dues senyals per a cada una de les sondes que formen part d'una determinada barreja.

La nul·lisomia no s'ha inclòs en aquest estudi per la impossibilitat de distingir-la de la manca d'hibridació.

## 2.9. Anàlisi citogenètic

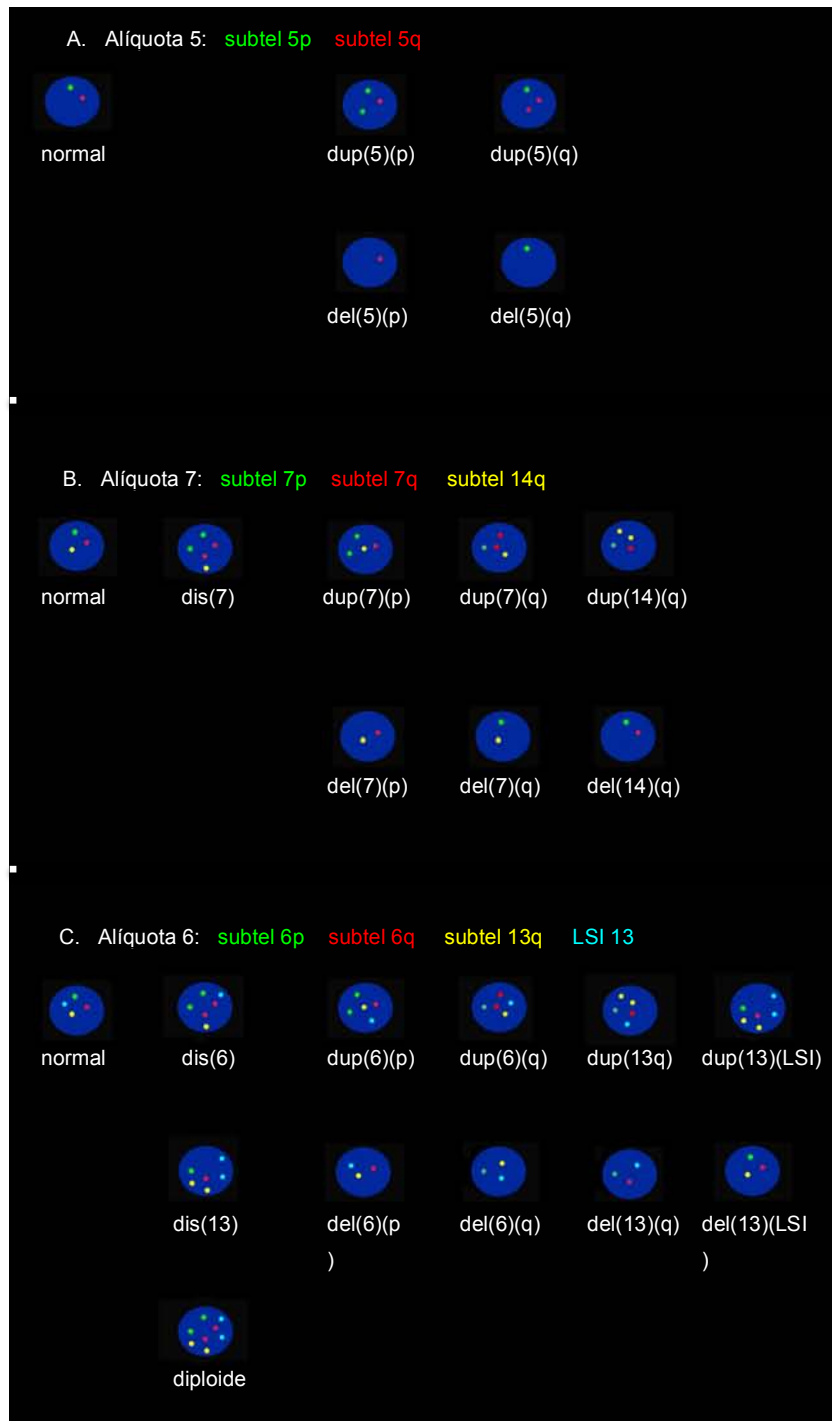
Abans de començar l'estudi es van codificar les mostres de semen, de manera que no es conegués l'edat dels donants durant el recompte dels senyals. Així, l'anàlisi citogenètic s'ha portat a terme a cegues.

### *Detecció d'anomalies numèriques (disomies i diploïdies)*

A la figura 8 s'observen exemples de la detecció d'anomalies numèriques i estructural utilitzant alíquotes amb 2, 3 i 4 sondes. Per l'anàlisi de les anomalies numèriques s'han tingut en compte els següents criteris:

**Disomia:** dues senyals per la sonda subtelomèrica del braç p i dues senyals per una sonda subtelomèrica del q (o sonda CEP o LSI) pel mateix cromosoma quan l'altre cromosoma de la alíquota es normal

**Diploïdia:** dues senyals per totes les sondes que formen una alíquota. Les alíquotes formades per 2 sondes per un mateix cromosoma no s'han inclòs en aquest estudi, ja que l'anàlisi d'un sol cromosoma no permet diferenciar entre disomia i diploïdia. La diploïdia únicament s'ha analitzat en alíquotes amb 4 ó 5 sondes.



**Figura 8.** Detecció d'anomalties numèriques i estructurals en nuclis descondensats d'espermatozoides utilitzant FISH, amb alíquotes amb A) 2 sondes (alíquota 5), B) 3 sondes (alíquota 7) i C) 4 sondes (alíquota 6)

### *Detecció d'anomalies estructurals (duplicacions i delecions)*

La presència de dues senyals per una sonda subtelomèrica i una única senyal per l'altre sonda (CEP, LSI o subtelomèrica) del mateix cromosoma, es considera **duplicació** en el braç cromosòmic marcat. En canvi, l'absència d'una senyal subtelomèrica amb presència de l'altre sonda (CEP, LSI o subtelomèrica) del mateix cromosoma, es considera **delecció** en el braç cromosòmic marcat (veure Figura 8).

## 2.10. Anàlisi estadístic de les dades

### *Anomalies numèriques*

Per establir si hi havia diferències en la freqüència de disomia i diploïdia entre els dos grups d'edat es va utilitzar una equació d'estimació generalitzada (mètode GEE) ajustada mitjançant la instrucció repetida en el procediment GENMOD. El mètode GEE aplicat és una extensió dels models lineals generalitzats, dissenyat per tenir en compte les mesures repetides dintre d'un individu. El mètode GEE es va emprar enlloc de la prova exacta de Fisher, perquè el primer té en compte la possible correlació dintre d'un individu, mentre que el segon assumeix que totes les observacions són independents.

L'anàlisi de la diploïdia es va dur a terme mitjançant la comparació de cada alíquota amb la mitjana de les alíquotes restants per cadascun dels individus. En aquest cas, es va utilitzar la prova no paramètrica de Wilcoxon en dues versions (prova de rangs amb signe i prova de suma de rangs).

La significació estadística es va establir en  $p < 0,05$ . L'anàlisi estadístic es va realitzar amb SAS versió / STAT 9.02 (SAS Institute Inc, Cary, NC).

### *Anomalies estructurals*

Les diferències de les anomalies estructurals (duplicacions i delecions) entre els dos grups d'edat es van analitzar a través d'una equació d'estimació generalitzada (GEE). Per estudiar la tendència de les anomalies estructurals per cromosoma (respecte a una distribució uniforme) es va aplicar la prova de  $X^2$  on es va incloure una correcció per la longitud de cada cromosoma. Per comparar la freqüència de

duplicacions envers delecions en cada individu es va utilitzar el test estadístic T-Student (aparellat) i el test no paramètric de Wilcoxon.

S'ha considerat com a significació estadística quan  $p < 0,05$ . L'anàlisi estadístic s'ha realitzat amb el programari SAS/STAT versió 9.1 (Institute SAS).







1. Introducció

2. Material i Mètodes

**3. Resultats**

4. Discussió

5. Conclusions

6. Bibliografia



En el present treball s'ha portat a terme l'estudi de les anomalies cromosòmiques numèriques i estructurals en espermatozoides de 10 individus, separats en dos grups d'edat: menors de 40 anys (edats compreses entre 23-37 anys) (grup <40 anys) i majors de 60 anys (edats compreses entre 60-74 anys) (grup  $\geq 60$  anys). Per determinar diferències entre ambdós grups d'edat s'ha utilitzat la tècnica de FISH multicolor amb el panel de sondes subtelomèriques *ToTelVysion*, format per 15 alíquotes amb diferents barreges de sondes. S'han analitzat les anomalies numèriques i estructurals en un mínim de 15.000 espermatozoides per individu i 10.000 espermatozoides per cromosoma en els 10 individus, amb un total de 150.000 espermatozoides. La tècnica de FISH utilitzada permet analitzar simultàniament anomalies numèriques i estructurals mitjançant el mateix panel comercial. Els resultats obtinguts en aquest treball ha donat lloc a dues publicacions en revistes científiques (veure Articles 1 i 2 a l'Annex).

### **3.1 Anàlisi d'anomalies numèriques en espermatozoides**

S'ha analitzat la disomia de 19 cromosomes dels 24 presents en el cariotip de l'espermatozoide. Els cromosomes 5, 14, 16, 19 i 20 no van poder ser estudiats per les pròpies limitacions del panel de sondes *ToTelVysion* utilitzat en la tècnica de FISH, ja indicades en l'apartat de Material i mètodes (pàgina 9).

#### ***3.1.1 Freqüència de disomia i diploïdia per individu i grup d'edat***

El percentatge de disomia i diploïdia en espermatozoides per individu i grup d'edat es mostra a la taula 11. La figura 9 il·lustra un exemple d'espermatozoides disòmics per diferents cromosomes, segons el tipus d'alíquota utilitzada.

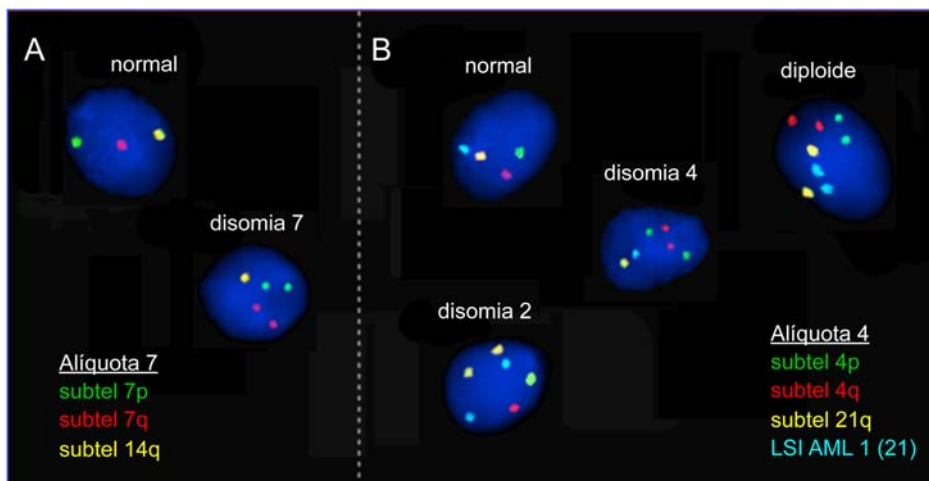
El percentatge total de disomia oscil·lava entre 0,55% (individu C8) i 1,65% (individu C5), amb una mitjana de 1,1% i el de diploïdia entre 0,16% (individu C7) i 0,33% (individu C3), amb una mitjana de 0,23%.

Quan es van comparar les dades obtingudes en el grup <40 anys i en el grup  $\geq 60$  anys, no es van observar diferències significatives entre ambdós grups ni per la mitjana de disomia (1,17% vs. 1,04%, respectivament), ni de diploïdia (0,27% vs. 0,20%, respectivament).

**Taula 11.** Percentatge d'anomalies numèriques en espermatozoides per individu i grup d'edat.

Individu	Edat	% Total disomia <sup>a</sup>	% Diploïdia	% Total numèriques
C8	23	1,60	0,33	3,53
C3	24	0,65	0,26	1,56
C4	25	1,65	0,32	3,62
C9	30	0,55	0,19	1,29
C5	37	1,40	0,23	3,03
<b>Mitjana &lt;40 anys</b>	<b>27,8</b>	<b>1,17</b>	<b>0,27</b>	<b>2,61</b>
C7	60	0,95	0,19	2,09
C10	62	1,40	0,27	3,07
C2	64	1,10	0,17	2,37
C6	72	0,75	0,16	1,66
C1	74	1,00	0,20	2,20
<b>Mitjana ≥60 anys</b>	<b>66,4</b>	<b>1,04</b>	<b>0,20</b>	<b>2,28</b>

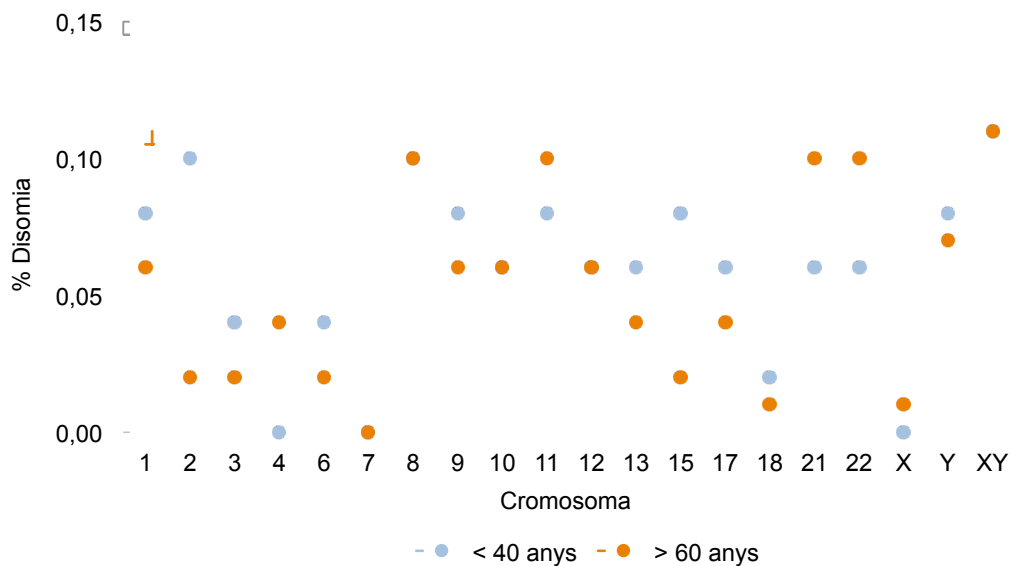
<sup>a</sup> Inclou disomies pels tots els cromosomes, excepte pels cromosomes 5, 14, 16, 19 i 20



**Figura 9.** Anomalies numèriques (disomia i diploïdia) en caps descondensats d'espermatozoides hibridats amb la tècnica de FISH, utilitzant (A) l'aliquota 7, formada per 3 sondes i (B) l'aliquota 4, formada per quatre sondes (Composició fotogràfica).

### 3.1.2 Freqüència de disomia per cromosoma, individu i grup d'edat

La figura 10 il·lustra gràficament els valors detectats de disomia per cada cromosoma en ambdós grups d'edat. La freqüència de disomia per a cadascun dels cromosomes analitzats en ambdós grups està representada a taula 12.



**Figura 10.** Percentatge de disomia per cada cromosoma estudiat en els dos grups d'edat

El percentatge de disomia per a cada cromosoma variava de 0% (cromosoma 7) fins a 0,11% (parell cromosòmic XY). Els cromosomes que van mostrar un percentatge menor de disomia són els cromosomes 7 (0,0%,  $p < 0,001$ ) i 18 (0,015%,  $p = 0,0046$ ). No hi ha cap autosoma que mostrés una freqüència de disomia estadísticament més alta que la resta d'autosomes.

La freqüència de disomia per a cadascun dels 19 cromosomes estudiats va ser similar en els dos grups d'edat. No obstant això, es va observar una tendència a l'increment en la freqüència de disomia pels cromosomes acrocèntrics més petits (cromosomes 21 i 22) en el grup  $\geq 60$  anys.

La freqüència de disomia total dels cromosomes sexuals va ser el mateix en ambdós grups d'edat (0,19%), amb valors molts similars per cadascuna de les disomies sexuals per separats (XX, YY i XY) en ambdós grups.

**Taula 12.** Percentatge de disomia en espermatozoides per cada cromosoma i per grup d'edat analitzat amb FISH

Individu	Edat	% disomia per cromosoma																		Total autosomes	X	Y	XY	Total sexuals
		1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	15	17	18	21	22						
C3	24	0,10	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,10	0,10	0,00	0,10	0,00	0,10	0,05	0,10	0,10	1,45	0,00	0,10	0,05	0,15	
C4	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,10	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,45	0,00	0,20	0,00	0,20	
C5	37	0,10	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,40	0,10	0,00	0,00	0,10	0,10	0,20	0,05	0,00	0,20	0,00	1,35	0,00	0,00	0,30	0,30	
C8	23	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,10	0,05	0,00	0,00	0,35	0,00	0,10	0,10	0,20	
C9	30	0,10	0,10	0,10	0,00	0,20	0,00	0,10	0,00	0,20	0,00	0,10	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,20	1,30	0,00	0,00	0,10	0,10	
<b>Mitjana &lt;40 anys</b>	<b>27,8</b>	<b>0,08</b>	<b>0,10</b>	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>	<b>0,10</b>	<b>0,00</b>	<b>0,10</b>	<b>0,08</b>	<b>0,06</b>	<b>0,08</b>	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>	<b>0,08</b>	<b>0,06</b>	<b>0,02</b>	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>	<b>0,98</b>	<b>0,00</b>	<b>0,08</b>	<b>0,11</b>	<b>0,19</b>	
C1	74	0,10	0,10	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,10	0,00	0,10	0,10	0,05	0,00	0,00	0,10	0,85	0,00	0,00	0,10	0,10	
C2	64	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,10	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,10	0,05	0,10	0,20	1,05	0,00	0,15	0,20	0,35	
C6	72	0,00	0,00	0,10	0,10	0,10	0,00	0,10	0,10	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,05	0,00	0,20	0,00	0,95	0,05	0,10	0,00	0,15	
C7	60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,10	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,10	0,60	0,00	0,05	0,10	0,15	
C10	62	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,20	0,20	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,80	0,00	0,05	0,15	0,20	
<b>Mitjana ≥60 anys</b>	<b>66,4</b>	<b>0,06</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,04</b>	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>	<b>0,10</b>	<b>0,06</b>	<b>0,10</b>	<b>0,10</b>	<b>0,06</b>	<b>0,04</b>	<b>0,02</b>	<b>0,04</b>	<b>0,01</b>	<b>0,10</b>	<b>0,10</b>	<b>0,85</b>	<b>0,01</b>	<b>0,07</b>	<b>0,11</b>	<b>0,19</b>	
<b>Total disomia</b>		<b>0,07</b>	<b>0,06</b>	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>	<b>0,03</b>	<b>0</b>	<b>0,10</b>	<b>0,07</b>	<b>0,06</b>	<b>0,09</b>	<b>0,06</b>	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>	<b>0,02</b>	<b>0,08</b>	<b>0,08</b>	<b>0,92</b>	<b>0,01</b>	<b>0,08</b>	<b>0,11</b>	<b>0,19</b>	

La freqüència de disomia XY va ser la més alta, però sense que aquesta diferència fos significativa, mentre que la de disomia XX va ser la menor ( $p=0,0004$ ). Quan es va comparar el percentatge de disomia autosòmica i el de disomia dels cromosomes sexuals entre els dos grups d'edat, no van detectar-se diferències significatives.

Si es tenen en compte les dades dels 10 donants, la mitjana de disomia dels cromosomes sexuals (0,095%) va ser significativament superior ( $p=0,0175$ ) a la dels autosomes (0,054%).

Les dades de diploïdia per alíquota en el conjunt dels 10 individus estan recollides a la taula 13. Els valors de diploïdia per individu va ser la mitjana dels valors obtinguts en les 10 alíquotes amb 4 i 5 sondes, analitzades en cada individu.

**Taula 13.** Percentatge de diploïdia en espermatozoides analitzada en alíquotes amb 4 sondes

Donant	% Diploïdia per alíquota <sup>a</sup>										% Mitjana diploïdia
	1	2	3	4	6	8	9	10	11	12	
Cromosomes	1, X, Y	2, X, Y	3, 22	4, 21	6, 13	8, 17	9, 17	10, 15	11, 18	12, 18	
C8	0,2	0,1	0,4	0,4	0,3	0,5	0,6	0,2	0,5	0,1	0,33
C3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4	0,4	0,2	0,3	0,3	0,26
C4	0,4	0,1	0,1	0,5	0,4	0,3	0,2	0,7	0,3	0,2	0,32
C9	0,0	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1	0,4	0,1	0,19
C5	0,3	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	0,4	0,3	0,2	0,2	0,23
C7	0,2	0,3	0,1	0,4	0,1	0,2	0,3	0,3	0,0	0,0	0,19
C10	0,4	0,3	0,2	0,5	0,1	0,2	0,5	0,3	0,1	0,1	0,27
C2	0,1	0,3	0,2	0,3	0,0	0,3	0,2	0,1	0	0,2	0,17
C6	0,1	0,1	0	0,3	0,0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,4	0,16
C1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,20
<b>Mitjana</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,17</b>	<b>0,33</b>	<b>0,19</b>	<b>0,27</b>	<b>0,33</b>	<b>0,26</b>	<b>0,21</b>	<b>0,19</b>	<b>0,23</b>

<sup>a</sup> S'han analitzat 1.000 espermatozoides per alíquota i un total de 10.000 espermatozoides per individu



Tenint en compte que cada alíquota està formada per una barreja de sondes diferents, es va voler conèixer si els valors de diploïdia variaven segons les sondes utilitzades. L'interval dels valors de diploïdia detectat a cada alíquota era molt ample en alguns individus, com va ser el cas del donant 8, en el qual els percentatges de diploïdia oscil·lava des de 0,1% per les alíquotes 2 i 12 fins 0,6% per l'alíquota 9. En cada individu, es va comparar el valor de diploïdia obtingut en cada alíquota amb la mitjana dels valors obtinguts en les 9 alíquotes restants analitzades a l'individu. Els resultats van mostrar que les alíquotes 4 (sondes 4p, 4q, 21q i 21LSI) i 9 (sondes 9p, 9q, 17CEN i 17q) presentaven un major percentatge de diploïdia ( $p=0,0132$  i  $p=0,0269$ , respectivament) que la resta d'alíquotes.

### **3.2. Anàlisi d'anomalies estructurals en espermatozoides**

Per analitzar les anomalies estructurals (delecions i duplicacions) es van *estudiar* els 22 autosomes. Els cromosomes sexuals no van poder ser estudiats per limitacions del panel de sondes utilitzat en la tècnica de FISH (veure l'apartat *de* Material i mètodes, pàgina 7).

#### **3.2.1. Freqüència d'anomalies estructurals per individu i grup d'edat**

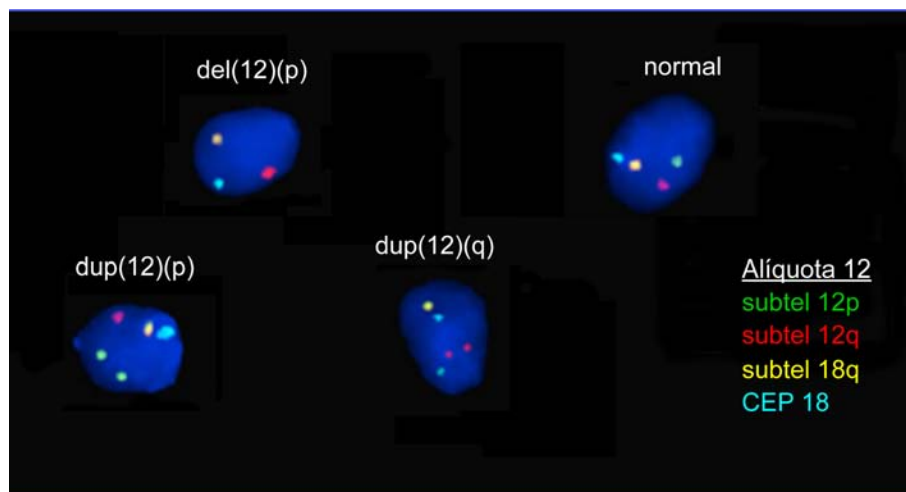
A la taula 14 es mostra el percentatge total d'anomalies estructurals en espermatozoides per individu i grup d'edat. A mode d'exemple, a la figura 11 es representen diferents anomalies estructurals detectades en espermatozoides, utilitzant l'alíquota 12 en la tècnica de FISH.

El percentatge de duplicacions oscil·lava entre 2,9% (individu C3) i 5,7% (individu C10), amb una mitjana de 3,93% i el de delecions entre 1% (individu C1) i 2,7% (individu C2), amb una mitjana de 1,85%. El total d'anomalies estructurals variava entre 4,4% (individus C3 i C5) i 7,7% (individu C6), amb una mitjana de 5,8%.

Els valors de les anomalies estructurals detectades per individu han demostrat la variabilitat interindividual dintre de cada grup d'edat. Si es descartava l'individu C9 del grup <40 anys, que presentava percentatges atípics dintre d'aquest grup, s'incrementaven les diferències d'anomalies estructurals entre els grups de manera significativa ( $p=0,0190$ ). De la mateixa manera, si es descartava l'individu C1 del grup  $\geq 60$  anys, que també presentava valors molt inferiors a la mitjana del seu grup

**Taula 14.** Percentatge d'anomalies estructurals en espermatozoides per individu i grup d'edat

Individu	Edat	% Duplicacions	% Deleccions	% Total estructurals
C3	24	2,9	1,5	4,4
C4	25	3,5	1,1	4,6
C5	37	3,1	1,3	4,4
C8	23	2,9	1,7	4,6
C9	30	4,3	2,5	6,7
<b>Mitjana &lt;40 anys</b>	<b>27,8</b>	<b>3,3</b>	<b>1,6</b>	<b>4,9</b>
C1	74	3,5	1,0	4,5
C2	64	4,4	2,7	7,1
C6	72	5,3	2,4	7,7
C7	60	3,7	2,4	6,1
C10	62	5,7	1,9	7,6
<b>Mitjana ≥60 anys</b>	<b>66,4</b>	<b>4,5</b>	<b>2,1</b>	<b>6,6</b>



**Figura 11.** Anomalies estructurals del cromosoma 12 en caps descondensats d'espermatozoides hibridats amb la tècnica de FISH, utilitzant l'alíquota 12 (Composició fotogràfica) (dup= duplicació; del = deleció).

d'edat, també augmenta les diferències en el total d'anomalies estructurals entre els dos grups d'edat ( $p=0,0154$ ).

Els 10 individus presentaven més duplicacions que delecions, independentment del grup d'edat (grup <40 anys, 3,3% vs. 1,62%,  $p=0,0012$ ; grup  $\geq 60$  anys, 4,5% vs. 2,1%,  $p=0,0053$ ). La ràtio de duplicacions i delecions es manté en ambdós grups (2,1 en el grup <40 anys i 2,2 en el grup  $\geq 60$  anys). L'increment de duplicacions enfront delecions es va observar en la majoria dels braços cromosòmics, excepte el 2q, 3q, 4p, 7p, 8p i 19q, que presentaven més delecions que duplicacions.

L'anàlisi estadístic va mostrar que el percentatge de les anomalies estructurals totals en el grup  $\geq 60$  anys era major que la del grup <40 anys (6,6% vs. 4,9%,  $p=0,0499$ , GEE). La freqüència de duplicacions en el grup  $\geq 60$  anys va ser major que en el grup <40 anys (4,5% vs. 3,3%;  $p=0,040$ ). El percentatge de delecions també va ser superior en el grup  $\geq 60$  anys, encara que l'increment no arribava a ser significatiu.

#### ***3.2.2. Distribució de les anomalies estructurals per cromosoma***

Les freqüències de duplicacions i delecions per braç cromosòmic i per cromosoma en el total dels 10 individus es mostren a la taula 15. La mitjana d'anomalies estructurals per cromosoma oscil·lava entre 0,43% i 0,12% (cromosomes 1 i 22, respectivament) amb una mitjana per autosoma de 0,27%. El cromosoma que presentava un percentatge més elevat d'anomalies estructurals va ser el 1 (0,43%), seguit del 5 (0,37%) i el 9 (0,36%). Els cromosomes més grans mostraven una tendència a presentar un major nombre d'anomalies estructurals, malgrat no tots els cromosomes presentaven una proporció directa entre el nombre d'anomalies estructurals i la longitud del cromosoma. De fet, el percentatge d'anomalies estructurals pels cromosomes 19 i 20 (0,32% i 0,35%, respectivament) estaven en el mateix ordre que els cromosomes més grans, com són el 2, 5, 8 i 9 (0,34%, 0,37%, 0,35%, 0,36%).

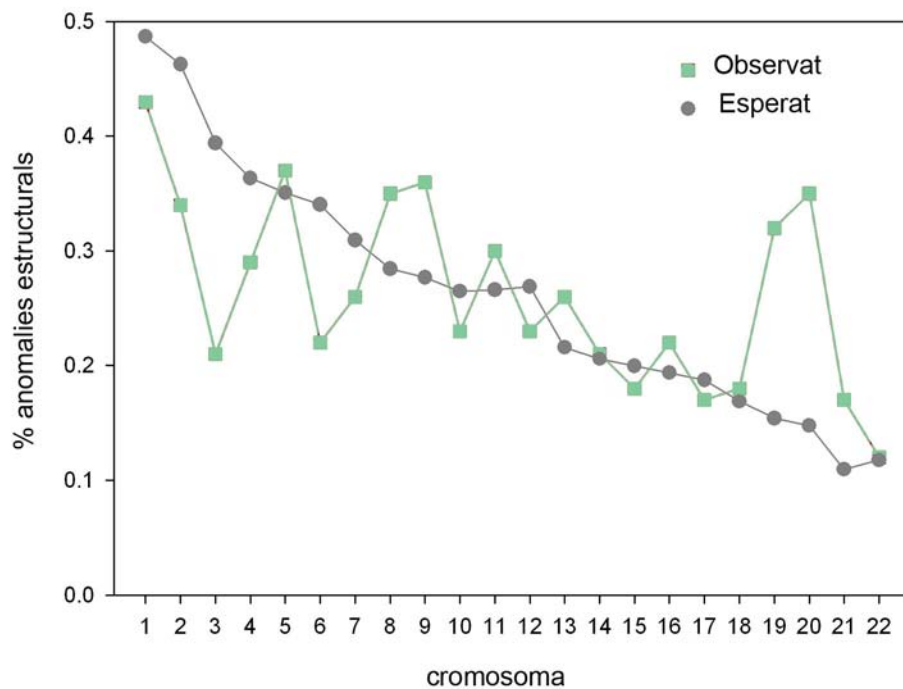
Es va calcular el nombre esperat d'anomalies estructurals en cada cromosoma, assumint una distribució uniforme al llarg del cromosoma i realitzant una correcció segons la seva longitud relativa (test de  $X^2$ ) (Figura 12).

**Taula 15.** Percentatge d'anomalies estructurals per autosoma i per a cada braç cromosòmic en els 10 individus estudiats <sup>a</sup>

Cromosoma <sup>a</sup>	Braç p			Braç q			% Total estructurals
	%dup	%del	% Total	%dup	%del	% Total	
1	0,15	0,10	0,25	0,06	0,12	0,18	0,43
2	0,09	0,02	0,11	0,07	0,16	0,23	0,34
3	0,11	0,01	0,12	0,04	0,05	0,09	0,21
4	0,08	0,08	0,16	0,07	0,06	0,13	0,29
5	0,14	0,02	0,16	0,12	0,09	0,21	0,37
6	0,10	0,02	0,12	0,06	0,04	0,10	0,22
7	0,02	0,08	0,10	0,10	0,06	0,16	0,26
8	0,04	0,09	0,13	0,12	0,10	0,22	0,35
9	0,08	0,06	0,14	0,15	0,07	0,22	0,36
10	0,11	0,04	0,15	0,05	0,03	0,08	0,23
11	0,05	0,04	0,09	0,18	0,03	0,21	0,30
12	0,12	0,04	0,16	0,07	0,00	0,07	0,23
13	NA	NA	NA	0,22	0,04	0,26	0,26
14	NA	NA	NA	0,14	0,07	0,21	0,21
15	NA	NA	NA	0,15	0,03	0,18	0,18
16	0,08	0,05	0,13	0,06	0,03	0,09	0,22
17	0,01	0,00	0,01	0,16	0,00	0,16	0,17
18	0,09	0,00	0,09	0,09	0,00	0,09	0,18
19	0,18	0,04	0,22	0,03	0,07	0,10	0,32
20	0,12	0,09	0,21	0,11	0,03	0,14	0,35
21	NA	NA	NA	0,13	0,04	0,17	0,17
22	NA	NA	NA	0,11	0,01	0,12	0,12

<sup>a</sup> 10.000 espermatozoides analitzats per cromosoma en el total de 10 individus  
NA= no analitzat

L'anàlisi estadístic va mostrar que els cromosomes 19 i 20, presentaven un percentatge d'anomalies estructurals (0,32% i 0,35%, respectivament) més alt de l'esperat (0,15% i 0,15%, respectivament) ( $p < 0,05$ ). Mentre que dos dels cromosomes més grans, el 3 i 6, tenien un menor percentatge d'anomalies estructurals (0,21% i 0,22%, respectivament) de l'esperat (0,39% i 0,34%, respectivament) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12.** Percentatge observat i esperat d'anomalies estructurals per autosoma en els 10 individus estudiats.

### 3.2.3. Efecte de l'edat en la distribució de les anomalies estructurals per cromosoma i grup d'edat

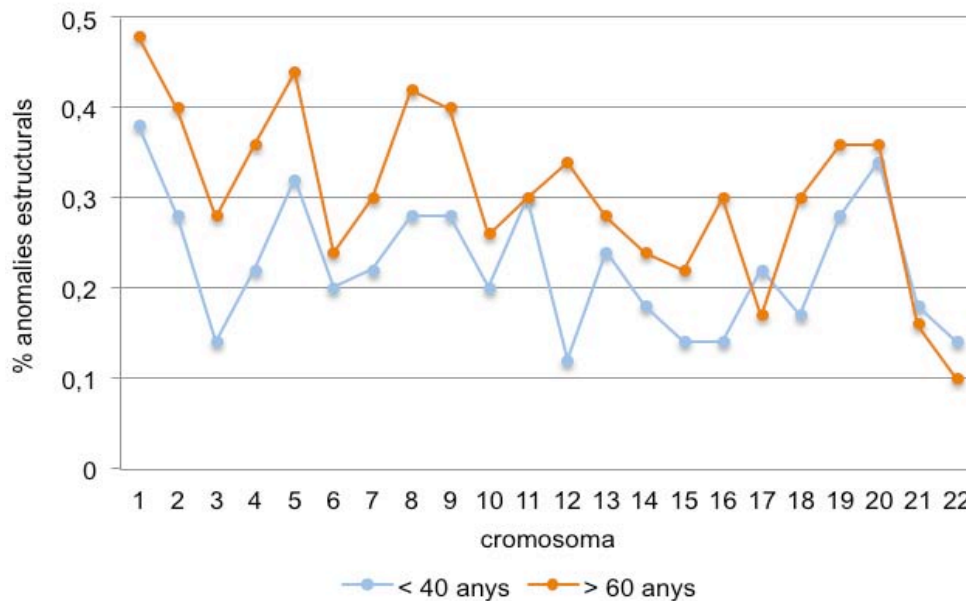
El percentatge d'anomalies estructurals per cada autosoma, comparant els dos grups d'edat, estan recollits a la taula 16. La freqüència d'anomalies estructurals totals per a cada cromosoma va ser similar en ambdós grups, amb l'excepció del cromosoma 12, que presentava un increment d'anomalies estructurals en el grup

**Taula 16.** Percentatge d'anomalies estructurals en espermatozoides per autosoma i grup d'edat <sup>a</sup>.

Individu	% Anomalies estructurals per autosoma																						
	Edat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
C3	24	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,4	0,1	0,3	0,0	0,2	0,3	0,0	0,0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
C4	25	0,4	0,4	0,2	0,3	0,2	0,2	0,0	0,2	0,1	0,3	0,2	0,0	0,4	0,2	0,0	0,1	0,4	0,1	0,2	0,4	0,3	0,2
C5	37	0,4	0,2	0,0	0,0	0,5	0,2	0,0	0,1	0,3	0,1	0,5	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,1
C8	23	0,3	0,3	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,3	0,0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2
C9	30	0,5	0,2	0,2	0,3	0,4	0,3	0,5	0,6	0,5	0,4	0,4	0,1	0,3	0,1	0,4	0,3	0,2	0,1	0,5	0,5	0	0
<b>Mitjana &lt;40 anys</b>	<b>27,8</b>	<b>0,38</b>	<b>0,28</b>	<b>0,14</b>	<b>0,22</b>	<b>0,32</b>	<b>0,20</b>	<b>0,22</b>	<b>0,28</b>	<b>0,28</b>	<b>0,20</b>	<b>0,30</b>	<b>0,12</b>	<b>0,24</b>	<b>0,18</b>	<b>0,14</b>	<b>0,14</b>	<b>0,22</b>	<b>0,14</b>	<b>0,28</b>	<b>0,34</b>	<b>0,18</b>	<b>0,14</b>
C1	74	0,5	0,2	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3	0,6	0,5	0,2	0,0	0,4	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,3	0,2	0,2	0,0	0,1
C2	64	0,6	0,4	0,2	0,8	0,4	0,2	0,4	0,1	0,5	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,1	0,2	0,6	0,2	0,1	0,2
C6	72	0,7	0,8	0,4	0,4	0,5	0,1	0,4	0,5	0,3	0,2	0,5	0,3	0,5	0,3	0,2	0,1	0,3	0,4	0,3	0,4	0,1	0,2
C7	60	0,5	0,2	0,1	0,1	0,4	0,2	0,1	0,2	0,6	0,2	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2	0,6	0,1	0,1	0,4	0,6	0,2	0,0
C10	62	0,1	0,4	0,6	0,3	0,5	0,5	0,3	0,7	0,1	0,4	0,30	0,4	0,4	0,2	0,4	0,3	0,1	0,3	0,3	0,4	0,4	0,0
<b>Mitjana ≥60 anys</b>	<b>66,4</b>	<b>0,48</b>	<b>0,40</b>	<b>0,28</b>	<b>0,36</b>	<b>0,44</b>	<b>0,24</b>	<b>0,30</b>	<b>0,42</b>	<b>0,40</b>	<b>0,26</b>	<b>0,3</b>	<b>0,34</b>	<b>0,28</b>	<b>0,24</b>	<b>0,22</b>	<b>0,30</b>	<b>0,14</b>	<b>0,26</b>	<b>0,36</b>	<b>0,36</b>	<b>0,16</b>	<b>0,10</b>

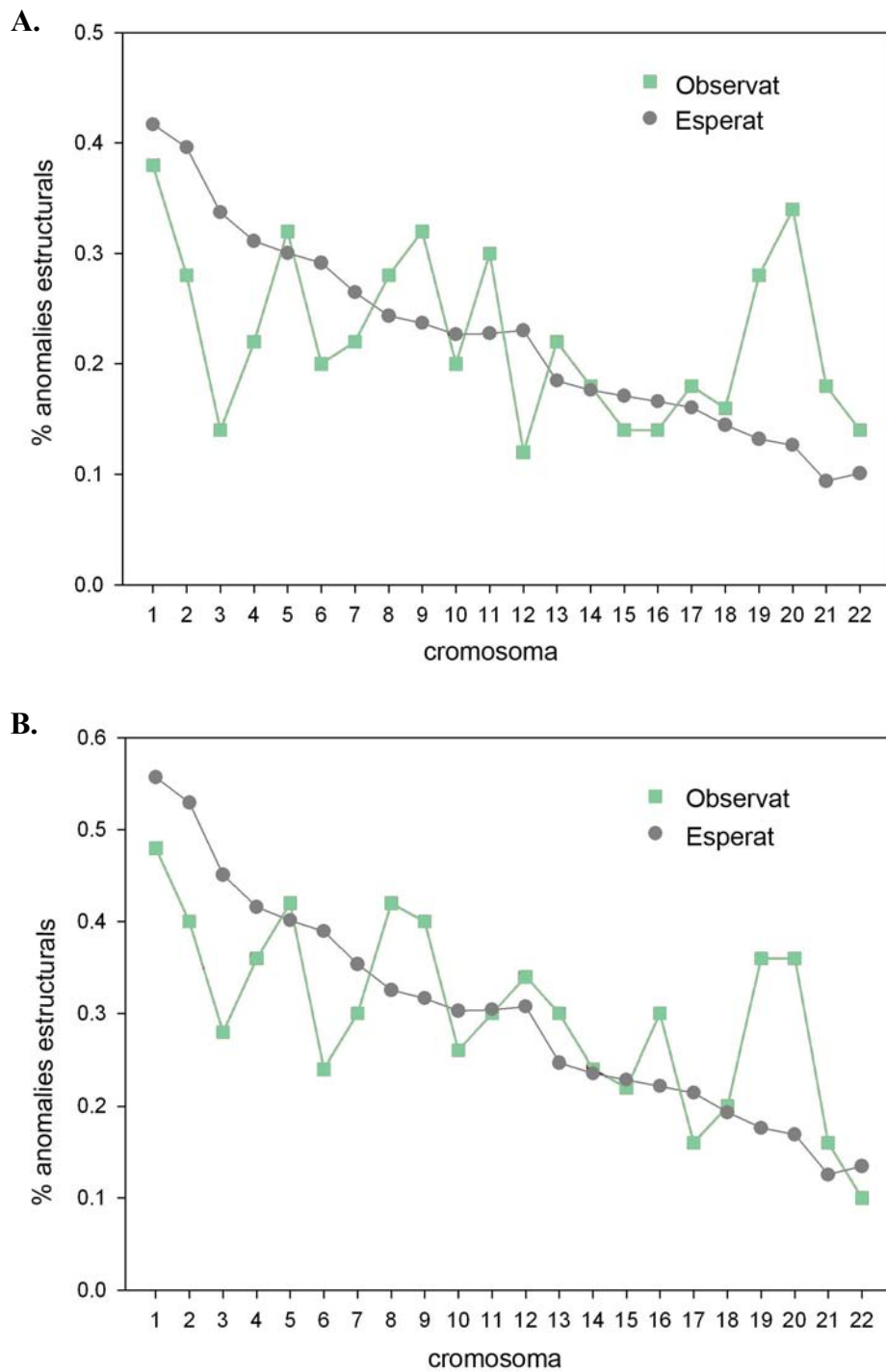
<sup>a</sup> S'han analitzat 1.000 espermatozoides per autosoma i per individu.

≥60 respecte el grup <40 anys (0,34% vs. 0,12%;p=0,01). El cromosoma 16 mostrava una tendència a l'increment d'anomalies estructurals en el grup ≥60 anys (Figura 13).



**Figura 13.** Percentatge d'anomalies estructurals per autosoma en el grup <40 anys i en el grup ≥60 anys.

En el grup <40 anys (Figura 14A), el cromosoma 3 mostrava un menor percentatge d'anomalies estructurals (0,14%) del que s'esperava (0,34%), mentre que els cromosomes 19, 20 i 21 (0,28%, 0,34%, 0,18%) presentaven percentatges més alts dels esperats (0,13%, 0,13%, 0,09%, respectivament) ( $p < 0,05$ ). En el grup ≥60 anys (Figura 14B), els cromosomes 19 i 20 van mostrar un major percentatge d'anomalies estructurals del que s'esperava (0,36% vs. 0,18%, respectivament) i (0,36% vs. 0,17%, respectivament) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 14.** Percentatge d'anomalies estructurals per autosoma observat i esperat en el grup <40 (A) i en el grup ≥60 anys (B)









1. Introducció

2. Material i Mètodes

3. Resultats

**4. Discussió**

5. Conclusions

6. Bibliografia



En aquest treball hem analitzat si l'edat paterna és un factor de risc per les anomalies cromosòmiques numèriques i estructurals presents en l'espermatozoide, comparant les dades obtingudes en dos grups d'edat: grup <40 anys i grup ≥60 anys. La importància d'aquest treball es basa en la utilització, per primera vegada en cèl·lules germinals, de la tècnica de FISH amb un panel de sondes subtelomèriques per a tots els cromosomes que ha permet estudiar simultàniament la freqüència d'aneuploidia en 19 dels 24 cromosomes del cariotip humà i de diploidia, així com la freqüència de les anomalies estructurals en els 22 autosomes. Els resultats ens han permès estudiar un possible efecte de l'edat en la freqüència d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides d'individus d'edat avançada.

#### **4.1. Valoracions de la tècnica de FISH amb sondes subtelomèriques**

La tècnica de FISH amb el panel de sondes subtelomèriques ToTelvysion (Knight et al. 2000) utilitzada en aquest treball, ha estat aplicada principalment en diagnòstic prenatal, per la caracterització de regions telomèriques i per conèixer l'origen de reordenaments cromosòmics que impliquen aquestes regions cromosòmiques. Fins al moment, no s'han realitzat estudis de FISH amb aquest kit de sondes en nuclis d'espermatozoides, per la qual cosa no es coneix la sensibilitat d'aquest panel en l'anàlisi de les anomalies cromosòmiques.

La principal avantatge de la tècnica de FISH amb sondes subtelomèriques, respecte a la tècnica de FISH convencional prèviament utilitzada en nuclis interfàsics d'espermatozoide, és la possibilitat d'estudiar, de manera simultània, les anomalies numèriques i estructurals de la gran majoria dels cromosomes en una única mostra de semen. Per analitzar tots els cromosomes que ens permet aquesta tècnica, és necessària la realització de 15 hibridacions amb diferents combinacions de sondes, en cadascun dels individus de la sèrie. En canvi, la resta d'estudis amb la tècnica de FISH en caps d'espermatozoide realitzen només una hibridació per mostra de semen i individu, analitzant només 2 o 3 cromosomes ( Van Hummelen et al. 1996; McInnes et al. 1998; Baumgartner et al. 1999; Bosch et al. 2003; Schmid et al. 2004; Slotter et al. 2000 i 2007). La tècnica de FISH amb sondes subtelomèriques, al igual que la de FISH convencional, detecta tot tipus d'anomalia numèriques. En el cas de les anomalies estructurals, aquesta tècnica permet el recompte de duplicacions i delecions, que poden correspondre a anomalies estructurals

desequilibrades tals com translocacions, inversions, insercions, cromosomes marcadors, fragments acèntrics, cromosomes en anell i isocromosomes, entre d'altres. Amb la tècnica de FISH utilitzada, a l'igual que la resta de tècniques de FISH en nuclis interfàsics, no es pot determinar l'anomalia estructural a la que corresponen les duplicacions i delecions observades en l'espermatozoide.

Altre avantatge d'aquesta tècnica, respecte a la tècnica de FISH convencional, és que l'anàlisi de la disomia i diploïdia és més restrictiva que la que es realitza amb una única sonda per cromosoma, normalment centromèrica (Martin et al. 1995; Griffin et al. 1995; Kinakin et al. 1997; McInnes et al. 1998; Martínez-Pasarell et al. 1999; Martin i Rademaker 1999; Estop et al. 2000; Shi i Martin 2000; Bosch et al. 2001; Bosch et al. 2003; Soares et al. 2001; Rubes et al. 2002). En el nostre treball, per determinar la disomia, es requereix la presència de dues senyals per dues sondes que marquen regions diferents d'un cromosoma, analitzant-se dos o tres cromosomes per alíquota.

La tècnica de FISH emprada en aquest treball presenta una alta especificitat de les sondes de DNA ja que el 70% de les sondes del panel ToTelVysion utilitzat són sondes subtelomèriques o locus específiques, mentre que la resta de sondes són centromèriques. Els valors de disomia i diploïdia es poden veure incrementats en els estudis de FISH amb sondes centromèriques, ja que aquest tipus de sonda hibrida amb grans blocs d'ADN repetitiu (DNA  $\alpha$ -satèl·lit). Aquestes seqüències centromèriques repetitives poden variar entre individus, depenent del nombre de repeticions, originant senyals poc visibles o, fins i tot dividides, que podrien induir a error en la interpretació (Egozcue et al. 1997).

Les sondes subtelomèriques i LSI del panel ToTelvysion detecten seqüències curtes no repetitives de DNA (60-200 kb), oferint senyals petites que dificulten la seva visualització. Per aconseguir que aquestes petites sondes puguin hibridar en condicions òptimes, és necessari el control exhaustiu de la decondensació de la cromatina dels nuclis d'espermatozoide (pas necessari abans de la hibridació).

Per donar més validesa als resultats obtinguts a partir de la tècnica de FISH utilitzada en el present estudi, hem comparat la freqüència de disomia pels cromosomes 6, 9, 21, diploïdia i d'anomalies estructurals del cromosoma 9 obtinguda en el present treball amb l'obtinguda en treballs previs del nostre grup (Bosch et al. 2001 i 2003) en els mateixos individus (9 dels 10 analitzats en aquest treball) utilitzant la tècnica de FISH (Taula 17). No s'observen diferències entre els

resultats obtinguts per nosaltres i els obtinguts per Bosch i col·laboradors (2003), ni per disomia, diploïdia ni per duplicacions i delecions del cromosoma 9. Aquests resultats indiquen la idoneïtat de la tècnica de FISH utilitzada en aquest estudi, com també la validesa dels criteris de recompte aplicats pel nostre grup.

**Taula 17.** Percentatges de diploïdia, disomia i anomalies estructurals detectats pel nostre grup utilitzant FISH convencional i FISH amb el kit de sondes ToTelvysion en els mateix individus

Donants (anys)	% Disomia						% Estructurals		% Diploïdia	
	cromosoma 6		cromosoma 9		cromosoma 21		cromosoma 9			
	Bosch i col. <sup>1,2</sup>	Present treball	Bosch i col. <sup>2</sup>	Present treball	Bosch i col. <sup>1</sup>	Present treball <sup>2</sup>	Bosch i col. <sup>2</sup>	Present treball	Bosch i col. <sup>1,2</sup>	Present treball
C3 (24)	0,03	0,00	0,03	0,00	0,04	0,00	0,28	0,40	0,30	0,26
C4 (25)	0,04	0,00	0,01	0,10	0,03	0,20	0,29	0,10	0,18	0,32
C9 (30)	0,01	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	0,20	0,30	0,17	0,19
C5 (37)	0,03	0,20	0,03	0,00	0,05	0,00	0,26	0,50	0,18	0,23
<b>Mitjana &lt;40 anys</b>	<b>0,03</b>	<b>0,05</b>	<b>0,02</b>	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>	<b>0,05</b>	<b>0,26</b>	<b>0,32</b>	<b>0,21</b>	<b>0,25</b>
C7 (60)	0,03	0,00	0,13	0,10	0,10	0,00	0,53	0,50	0,44	0,19
C10 (62)	0,02	0,00	0,04	0,10	0,05	0,10	0,40	0,50	0,32	0,27
C2 (64)	0,06	0,10	0,08	0,10	0,13	0,20	0,59	0,30	0,47	0,17
C6 (72)	0,04	0,00	0,06	0,00	0,05	0,20	0,58	0,60	0,33	0,16
C1 (74)	0,05	0,00	0,12	0,00	0,06	0,00	0,58	0,10	0,31	0,20
<b>Mitjana &gt;60 anys</b>	<b>0,04</b>	<b>0,02</b>	<b>0,09</b>	<b>0,06</b>	<b>0,08</b>	<b>0,10</b>	<b>0,53</b>	<b>0,40</b>	<b>0,37</b>	<b>0,20</b>

<sup>1</sup> Bosch et al, 2001

<sup>2</sup> Bosch et al, 2003

Per l'estudi de la diploïdia en el present treball s'han analitzat un total de 6-8 senyals per espermatozoide (dues senyals per 4-5 sondes situades en dos o tres cromosomes). En dos treballs previs del nostre grup (Bosch et al. 2001, 2003), per considerar un espermatozoide diploide, s'havien de comptabilitzar un total de 6-8 senyals (dues senyals per 3-4 sondes en 3 o quatre cromosomes), sent la major part de les sondes centromèriques. En la gran majoria d'estudis on s'ha analitzat la diploïdia només es valoren un total de 4-6 senyals, utilitzant sondes centromèriques (Martin et al. 1995; Griffin et al. 1995; Lähdetie et al. 1996; Kinakin et al. 1997; Blanco et al. 1997; Shi i Martin 2000; Soares et al. 2001; Templado et al. 2005).



Amb aquest criteri, es van trobar diferències en el percentatge de diploïdia en mostres de semen d'un mateix individu, recollides en diferents moments (revisat per Rubes et al. 2002). Per tant, per realitzar una anàlisi més fiable de diploïdia es convenient la utilització, de manera simultània, de 3 o més sondes de FISH presents en 2 o més cromosomes (Bosch 2001, 2003).

## 4.2. Variabilitat interindividual en la freqüència d'anomalies cromosòmiques

Els 10 individus analitzats van mostrar diferències interindividuais en la freqüència d'anomalies cromosòmiques presents en l'espermatozoide, tal i com va indicar l'anàlisi estadístic amb el model GEE, que inclou la variabilitat interindividual dins dels paràmetres d'anàlisi. La gran majoria d'estudis en espermatozoides han descrit també variabilitat interindividual en individus control (revisat per Templado et al. 2011) i en sèries d'edat, tant per anomalies numèriques (Martin et al. 1995; Robbins et al. 1995; Griffin et al. 1995; Kinakin et al. 1997; McInnes et al. 1998; Rousseaux et al. 1998; Bosch et al. 2001 i 2003; Slotter et al. 2007) com per anomalies estructurals (Bosch et al. 2003; McInnes et al. 1998; Slotter et al. 2007). El cromosoma 21 i els cromosomes sexuals, són dels més estudiats en sèries control i d'edat, presentant un interval de disomia, entre els diferents estudis, de 0,03% a 0,37% pel cromosoma 21 i de 0,11% a 0,43% pels cromosomes sexuals (revisat per Templado et al. 2011). Aquesta variabilitat interindividual també s'ha observat en cèl·lules meiótiques (espermatòcits I) en individus fèrtils, on es va determinar que el percentatge d'aneuploidia dels cromosomes sexuals variava de 3,2% fins a 43,7% (Uroz et al. 2011).

S'ha descrit l'existència d'individus a la població general amb una major predisposició a la producció d'espermatozoides disòmics. Rubes i col·laboradors (2005) van estudiar els mateixos 10 donants 3 vegades, durant un període de 5 anys, i van descriure en 3 donants un increment de disomia del cromosoma 18 respecte la freqüència de disomia que presentaven els altres individus. Aquests valors incrementats d'aneuploidia per un cromosoma determinat en un mateix individu, han sigut definits com variants estables. Tempest i col·laboradors (2009) van identificar freqüències incrementades de disomia pels cromosomes 13 i 21 en 10 individus que van ser analitzades 4 vegades en 18 mesos. Aquest podria ser el cas del nostre individu codificat com C8, que sent un individu jove presenta un dels percentatges de disomia i diploidia més elevats en el grup <40 anys. Malauradament, és l'únic individu que no es poden contrastar els resultats obtinguts en aquest treball amb estudis previs del nostre grup, ja que no estava inclòs en la sèrie anterior (Bosch et al. 2001, 2003). La existència de mosaïcisme germinal amb diferents línies cel·lulars en el testicle seria una possible explicació de l'increment de disomia i diploidia present en el donant C8.

La comparació dels resultats obtinguts entre diferents laboratoris amb la tècnica de FISH en espermatozoides és difícil per la manca d'estandarització de les tècniques i per la variabilitat interindividual. Les diferències en l'aplicació de la tècnica de FISH que podrien interferir en l'anàlisi de les senyals fluorescents inclou la descondensació del nucli de l'espermatozoide, el número d'espermatozoides totals analitzats, els criteris de recompte i la experiència de la persona que fa el recompte, la especificitat de les sondes utilitzades en la hibridació i la possible existència de polimorfismes, entre altres (Egozcue et al. 1997). A aquesta manca d'estandarització de la tècnica, caldria afegir que en cada laboratori s'han estudiat diferents cromosomes en diferents individus, en diferents moments i diferent mostra de semen.

### 4.3. Anomalies cromosòmiques en espermatozoides d'individus de la població

En aquest apartat discutirem els resultats obtinguts en el conjunt dels 10 individus analitzats en aquest treball, sense separar-los en grups d'edat.

#### 4.3.1. Freqüència de disomia i diploïdia

Un dels objectius del nostre treball va ser determinar la freqüència de disomia de 19 cromosomes (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 18, 21 i 22, X, Y) i de diploïdia en una única mostra de semen per individu, per minimitzar la variabilitat intraindividual.

En general, el percentatge de disomia per cromosoma obtingut en aquest estudi és inferior al d'altres sèries utilitzant la tècnica de FISH (revisat per Templado i col, 2005, 2011, 2013) (veure taula 18), probablement degut a la utilització d'un major nombre de sondes per cromosoma e hibridació en el present estudi. Per exemple,

**Taula 18.** Percentatges de disomia per cromosoma i de diploïdia en espermatozoides d'individus control, analitzats amb la tècnica de FISH i percentatges de disomia i diploïdia obtinguts en el nostre treball.

	% Disomia															% Diploïdia
	1	2	3	4	6	7	8	9	12	13	15	18	21	22	XY <sup>b</sup>	
Series control <sup>a</sup>	,08	,09	,20	,08	,04	,06	,03	,16	,14	,12	,10	,06	,17	,47	,27	0,19
Present treball	,07	,06	,03	,02	,03	,00	,10	,07	,06	,05	,05	,01	,08	,08	,19	0,24

<sup>a</sup> Dades recollides de sèries control amb un mínim de 5 donants i 10.000 espermatozoides per individu (revisat per Templado i col, 2005, 2011, 2013)

<sup>b</sup> Inclou la disomia XX, YY i XY

en el nostre cas la taxa de disomia del cromosoma 21 va ser de 0,08% (rang de 0,00%-0,20%) molt similar a la descrita recentment per Iwarsson i col·laboradors (2015) (0,13%, rang de 0,00%-0,25%), fent servir les mateixes sondes (una sonda LSI i una sonda telomèrica) pel cromosoma 21.

Els 17 autosomes analitzats en aquest treball mostren una freqüència de disomia similar, excepte els cromosomes 7 i 18 que presenten una menor freqüència envers la resta d'autosomes. Aquests dos autosomes també presenten una freqüència

mitjana reduïda en individus control (veure taula 18). La baixa freqüència de disomia 18 observada en espermatozoides estaria d'acord amb que el 92% dels casos de trisomia 18 presenten un origen matern (revisat per Hassold et al. 2007).

Pel que fa a la incidència de la disomia dels cromosomes sexuals, va ser aproximadament el doble de la mitjana de disomia autosòmica. Aquest increment d'aneuploïdia sexual envers la dels autosomes ja s'ha reportat en estudis anteriors de cariotips d'espermatozoides (Martin i Rademaker 1990) i en la majoria d'estudis de FISH (Martin et al. 1996; revisat per Templado et al. 2013), els quals descriuen una incidència de disomia sexual 2 o 3 vegades major que la observada en autosomes.

Dintre del grup de disomies sexuals, la freqüència de disomia XY és la més alta, mentre que la de disomia XX és la més baixa. El parell cromosòmic XY presenta una regió d'aparellament de les més petites dels cromosomes i normalment mostra un únic quiasma durant la meiosi I (Laurie i Hultén 1985), que incrementa la susceptibilitat a la no disjunció, ja que aquest únic quiasma es necessari per orientar correctament els cromosomes homòlegs en el fus acromàtic durant l'anafase I. En un estudi meiòtic d'espermatòcits d'homes fèrtils s'ha descrit un increment d'univalents formats pel parell cromosòmic XY en metafase I i un augment d'espermatòcits disòmics en metafase II enfront espermatòcits I (Uroz i Templado 2012), suggerint que els cromosomes sexuals són més propensos a errors meiòtics que els autosomes. Segons aquests autors, la disomia s'origina principalment per la segregació incorrecta de bivalents durant l'anafase I, mitjançant dos mecanismes principals: no disjunció aquiasmàtica i separació prematura de cromàtides germanes.

El percentatge de diploïdia obtingut en aquest estudi és similar a la mitjana d'altres sèries de FISH. El disseny del nostre treball ha permès, per primera vegada, la comparació de la freqüència de diploïdia detectada per cada alíquota (4-5 sondes/alíquota) a cada donant. Les alíquotes 4 (4p, 4q, 21q i LSI 21) i 9 (9p, 9q, 17cen i 17q) van presentar nivells de diploïdia incrementats respecte a la mitjana de la resta d'alíquotes. Aquestes dades suggereixen, a l'igual que altres treballs (Finch et al. 2008), que la combinació de sondes podria afectar els resultats de la tècnica de FISH. No es pot desestimar la possibilitat de que les diferències en la freqüència de cada alíquota siguin degudes el número d'espermatozoides analitzats per

alíquota (1.000 espermatozoides) o a la inclusió d'espermatozoides dobles disòmics com diploides.

#### 4.3.2. Freqüència d'anomalies estructurals

En el total dels 10 individus, la mitjana d'anomalies estructurals va ser de 5,8%, similar a la obtinguda amb la tècnica de hámster-humà (6,6%) (revisat per Estop et al. 1995) i amb la tècnica de FISH en nuclis d'espermatozoide, extrapolant les dades del cromosoma 1 a tot el genoma (4,4-6,1%) (Schmid et al. 2004). Encara que el nostre estudi només detecta les anomalies desequilibrades (duplicacions i delecions) dels autosomes i la tècnica de hámster-humà detecta tant anomalies equilibrades com desequilibrades, el percentatge d'anomalies estructurals equilibrades en caps d'espermatozoides és molt baix (Martin et al. 1987; Brandriff et al. 1988; Benet et al. 1992; Estop et al. 1995).

La detecció d'anomalies estructurals en espermatozoides d'individus control, mitjançant la tècnica de FISH, únicament s'ha portat a terme en dos cromosomes: el cromosoma 1 (Van Hummelen et al. 1996; McInnes et al. 1998; Baumgartner et al. 1999; Schmid et al. 2004; Slotter et al. 2000, 2007) i el 9 (Bosch et al. 2003). A la taula 19 es comparen la freqüència d'anomalies estructurals per aquest dos cromosomes observades en el present treball i les reportades per altres grups. Pel

**Taula 19.** Anomalies estructurals dels cromosomes 1 i 9 analitzades amb FISH en individus de la població general

Autors	% anomalies estructurals	
	cromosoma 1	cromosoma 9
Van Hummelen et al. 1996	0,06	-
McInnes et al. 1998	0,55	-
Baumgartner et al. 1999	0,13	-
Slotter et al. 2000	0,10	-
Bosch et al. 2003	-	0,39
Schmid et al. 2004	0,22	-
Slotter et al. 2007	0,17	-
<i>Present treball</i>	0,43	0,36

cromosoma 1, el cromosoma més estudiat, el percentatge disomia observat per nosaltres (0,43%) es troba dintre de l'interval descrit per altres autors (de 0,06% a 0,55%) (Baumgartner et al. 1999; Bosch et al. 2003; Van Hummelen et al. 1996; McInnes et al. 1998; Schmid et al. 2004; Slotter et al. 2000, 2007) . Les duplicacions i delecions del cromosoma 9 detectades en el nostre estudi només es poden comparar amb els obtinguts anteriorment pel nostre grup (Bosch et al. 2003), comparació ja feta en l' apartat 4.

La distribució de les duplicacions i delecions al llarg dels cromosomes no és lineal, hi ha una tendència cap a un increment d'anomalies estructurals en els cromosomes més grans, encara que no tots els cromosomes presenten una proporció directa entre el número d'anomalies i la seva longitud. En el total dels 10 individus, els cromosomes 19 i 20 presentaven un excés d'anomalies estructurals, mentre que el 3 i 6 mostraven menys anomalies de les esperades. En cariotips d'espermatozoides, els cromosomes amb major nombre d'anomalies estructurals són el 1 (Van Hummelen et al. 1996; McInnes et al. 1998; Baumgartner et al. 1999; Schmid et al. 2004; Slotter et al. 2000, 2007) i el 9 (Brandriff et al. 1988), mentre que el cromosoma 4 presenta un menor nombre (Estop et al. 1995), encara que les dades varien en els diferents laboratoris.

En tots els donants, tant en els joves com els d'edat avançada, la incidència de duplicacions era major que la de delecions, i estava incrementada en tots els braços cromosòmics analitzats, excepte en 2p, 3q, 4p, 7p, 8p i 19q. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts en sèries d'edat (Slotter et al. 2007) i en sèries d'individus control (Baumgartner et al. 1999; Van Hummelen et al. 1996; Slotter et al. 2000).

#### **4.4. Efecte de la edat paterna en les anomalies cromosòmiques de l'espermatozoide**

La majoria d'estudis que analitzen anomalies cromosòmiques en l'espermatozoide no van estar dissenyats per estudiar l'efecte de l'edat en les anomalies cromosòmiques presents en l'espermatozoide. Les sèries dissenyades específicament per estudiar l'efecte de l'edat paterna són escasses, sobretot, les que contenen individus majors de 60 anys (revisat per Templado et al. 2011).

Fins el moment, aquest és l'únic treball que estudia l'efecte de l'edat paterna en la disomia (19 cromosomes), diploidia i anomalies estructurals (22 autosomes), analitzats a la mateixa vegada en una única mostra de semen per donant, per minimitzar la variabilitat intraindividual i optimitzar la tècnica de FISH. Es van seleccionar donants joves (<40 anys) i donants d'edat avançada (≥60 anys) per tal de posar de manifest un possible efecte de l'edat.

##### *4.4.1. No efecte de l'edat paterna en les anomalies cromosòmiques numèriques*

Els nostres resultats mostren una disminució en la freqüència de disomia dels autosomes amb l'edat però sense arribar a la significació estadística. Altres autors amb la tècnica de hámster-humà també van observar una menor freqüència de disomia en homes d'edat avançada (Martin et al. 1987). D'acord amb aquests resultats, a recent estudi retrospectiu de nens amb trisomia 13, 18 i 21 suggereix que els pares més joves tenen un major risc de descendència aneuploid (Steiner et al. 2015).

Cap dels 17 autosomes analitzats en aquest treball han presentat un increment de la freqüència de disomia amb l'edat paterna. La majoria d'estudis de FISH on analitzen un possible efecte de l'edat paterna tampoc han mostrat cap associació entre l'edat i en els nivells de disomia en 6 dels 9 autosomes estudiats en l'espermatozoide (revisat per Buwe et al. 2005): 6 (Bosch et al. 2001), 8 (Robbins et al. 1995), 12 (Martin et al. 1995), 13 (McInnes et al. 1998), 14 (Rousseaux et al. 1998), i el 18 (Griffin et al. 1995). Només tres treballs han descrit un lleuger augment de disomia per als cromosomes 1 (Martin et al. 1995), 9 (Bosch et al. 2001) i 21 (Rousseaux et al. 1998) amb l'edat paterna.

En estudis d'aneuploïdia en l'espermatozoide (revisat per Templado et al. 2011) els autosomes amb percentatges més alts disomia són el cromosoma 21 (0,17%) i el



22 (0,47%, basat només en dos estudis). En el present treball, la freqüència de disomia pels cromosomes 21 i 22 s'incrementava amb l'edat, encara que aquests increments no va ser estadísticament significatius. Globalment, la disomia 21 és aproximadament la meitat de disomia dels cromosomes sexuals (0,08% vs 0,19%), d'acord amb les dades publicades en la literatura (revisat per Templado et al. 2011), però no està clar, segons les nostres dades i les de la majoria de autors, que l'edat paterna avançada sigui un factor de risc per la trisomia 21.

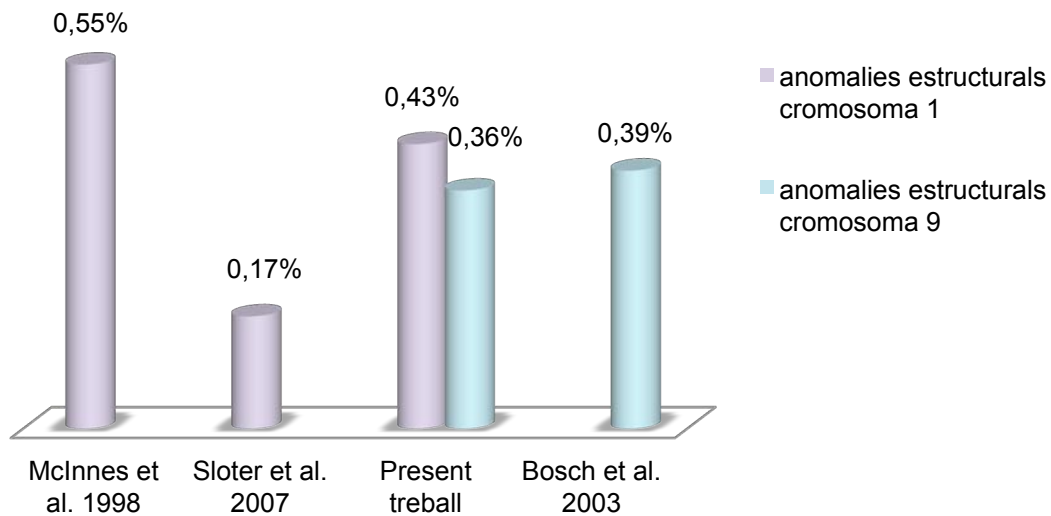
Els nostres resultats mostren que, encara que la incidència de la disomia dels cromosomes sexuals és més alta que la disomia autosòmica, aquest increment no està relacionat amb l'edat paterna avançada. Els nostres resultats coincideixen amb els descrits en altres sèries d'edat (Martin et al. 1995; Robbins et al. 1995; Kinakin et al. 1997; Guttenbach et al. 2000; Bosch et al. 2001, 2003; Luetjens et al. 2002). No obstant això, altres autors van descriure un efecte de l'edat en la disomia XX (Griffin et al. 1995; Robbins et al. 1995), disomia YY (Griffin et al. 1995; Kinakin et al. 1997; Martin et al. 1995; Robbins et al. 1995) i disomia XY (Griffin et al. 1995). Els resultats sobre la disomia sexual i l'edat paterna segueixen sent contradictoris a causa, al menys en part, de les variacions interindividuais (Guttenbach et al. 2000). La incidència de la disomia dels cromosomes sexuals va ser aproximadament el doble de la mitjana de disomia autosòmica en ambdós grups d'edat i quan s'estudien a tots els donants col·lectivament. Aquest increment de disomia dels cromosomes sexuals, versus la disomia autosòmica, ja va ser descrita en cariotips d'espermatozoides (Martin i Rademaker 1990) i en nombrosos estudis de FISH (revisat per Templado et al. 2011, 2013), on la majoria dels autors observen que la no disjunció dels cromosomes sexuals és 2-3 vegades més freqüent que la autosòmica.

Estudis d'espermatòcits en ratolins de diferents edats (Vrooman et al. 2014) van observar un increment d'errors sinàptics del par XY amb l'edat, suggerint que els espermatòcits I amb errors sinàptics són eliminats en el punt de control de paquità i, per tant, no són detectats en meiosi II. Estudis meiòtics en humans van determinar que els cromosomes sexuals poden ser més propensos a segregarse inadequadament durant la meiosi mitjançant la no disjunció aquiasmàtica i la separació prematura de cromàtides germanes (PSSC) (Uroz et al. 2011; Uroz i Templado 2012).

Els nostres resultats van mostrar que l'edat paterna no afecta a la freqüència de diploïdia. La majoria dels estudis publicats que analitzen l'efecte de l'edat paterna rares vegades analitzen la diploïdia. Del total de treballs que estudien un possible efecte de l'edat en la freqüència de diploïdia, quatre no observen una associació de la diploïdia amb l'edat paterna (Griffin et al. 1995; Martin et al. 1995; Luetjens et al. 2002; revisat per Buwe et al. 2005 i Fonseka i Griffin 2011) i un descriu una disminució de la diploïdia amb l'edat (Robbins et al. 1995). Dos estudis anteriors realitzats pel nostre grup en espermatozoides de 18 donants amb edats compreses entre 18 i 74 anys (Bosch et al. 2001, 2003), van mostrar un increment lineal de diploïdia amb l'edat. El present treball comparteix 9 donants amb aquests dos estudis. No obstant, no està inclòs un donant jove (C8) que presenta un alt percentatge de diploïdia, ni tampoc tres donants d'edat avançada dels estudis anteriors (Bosch et al. 2001, 2003) que presentaven un alt percentatge de diploïdia. Aquesta selecció de donants pot haver contribuït, junt a la utilització del panel sondes TelVysion, a les diferències en els percentatges de diploïdia i posa de manifest la dificultat de comparar resultats de FISH obtinguts en diferents sèries i laboratoris.

#### ***4.4.2. Increment de les anomalies cromosòmiques estructurals amb l'edat paterna***

El grup de donants  $\geq 60$  anys presenta un percentatge major d'anomalies estructurals (6,6%) que el grup  $< 40$  anys (4,9%). De manera similar, la resta d'estudis amb FISH (cada estudi analitza un sol cromosoma). en sèries d'edat han descrit un increment de duplicacions i delecions associades a l'edat paterna per cromosomes 1 (McInnes et al. 1998; Slotter et al. 2007) i 9 (Bosch et al. 2003) (Figura 13). Malauradament, amb la tècnica de FISH no es pot determinar el tipus específic d'anomalia estructural que va originar les duplicacions i delecions detectades en nuclis d'espermatozoide. Amb la tècnica de hámster-humà, diversos autors han descrit un increment de trencaments cromosòmics (Martin i Rademaker 1999) i de fragments acèntrics (Prestes Sartorelli et al. 2001) amb l'edat del donants. Altres autors. utilitzant la mateixa tècnica, únicament van observar una tendència a l'increment de de trencaments cromosòmics i/o fragments acèntrics amb l'edat (Estop et al. 1995; Brandriff et al. 1985; Rosenbusch et al. 1993; revisat per Buwe et al. 2005).



**Figura 13.** Percentatge d'anomalies estructurals dels cromosomes 1 i 9 en sèries d'edat utilitzant la tècnica de FISH

En el nostre treball, les duplicacions són més freqüents en el grup  $\geq 60$  anys, respecte als més joves, mentre que les delecions presenten una tendència a l'increment, sense arribar a la significació. En ambdós grups la proporció de duplicacions i delecions va ser molt similar (2:1 en grup  $< 40$  anys i 2:2 en grup  $\geq 60$  anys). L'excés de duplicacions en nuclis interfàsics podria correspondre a l'excés de fragments acèntrics descrit en cariotips d'espermatozoides (Brandriff et al. 1985; Martin et al. 1987; Benet et al. 1992; Rosenbusch et al. 1993; Estop et al. 1995; Prestes Sartorelli et al. 2001) i en metafase I d'espermatòcits (Uroz et al. 2011). Els fragments acèntrics podrien ser rescatats, mitjançant la formació d'un neocentròmer, o bé podrien perdre's (Warburton et al. 2004). Al contrari que en espermatozoides, estudis de FISH en pacients amb trastorns del desenvolupament van detectar més delecions subtelomèriques *de novo* que duplicacions subtelomèriques (Ravnán et al. 2006). Un factor que podria contribuir a explicar aquestes diferències en estudis clínics podria ser que les duplicacions s'associen a fenotips més lleus que passen desapercibuts a la població.

Les anomalies estructurals no recurrents semblant ser més afectades per la edat paterna que las recurrents. El 96% de les translocacions recíproques equilibrades *de novo* no recurrents són d'origen patern, mostren un fort efecte de l'edat paterna, suggerint un origen mitòtic durant la fase d'espermatogònia (Thomas et al. 2010).

En canvi, la freqüència de la translocació t(11;22) *de novo* recurrent, analitzada en espermatozoides, és independent de l'edat del donant i s'originaria durant la meiosi (Kato et al. 2007). De manera similar, CNVs *de novo* no recurrents originades per diversos mutàgens en cèl·lules mitòtiques són més freqüents a la descendència de pares d'edat avançada (Conover i Argueso 2016). Els estudis de FISH no poden corroborar aquest resultat degut a que no poden distingir entre anomalies estructurals recurrents i no recurrents.

La relació entre anomalies estructurals i edat paterna podria ser causada per l'alt número de divisions a l'any de les espermatogònies, degut a una disminució en la eficiència dels mecanismes de reparació del DNA, acumulant-se DNA danyat per l'exposició a factors mediambientals (Martin et al. 1987). Aquests factors poden ser externs, coneguts com a mutàgens, o interns, com seria el progressiu deteriorament de l'ambiental testicular en homes d'edat avançada (Egozcue et al. 2000; Mroz et al. 1999). L'increment d'anomalies estructurals amb l'edat també podria ser el resultat d'un augment en la freqüència de lesions originades durant la espermatogènesi, degut a l'absència de mecanismes de reparació de l'DNA en les espermatides i en els espermatozoides (Estop et al. 1995; Marchetti et al. 2015).

El nombre de divisions de les espermatogònies s'acumula amb l'edat (fins 840 divisions en homes de 50 anys), incrementant les possibilitats de dany en el DNA. Errors en la replicació del DNA de les espermatogònies durant les nombroses divisions mitòtiques abans d'entrar a la meiosi pot contribuir a l'aparició de reorganitzacions *de novo* (Crow 2000).

Els espermatozoides són cèl·lules extremadament susceptibles a l'acumulació de lesions en l'ADN a causa de la disminució de la capacitat de reparació del DNA durant l'espermiogènesi. S'ha descrit un increment de fragmentació del DNA en espermatozoides de pacients inclosos en programes d'injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI) amb l'edat (Tarozzi et al. 2007). Aquest increment de DNA fragmentat amb l'edat podria ser conseqüència de l'estrès oxidatiu, processos apoptòtics defectuosos i de la presència d'anomalies meiòtiques durant l'espermatogènesi. García-Peiró i col·laboradors (2011) van determinar que la fragmentació de DNA podria interferir en l'arquitectura nuclear de l'espermatozoide, dificultant l'accés dels mecanismes de reparació del DNA. D'aquesta manera, augmentaria la susceptibilitat de lesions en el DNA que podrien no reparar-se.

Estudis en ratolins on s'indueixen lesions en el DNA durant la meiosi masculina, determinen que les lesions no reparades durant l'espermatogènesi persistien després de la fecundació. Aquestes lesions no reparades que persisteixen poden ser mal reparades pels sistemes de reparació de l'oòcit, donant lloc a un zigot amb anomalies estructurals (Marchetti et al. 2015).





1. Introducció

2. Material i Mètodes

3. Resultats

4. Discussió

**5. Conclusions**

6. Bibliografia





1. La tècnica de FISH amb el panel de sondes *ToTelVysion* ens ha permès, per primera vegada en espermatozoides, l'avaluació simultània d'anomalies numèriques i estructurals de la majoria dels cromosomes en un únic assaig, reduint així la variabilitat intradonant i optimitzant l'anàlisi de FISH. A més, aquesta tècnica proporciona un major control intern de recompte de senyals, sent més restrictiva que tècniques prèviament utilitzades.
2. Els nivells incrementats de diploïdia en dues alíquotes, de les deu utilitzades en aquest treball, podria indicar que algunes combinacions de sondes alteren els resultats obtinguts amb la tècnica de FISH. Aquest primer estudi és preliminar i hauria de corroborar-se amb estudis similars per arribar a conclusions definitives sobre les limitacions dels estudis de FISH.
3. Les variacions intra i interindividuais, no atribuïbles a l'edat, descrites en la nostra sèrie i en la majoria de sèries de FISH, dificulten la comparació dels resultats obtinguts amb aquesta tècnica en diferents laboratoris i, fins i tot, els obtinguts en el mateix laboratori, si els individus analitzats no són els mateixos.
4. No s'ha detectat cap increment en els nivells de disomia ni diploïdia associat a l'edat paterna avançada, d'acord a la menor contribució paterna a l'origen de gran part de les trisomies. L'aneuploïdia dels cromosomes sexuals és més comú que la dels autosomes i aquesta relació no canvia amb l'edat.
5. La distribució de duplicacions i delecions no és lineal al llarg dels cromosomes, encara que es va observar una tendència cap a una freqüència més alta d'anomalies en els cromosomes més grans. Els nostres resultats demostren un excés de duplicacions enfront de delecions en els dos grups d'edat amb una proporció de 2 a 1.
6. La freqüència d'anomalies cromosòmiques estructurals (delecions i duplicacions) en l'espermatozoide incrementa amb l'edat paterna. Aquests resultats reforcen l'origen majoritàriament patern de les anomalies estructurals *de novo* descrit prèviament en estudis epidemiològics i en cariotips d'espermatozoide.

7. A partir dels resultats citogenètics descrits en l'espermatozoide i els obtinguts en altres treballs recents que associen l'edat paterna amb un major risc de malalties mendelianes, autisme i trastorns psiquiàtrics, l'edat avançada del baró hauria de tenir-se en compte en la pràctica mèdica, sobretot en l'assessorament i prevenció de malalties genètiques i en programes de reproducció assistida.





1. Introducció

2. Material i Mètodes

3. Resultats

4. Discussió

5. Conclusions

**6. Bibliografia**



**A**

**Abruzzo, M. A. and T. J. Hassold. 1995.** "Etiology of Nondisjunction in Humans." *Environmental and molecular mutagenesis* 25 Suppl 2:38–47.

**B**

**Balhorn, R. 1982.** "A Model for the Structure of Chromatin in Mammalian Sperm." *The Journal of cell biology* 93(2):298–305.

**Baumgartner, A., P. Van Hummelen, X. R. Lowe, I. D. Adler, and A. J. Wyrobek. 1999.** "Numerical and Structural Chromosomal Abnormalities Detected in Human Sperm with a Combination of Multicolor FISH Assays." *Environmental and molecular mutagenesis* 33(1):49–58.

**Benet, J. et al. 1989.** "Expression of Fragile Sites in Human Sperm and Lymphocyte Chromosomes." *Human genetics* 81(3):239–42.

**Benet, J., A. Genescà, J. Navarro, J. Egozcue, and C. Templado. 1992.** "Cytogenetic Studies in Motile Sperm from Normal Men." *Human genetics* 89(2):176–80.

**Blanco, J., C. Rubio, C. Simon, J. Egozcue, and F. Vidal. 1997.** "Increased Incidence of Disomic Sperm Nuclei in a 47,XYY Male Assessed by Fluorescent in Situ Hybridization (FISH)." *Human genetics* 99(3):413–16.

**Bosch, M., O. Rajmil, O. Martínez-Pasarell, J. Egozcue, and C. Templado. 2001.** "Linear Increase of Diploidy in Human Sperm with Age: A Four-Colour FISH Study." *European journal of human genetics : EJHG* 9(7):533–38.

**Bosch, Mercè, Osvaldo Rajmil, Josep**

**Egozcue, and Cristina Templado. 2003.** "Linear Increase of Structural and Numerical Chromosome 9 Abnormalities in Human Sperm Regarding Age." *European journal of human genetics : EJHG* 11(10):754–59.

**Brandriff, B. et al. 1985.** "Chromosomes of Human Sperm: Variability among Normal Individuals." *Human genetics* 70(1):18–24.

**Brandriff, B. F., L. A. Gordon, D. Moore, and A. V Carrano. 1988.** "An Analysis of Structural Aberrations in Human Sperm Chromosomes." *Cytogenetics and cell genetics* 47(1-2):29–36.

**Brandriff, B. F., L. A. Gordon, and A. V Carrano. 1990.** "Cytogenetics of Human Sperm: Structural Aberrations and DNA Replication." *Progress in clinical and biological research* 340B:425–34.

**Brar, Gloria A. and Angelika Amon. 2008.** "Emerging Roles for Centromeres in Meiosis I Chromosome Segregation." *Nature reviews. Genetics* 9(12):899–910.

**Bray, Isabelle, David Gunnell, GD Smith, and George Davey Smith. 2006.** "Advanced Paternal Age: How Old Is Too Old?" *Journal of epidemiology and community health* 60(10):851–53.

**Burke, D. J. 2000.** "Complexity in the Spindle Checkpoint." *Current opinion in genetics & development* 10(1):26–31.

**Buwe, A., M. Guttenbach, and M. Schmid. 2005.** "Effect of Paternal Age on the Frequency of Cytogenetic Abnormalities in Human Spermatozoa." *Cytogenetic and genome research* 111(34):213–28.



**C**

---

**Conover, Hailey N. and Juan Lucas Argueso. 2016.** "Contrasting Mechanisms of de Novo Copy Number Mutagenesis Suggest the Existence of Different Classes of Environmental Copy Number Mutagens." *Environmental and molecular mutagenesis* 57(1):3–9.

**Croen, Lisa A., Daniel V Najjar, Bruce Fireman, and Judith K. Grether. 2007.** "Maternal and Paternal Age and Risk of Autism Spectrum Disorders." *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 161(4):334–40.

**Crow, J. F. 2000.** "The Origins, Patterns and Implications of Human Spontaneous Mutation." *Nature reviews. Genetics* 1(1):40–47.

**D**

---

**De Souza, E. and J. K. Morris. 2010.** "Case-Control Analysis of Paternal Age and Trisomic Anomalies." *Archives of disease in childhood* 95(11):893–97.

**D'Onofrio, Brian M. et al. 2014.** "Paternal Age at Childbearing and Offspring Psychiatric and Academic Morbidity." *JAMA Psychiatry* 71(4):432.

**Downie, S. E., S. P. Flaherty, N. J. Swann, and C. D. Matthews. 1997.** "Estimation of Aneuploidy for Chromosomes 3, 7, 16, X and Y in Spermatozoa from 10 Normospermic Men Using Fluorescence in-Situ Hybridization." *Molecular human reproduction* 3(9):815–19.

**E**

---

**Egozcue, J., J. Blanco, and F. Vidal.**

**1997.** "Chromosome Studies in Human Sperm Nuclei Using Fluorescence in-Situ Hybridization (FISH)." *Human reproduction update* 3(5):441–52.

**Egozcue, S. et al. 2000.** "Human Male Infertility: Chromosome Anomalies, Meiotic Disorders, Abnormal Spermatozoa and Recurrent Abortion." *Human reproduction update* 6(1):93–105.

**Estop, A. M. et al. 1991.** "Cytogenetic studies in human sperm." *Human Genetics* Aug;87(4):447-51.

**Estop, A. M. et al. 1995.** "An Analysis of Human Sperm Chromosome Breakpoints." *American journal of human genetics* 56(2):452–60.

**Estop, A. M. et al. 2000.** "Is There an Interchromosomal Effect in Reciprocal Translocation Carriers? Sperm FISH Studies." *Human genetics* 106(5):517–24.

**F**

---

**Finch, K. A. et al. 2008.** "Nuclear Organization in Human Sperm: Preliminary Evidence for Altered Sex Chromosome Centromere Position in Infertile Males." *Human reproduction (Oxford, England)* 23(6):1263–70.

**Fisher, J. M., J. F. Harvey, N. E. Morton, and P. A. Jacobs. 1995.** "Trisomy 18: Studies of the Parent and Cell Division of Origin and the Effect of Aberrant Recombination on Nondisjunction." *American journal of human genetics* 56(3):669–75.

**Fonseka, K. G. L. and D. K. Griffin. 2011.** "Is There a Paternal Age Effect for Aneuploidy?" *Cytogenetic and Genome Research* 133(2-4):280–91.

## G

**García-Cruz, R. et al. 2010.** "Cytogenetic Analyses of Human Oocytes Provide New Data on Non-Disjunction Mechanisms and the Origin of Trisomy 16." *Human reproduction (Oxford, England)* 25(1):179–91.

**García-Peiró, A. et al. 2011.** "Dynamics of Sperm DNA Fragmentation in Patients Carrying Structurally Rearranged Chromosomes." *International journal of andrology* 34(6 Pt 2):e546–53.

**Griffin, D. K. et al. 1995.** "Non-Disjunction in Human Sperm: Evidence for an Effect of Increasing Paternal Age." *Human molecular genetics* 4(12):2227–32.

**Gu, Wenli, Feng Zhang, and James R. Lupski. 2008.** "Mechanisms for Human Genomic Rearrangements." *PathoGenetics* 1(1):4.

**Guttenbach, M., R. Schakowski, and M. Schmid. 1994.** "Incidence of Chromosome 3, 7, 10, 11, 17 and X Disomy in Mature Human Sperm Nuclei as Determined by Nonradioactive in Situ Hybridization." *Human genetics* 93(1):7–12.

**Guttenbach, M., F. M. Köhn, W. Engel, and M. Schmid. 2000.** "Meiotic Nondisjunction of Chromosomes 1, 17, 18, X, and Y in Men More than 80 Years of Age." *Biology of reproduction* 63(6):1727–29.

## H

**Hall, Heather, Patricia Hunt, and Terry Hassold. 2006.** "Meiosis and Sex Chromosome Aneuploidy: How Meiotic Errors Cause Aneuploidy; How Aneuploidy Causes Meiotic Errors." *Current Opinion in Genetics & Development* 16(3):323–29.

**Hall, Heather E. et al. 2007.** "The Origin of Trisomy 22: Evidence for Acrocentric Chromosome-Specific Patterns of Nondisjunction." *American journal of medical genetics. Part A* 143A(19):2249–55.

**Hassold, T. J. 1991a.** "Molecular Studies of Non-Disjunction in Trisomy 16." *Journal of medical genetics* 28(3):159–62.

**Hassold, T. J. 1991b.** "XY Chromosome Nondisjunction in Man Is Associated with Diminished Recombination in the Pseudoautosomal Region." *American journal of human genetics* 49(2):253–60.

**Hassold, T. J. 1998.** "Nondisjunction in the Human Male." *Current topics in developmental biology* 37:383–406.

**Hassold, Terry, Stephanie Sherman, and Patricia Hunt. 2000.** "Counting Cross-Overs: Characterizing Meiotic Recombination in Mammals." *Human Molecular Genetics* 9(16):2409–19.

**Hassold, T. and P. Hunt. 2001.** "To Err (Meiotically) Is Human: The Genesis of Human Aneuploidy." *Nature reviews. Genetics* 2(4):280–91.

**Hassold, T., H. Hall, and P. Hunt. 2007.** "The Origin of Human Aneuploidy: Where We Have Been, Where We Are Going." *Human Molecular Genetics* 16(R2):R203–8.

**Hodges, Craig A., Ekaterina Revenkova, Rolf Jessberger, Terry J. Hassold, and Patricia A. Hunt. 2005.** "SMC1 $\beta$ -Deficient Female Mice Provide Evidence That Cohesins Are a Missing Link in Age-Related Nondisjunction." *Nature Genetics* 37(12):1351–55.

**Holubcová, Zuzana, Martyn Blayney, Kay Elder, and Melina Schuh. 2015.**

“Human Oocytes. Error-Prone Chromosome-Mediated Spindle Assembly Favors Chromosome Segregation Defects in Human Oocytes.” *Science (New York, N.Y.)* 348(6239):1143–47.

**Hook, Ernest B. and Dorothy Warburton. 2014.** “Turner Syndrome Revisited: Review of New Data Supports the Hypothesis That All Viable 45,X Cases Are Cryptic Mosaics with a Rescue Cell Line, Implying an Origin by Mitotic Loss.” *Human genetics* 133(4):417–24.

**Hunt P.A. and Hassold T.J. 2002.** “Sex matters in meiosis.” *Science Jun 21;296 (5576):2181-3.*

**I**  
**Iwarsson, Erik, Ulrik Kvist, and Maj A. Hultén. 2015.** “Disomy 21 in Spermatozoa and the Paternal Origin of Trisomy 21 Down Syndrome.” *Molecular cytogenetics* 8(1):67.

**J**  
**Jacobs, P. A. 1981.** “Mutation Rates of Structural Chromosome Rearrangements in Man.” *American journal of human genetics* 33(1):44–54.

**Jacobs, P. a and T. J. Hassold. 1995.** “The Origin of Numerical Chromosome Abnormalities.” *Advances in genetics* 33:101–33.

**Jacobs, P. et al. 1997.** “Turner Syndrome: A Cytogenetic and Molecular Study.” *Annals of human genetics* 61(Pt 6):471–83.

**K**  
**Kang, Hey Joo and Zev Rosenwaks. 2008.** “Triploidy - The Breakdown of

Monogamy between Sperm and Egg.” *International Journal of Developmental Biology* 52(July):449–54.

**Kato, Takema et al. 2007.** “Age Has No Effect on de Novo Constitutional t(11;22) Translocation Frequency in Sperm.” *Fertility and sterility* 88(5):1446–48.

**Kinakin, B., A. Rademaker, and R. Martin. 1997.** “Paternal Age Effect of YY Aneuploidy in Human Sperm, as Assessed by Fluorescence in Situ Hybridization.” *Cytogenetics and cell genetics* 78(2):116–19.

**Knight, S. J. et al. 2000.** “An Optimized Set of Human Telomere Clones for Studying Telomere Integrity and Architecture.” *American journal of human genetics* 67(2):320–32.

**Koehler, K. E. et al. 1996.** “Spontaneous X Chromosome MI and MII Nondisjunction Events in *Drosophila Melanogaster* Oocytes Have Different Recombinational Histories.” *Nature genetics* 14(4):406–14.

**Kurahashi, Hiroki et al. 2009.** “Recent Advance in Our Understanding of the Molecular Nature of Chromosomal Abnormalities.” *Journal of human genetics* 54(5):253–60.

**Kushnir, Vitaly A. and John L. Frattarelli. 2009.** “Aneuploidy in Abortuses Following IVF and ICSI.” *Journal of assisted reproduction and genetics* 26(2-3):93–97.

**L**  
**Lähdetie, J., M. Ajospenää-Saari, and J. Mykkänen. 1996.** “Detection of Aneuploidy in Human Spermatozoa of Normal Semen Donors by Fluorescence in Situ Hybridization.” *Environmental health*

*perspectives* 104 Suppl :629–32.

**Lamb, N. E., S. L. Sherman, and T. J. Hassold. 2005.** “Effect of Meiotic Recombination on the Production of Aneuploid Gametes in Humans.” *Cytogenetic and genome research* 111(3-4):250–55.

**Laurie, DA and MA Hultén. 1985.** “Further Studies on Chiasma Distribution and Interference in the Human Male.” *Ann Hum Genet.* 1985 Jul;49(Pt 3):203-14.

**Lieber, Michael R. 2010.** “The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway.” *Annual review of biochemistry* 79:181–211.

**Lorda-Sanchez, I., F. Binkert, M. Maechler, W. P. Robinson, and A. A. Schinzel. 1992.** “Reduced Recombination and Paternal Age Effect in Klinefelter Syndrome.” *Human genetics* 89(5):524–30.

**Luetjens, C. M., C. Rolf, P. Gassner, J. E. Werny, and E. Nieschlag. 2002.** “Sperm Aneuploidy Rates in Younger and Older Men.” *Human reproduction (Oxford, England)* 17(7):1826–32.

## M

**Malmanche N, Maia A, Sunkel CE. 2006.** “The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis”. *FEBS Lett.* may 22;580(12):2888-95.

**Marchetti, Francesco and Andrew J. Wyrobek. 2008.** “DNA Repair Decline during Mouse Spermiogenesis Results in the Accumulation of Heritable DNA Damage.” *DNA repair* 7(4):572–81.

**Marchetti, Francesco, Jack Bishop, John Gingerich, and Andrew J.**

**Wyrobek. 2015.** “Meiotic Interstrand DNA Damage Escapes Paternal Repair and Causes Chromosomal Aberrations in the Zygote by Maternal Misrepair.” *Scientific reports* 5:7689.

**Márquez, C., M. Sandalinas, M. Bahçe, M. Alikani, and S. Munné. 2000.** “Chromosome Abnormalities in 1255 Cleavage-Stage Human Embryos.” *Reproductive biomedicine online* 1(1):17–26.

**Martin, R. H., C. C. Lin, W. Balkan, and K. Burns. 1982.** “Direct Chromosomal Analysis of Human Spermatozoa: Preliminary Results from 18 Normal Men.” *American journal of human genetics* 34(3):459–68.

**Martin, R. H. et al. 1987.** “Variation in the Frequency and Type of Sperm Chromosomal Abnormalities among Normal Men.” *Human genetics* 77(2):108–14.

**Martin, R. H. and A. Rademaker. 1990.** “The Frequency of Aneuploidy among Individual Chromosomes in 6,821 Human Sperm Chromosome Complements.” *Cytogenetics and cell genetics* 53(2-3):103–7.

**Martin, R. H., E. Ko, and K. Chan. 1993.** “Detection of Aneuploidy in Human Interphase Spermatozoa by Fluorescence in Situ Hybridization (FISH).” *Cytogenetics and cell genetics* 64(1):23–26.

**Martin, R. H., E. Spriggs, E. Ko, and A. W. Rademaker. 1995.** “The Relationship between Paternal Age, Sex Ratios, and Aneuploidy Frequencies in Human Sperm, as Assessed by Multicolor FISH.” *American journal of human genetics* 57(6):1395–99.

**Martin, R. H., E. Spriggs, and A. W.**

**Rademaker. 1996.** "Multicolor Fluorescence in Situ Hybridization Analysis of Aneuploidy and Diploidy Frequencies in 225,846 Sperm from 10 Normal Men." *Biology of reproduction* 54(2):394–98.

**Martin, R. H. and A. W. Rademaker. 1999.** "Nondisjunction in Human Sperm: Comparison of Frequencies in Acrocentric Chromosomes." *Cytogenetics and cell genetics* 86(1):43–45.

**Martínez-Pasarell, O., C. Nogués, M. Bosch, J. Egozcue, and C. Templado. 1999.** "Analysis of Sex Chromosome Aneuploidy in Sperm from Fathers of Turner Syndrome Patients." *Human genetics* 104(4):345–49.

**McDougall, Alex, David J. Elliott, and Neil Hunter. 2005.** "Pairing, Connecting, Exchanging, Pausing and Pulling Chromosomes." *EMBO reports* 6(2):120–25.

**McInnes, B., A. Rademaker, and R. Martin. 1998.** "Donor Age and the Frequency of Disomy for Chromosomes 1, 13, 21 and Structural Abnormalities in Human Spermatozoa Using Multicolour Fluorescence in-Situ Hybridization." *Human reproduction (Oxford, England)* 13(9):2489–94.

**Morelli M.A. and Cohen P.E. 2005.** "Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis." *Reproduction Dec*;130(6):761-81.

**Mroz, K., T. J. Hassold, and P. A. Hunt. 1999.** "Meiotic Aneuploidy in the XXY Mouse: Evidence That a Compromised Testicular Environment Increases the Incidence of Meiotic Errors." *Human reproduction (Oxford, England)* 14(5):1151–56.

---

## N

**Nagaoka, So I., Terry J. Hassold, and Patricia A. Hunt. 2012.** "Human Aneuploidy: Mechanisms and New Insights into an Age-Old Problem." *Nature reviews. Genetics* 13(7):493–504.

**Neusser, Michaela et al. 2015.** "Increased Chromosome 16 Disomy Rates in Human Spermatozoa and Recurrent Spontaneous Abortions." *Fertility and sterility* 104(5):1130–37.e1–10.

---

## O

**Olson S i Magenis R. 1988.** "Preferential Paternal Origin of de Novo Structural Chromosome Rearrangements. The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements." *Daniel A. New York, Alan R. Liss* 583–99.

**Ottolini, Christian S. et al. 2015.** "Genome-Wide Maps of Recombination and Chromosome Segregation in Human Oocytes and Embryos Show Selection for Maternal Recombination Rates." *Nature Genetics* 47(7):727–35.

---

## P

**Page, S. L. and L. G. Shaffer. 1997.** "Nonhomologous Robertsonian Translocations Form Predominantly during Female Meiosis." *Nature genetics* 15(3):231–32.

**Page, Scott L. 2003.** "Chromosome Choreography: The Meiotic Ballet." *Science (New York, N.Y.)* 301(5634):785–89.

**Prestes Sartorelli, E. M., D. Ph, Fernando Mazzucatto, and B. Sc. 2001.**

"Effect of Paternal Age on Human Sperm." 76(6):1119–23.

## R

**Ravnan, J. B. et al. 2006.** "Subtelomere FISH Analysis of 11 688 Cases: An Evaluation of the Frequency and Pattern of Subtelomere Rearrangements in Individuals with Developmental Disabilities." *Journal of medical genetics* 43(6):478–89.

**Robbins, W. A. et al. 1995.** "Three-Probe Fluorescence in Situ Hybridization to Assess Chromosome X, Y, and 8 Aneuploidy in Sperm of 14 Men from Two Healthy Groups: Evidence for a Paternal Age Effect on Sperm Aneuploidy." *Reproduction, fertility, and development* 7(4):799–809.

**Robbins, W. A., M. F. Vine, K. Y. Truong, and R. B. Everson. 1997.** "Use of Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) to Assess Effects of Smoking, Caffeine, and Alcohol on Aneuploidy Load in Sperm of Healthy Men." *Environmental and molecular mutagenesis* 30(2):175–83.

**Roeder, G. S. 1997.** "Meiotic Chromosomes: It Takes Two to Tango." *Genes & Development* 11(20):2600–2621.

**Roeder, G. S. and Bailis J.M. 1997.** "The pachytene checkpoint." *Trends in genetics* 2000 Sep;16(9):395-403.

**Rosenbusch, B., E. Strehler, M. Abt, and K. Sterzik. 1993.** "[Correlation between Cytogenetic Anomalies of Human Spermatozoa and Sperm Morphology as Well as Age of Patients Studied]." *Zentralblatt für Gynäkologie* 115(3):113–16.

**Rousseaux, S. et al. 1998.** "Disomy Rates

for Chromosomes 14 and 21 Studied by Fluorescent in-Situ Hybridization in Spermatozoa from Three Men over 60 Years of Age." *Molecular human reproduction* 4(7):695–99.

**Rubes, Jiri et al. 2002.** "Stable Variants of Sperm Aneuploidy among Healthy Men Show Associations between Germinal and Somatic Aneuploidy." *American journal of human genetics* 70(6):1507–19.

**Rubes, Jiri et al. 2005.** "Individual variation in the frequency of sperm aneuploidy in humans." *Cytogenetic and genome Research* 111(3-4):229-36.

**Rudak, E., P. A. Jacobs, and R. Yanagimachi. 1978.** "Direct Analysis of the Chromosome Constitution of Human Spermatozoa." *Nature* 274(5674):911–13.

## S

**Sandalinas, Mireia, Carmen Márquez, and Santiago Munné. 2002.** "Spectral Karyotyping of Fresh, Non-Inseminated Oocytes." *Molecular human reproduction* 8(6):580–85.

**Sartorius, G. A. and E. Nieschlag. 2010.** "Paternal Age and Reproduction." *Human Reproduction Update* 16(1):65–79.

**Schmid, T. E. et al. 2004.** "Detection of Structural and Numerical Chromosomal Abnormalities by ACM-FISH Analysis in Sperm of Oligozoospermic Infertility Patients." *Human reproduction (Oxford, England)* 19(6):1395–1400.

**Sega, G. A., J. G. Owens, and R. B. Cumming. 1976.** "Studies on DNA Repair in Early Spermatid Stages of Male Mice after in Vivo Treatment with Methyl-, Ethyl-, Propyl-, and Isopropyl Methanesulfonate." *Mutation research* 36(2):193–212.

- Sega, G. A. 1979.** "Unscheduled DNA Synthesis (DNA Repair) in the Germ Cells of Male Mice--Its Role in the Study of Mammalian Mutagenesis." *Genetics* 92(1 Pt 1 Suppl):s49-58.
- Shaffer and Lupski. 2000.** "Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans." *Annu. Rev. Genet* 34:297-329.
- Shi, Q. and R. H. Martin. 2000.** "Spontaneous Frequencies of Aneuploid and Diploid Sperm in 10 Normal Chinese Men: Assessed by Multicolor Fluorescence in Situ Hybridization." *Cytogenetics and cell genetics* 90(1-2):79-83.
- Sloter, E. D., X. Lowe, D. H. Moore II, J. Nath, and a J. Wyrobek. 2000.** "Multicolor FISH Analysis of Chromosomal Breaks, Duplications, Deletions, and Numerical Abnormalities in the Sperm of Healthy Men." *American journal of human genetics* 67(4):862-72.
- Sloter, Eddie, Joginder Nath, Brenda Eskenazi, and Andrew J. Wyrobek. 2004.** "Effects of Male Age on the Frequencies of Germinal and Heritable Chromosomal Abnormalities in Humans and Rodents." *Fertility and sterility* 81(4):925-43.
- Sloter, Eddie D. et al. 2007.** "Frequency of Human Sperm Carrying Structural Aberrations of Chromosome 1 Increases with Advancing Age." *Fertility and Sterility* 87(5):1077-86.
- Soares, S. R. et al. 2001.** "Acrocentric Chromosome Disomy Is Increased in Spermatozoa from Fathers of Turner Syndrome Patients." *Human genetics* 108(6):499-503.
- Steiner, Bernhard et al. 2015.** "An Unexpected Finding: Younger Fathers Have a Higher Risk for Offspring with Chromosomal Aneuploidies." *European journal of human genetics: EJHG* 23(4):466-72.
- Sun, Fei et al. 2004.** "Human Male Recombination Maps for Individual Chromosomes." *American journal of human genetics* 74(3):521-31.
- T**
- Tarozzi, Nicoletta, Davide Bizzaro, Carlo Flamigni, and Andrea Borini. 2007.** "Clinical Relevance of Sperm DNA Damage in Assisted Reproduction." *Reproductive biomedicine online* 14(6):746-57.
- Tempest H.G. et al. 2009.** "Intra-individual and inter-individual variations in sperm aneuploidy frequencies in normal men." *Fertility and Sterility Jan;91(1):185-92.*
- Templado, C. et al. 1996.** "An Analysis of Human Sperm Chromosome Aneuploidy." *Cytogenetics and cell genetics* 74(3):194-200.
- Templado, C., M. Bosch, and J. Benet. 2005.** "Frequency and Distribution of Chromosome Abnormalities in Human Spermatozoa." *Cytogenetic and genome research* 111(3-4):199-205.
- Templado, C., F. Vidal, and A. Estop. 2011.** "Aneuploidy in Human Spermatozoa." *Cytogenetic and genome research* 133(2-4):91-99.
- Templado, C., L. Uroz, and A. Estop. 2013.** "New Insights on the Origin and Relevance of Aneuploidy in Human Spermatozoa." *Molecular human reproduction* 19(10):634-43.
- Thomas, N. Simon et al. 2006.** "Parental and Chromosomal Origin of Unbalanced de

Novo Structural Chromosome Abnormalities in Man." *Human genetics* 119(4):444–50.

**Thomas, N. Simon et al. 2010.** "De Novo Apparently Balanced Translocations in Man Are Predominantly Paternal in Origin and Associated with a Significant Increase in Paternal Age." *Journal of medical genetics* 47(2):112–15.

## U

**Uroz, Laia, Osvaldo Rajmil, and Cristina Templado. 2011.** "Meiotic Chromosome Abnormalities in Fertile Men: Are They Increasing?" *Fertility and sterility* 95(1):141–46.

**Uroz, L. and C. Templado. 2012.** "Meiotic Non-Disjunction Mechanisms in Human Fertile Males." *Human reproduction (Oxford, England)* 27(5):1518–24.

## V

**Van Hummelen, P., X. R. Lowe, and A. J. Wyrobek. 1996.** "Simultaneous Detection of Structural and Numerical Chromosome Abnormalities in Sperm of Healthy Men by Multicolor Fluorescence in Situ Hybridization." *Human genetics* 98(5):608–15.

**Vidal, F., J. Blanco, and J. Egozcue. 2001.** "Chromosomal Abnormalities in Sperm." *Molecular and cellular endocrinology* 183 Suppl:S51–54.

**Vrooman, Lisa A., So I. Nagaoka, Terry J. Hassold, and Patricia a Hunt. 2014.** "Evidence for Paternal Age-Related Alterations in Meiotic Chromosome Dynamics in the Mouse." *Genetics* 196(2):385–96.

## W

**Warburton, D. 1991.** "De Novo Balanced Chromosome Rearrangements and Extra Marker Chromosomes Identified at Prenatal Diagnosis: Clinical Significance and Distribution of Breakpoints." *American journal of human genetics* 49(5):995–1013.

**Warburton, Peter E. 2004.** "Chromosomal Dynamics of Human Neocentromere Formation." *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 12(6):617–26.

**Warren, A. C. et al. 1987.** "Evidence for Reduced Recombination on the Nondisjoined Chromosomes 21 in Down Syndrome." *Science (New York, N.Y.)* 237(4815):652–54.

**Williams, B. J. et al. 1993.** "Non-Disjunction in Human Sperm: Results of Fluorescence in Situ Hybridization Studies Using Two and Three Probes." *Human molecular genetics* 2(11):1929–36.

## Y

**Yavetz, H., L. Yogev, Z. Homonnai, and G. Paz. 1991.** "Prerequisites for Successful Human Sperm Cryobanking: Sperm Quality and Prefreezing Holding Time." *Fertility and sterility* 55(4):812–16.

## Z

**Zaragoza, M. V, E. Millie, R. W. Redline, and T. J. Hassold. 1998.** "Studies of Non-Disjunction in Trisomies 2, 7, 15, and 22: Does the Parental Origin of Trisomy Influence Placental Morphology?" *Journal of medical genetics* 35(11):924–31.

**Zaragoza, M. V et al. 2000.** "Parental Origin and Phenotype of Triploidy in



Spontaneous Abortions: Predominance of Diandry and Association with the Partial Hydatidiform Mole." *American journal of human genetics* 66(6):1807–20.





# ARTICLES



ARTICLE 1

**“Advanced age increases chromosome structural abnormalities in human spermatozoa”**

European Journal of Human Genetics (2011) 19, 145-151.

Factor d'impacte (2011): 4.4



ARTICLE

# Advanced age increases chromosome structural abnormalities in human spermatozoa

Cristina Templado<sup>\*1</sup>, Anna Donate<sup>1</sup>, Jesús Giraldo<sup>2</sup>, Mercè Bosch<sup>1</sup> and Anna Estop<sup>3</sup>

This study explores the relationship between sperm structural aberrations and age by using a multicolor multichromosome FISH strategy that provides information on the incidence of duplications and deletions on all the autosomes. ToTelvysion kit (Abbott Molecular, Abbott Park, IL, USA) with telomere-specific probes was used. We investigated the sperm of 10 male donors aged from 23 to 74 years old. The donors were divided into two groups according to age, a cohort of five individuals younger than 40 and a cohort of five individuals older than 60 years. The goal of this study was to determine (1) the relationship between donor age and frequency and type of chromosome structural abnormalities and (2) chromosomes more frequently involved in sperm structural aberrations. We found that the older patients had a higher rate of structural abnormalities (6.6%) compared with the younger cohort (4.9%). Although both duplications and deletions were seen more frequently in older men, our findings demonstrate the presence of an excess of duplications versus deletions in both groups at a ratio of 2 to 1. We demonstrate that the distribution of duplications and deletions was not linear along the chromosomes, although a trend toward a higher rate of abnormalities in larger chromosomes was observed. This work is the first study addressing the frequencies of sperm chromosome structural aberrations of all autosomes in a single assay thus making a contribution to the clarification of the amount and origin of damage present in human spermatozoa and in relation to age.

*European Journal of Human Genetics* (2011) 19, 145–151; doi:10.1038/ejhg.2010.166; published online 3 November 2010

**Keywords:** paternal age; spermatozoa; chromosome duplications; FISH; structural chromosome abnormalities

## INTRODUCTION

The causes of negative reproductive outcomes are poorly understood but chromosome abnormalities are known to be a very significant factor. In humans, it has been estimated that at least 8.1% of all clinically recognized pregnancies have a numerical (~7%) or structural (~1%) chromosome abnormality. Chromosome abnormalities are seen in 50% of spontaneous abortions, 6% still births and 1% live births.<sup>1</sup> At birth, the incidence of aneuploidy (0.33%) is only slightly higher than structural abnormalities 0.25%.<sup>2</sup> Most chromosomally abnormal conceptions are the result of an error in gametogenesis and, less frequently, the result of a post fertilization event.

In a study of the origin of *de novo* structural chromosome rearrangements using chromosome heteromorphisms, Olson and Magenis<sup>3</sup> found that 80% of *de novo* reciprocal translocations and deletions and 100% of duplication and ring chromosomes were of paternal origin. The majority of 115 *de novo* unbalanced structural chromosome abnormalities detectable by light microscopy are of paternal origin<sup>4</sup> varying from 84% of interstitial deletions to 58% of duplications and rings. Deletions of the long arm of chromosome 18 are disproportionately male<sup>5</sup> as well as the deletions that cause Wolf–Hirschhorn syndrome<sup>6</sup> and Cri-du-chat syndrome.<sup>7</sup> More recently, the parental origin of *de novo* microdeletions associated with *de novo* reciprocal translocations and cases of complex chromosomes rearrangements was determined to be paternal in all cases.<sup>8</sup> Similarly, all *de novo* deletions described by aCGH in carriers of balanced translocations and abnormal phenotype turned out to be of

paternal origin.<sup>9</sup> Moreover, studies on the origin of the recurrent *de novo* t(11;22) found that it was paternal in 100% of cases<sup>10,11</sup> and Thomas *et al*<sup>12</sup> confirmed a paternal origin of non-recurrent *de novo* balanced reciprocal translocations in 96% of cases.

Despite the high paternal contribution of *de novo* rearrangements compared with the low frequency of paternally derived numerical abnormalities, the available information on structural aberrations in human sperm is more limited. In sperm karyotypes, obtained after *in vitro* penetration of hamster oocytes, structural chromosome abnormalities have been observed far more frequently than numerical aberrations.<sup>13–15</sup> In a review, Templado *et al*<sup>16</sup> reported a median percentage of 6.6% of structural aberrations and 1.8% of numerical abnormalities. Several authors have explored the relationship between age of the donor and sperm structural aberrations (reviewed by Buwe *et al*<sup>17</sup>). Martin and Rademaker<sup>18</sup> found positive correlations with chromosomal breaks, and Sartorelli *et al*<sup>19</sup> with acentric fragments and complex radial figures. Other authors noticed a trend toward elevated frequencies of breaks and/or acentric fragments with age but without reaching statistical significance.<sup>15,20,21</sup> There have been further reports using multicolor FISH in decondensed human sperm heads but each study has been limited to a particular chromosome. Using this approach, a positive age effect on the frequencies of duplications and deletions for the centromeric and subtelomeric regions of chromosome 9 was reported by Bosch *et al*<sup>22</sup> and, similarly, Slotter *et al*<sup>23</sup> found that sperm of older men carried more breaks and segmental duplications and deletions of chromosome 1.

<sup>1</sup>Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Grup Biomatemàtic de Recerca, Institut de Neurociències and Unitat de Bioestadística, Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia i de Medicina Preventiva, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; <sup>3</sup>Reprogenetics, Livingston, NJ, USA

\*Correspondence: Professor C Templado, Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, 08193, Spain. Tel: +34 93 581 1905; Fax: +34 93 581 1025; E-mail: cristina.templado@uab.es  
Received 2 March 2010; revised 6 September 2010; accepted 14 September 2010; published online 3 November 2010



In Western societies, women's access to contraception and to the work force coupled with the availability of new reproductive technologies has resulted in couples delaying childbearing. Both the age of the father and that of the mother are thought to influence reproductive outcome. It has long been known that the age of the female increases the chances for meiotic errors in oogenesis resulting in offspring with aneuploid chromosome abnormalities. There seems to be a lesser impact for paternal than maternal age and the means by which advanced paternal age affects human reproduction are poorly understood.

The purpose of this study is to explore the relationship between sperm structural aberrations and age by using a multicolor multichromosome FISH strategy (ToTelvysion multicolor FISH, Abbott Molecular, Abbott Park, IL, USA) that provides information on the incidence of duplications and deletions on all the autosomes. We investigated the sperm of 10 male donors aged from 23 to 74 years old. The donors were divided into two groups according to age, a cohort of five individuals younger than 40 (between 23 and 37 years old) and a cohort of five individuals older than 60 years of age (ages 60–74). We analyzed 1000 spermatozoa per chromosome with a total of 15000 spermatozoa per donor for a total of 150000 cells. The multicolor multichromosome assay was used to explore (1) the nature of the relationship between donor age and frequency and type of chromosome structural abnormalities and (2)

chromosomes more frequently involved in sperm structural aberrations.

## MATERIALS AND METHODS

### Sperm donors

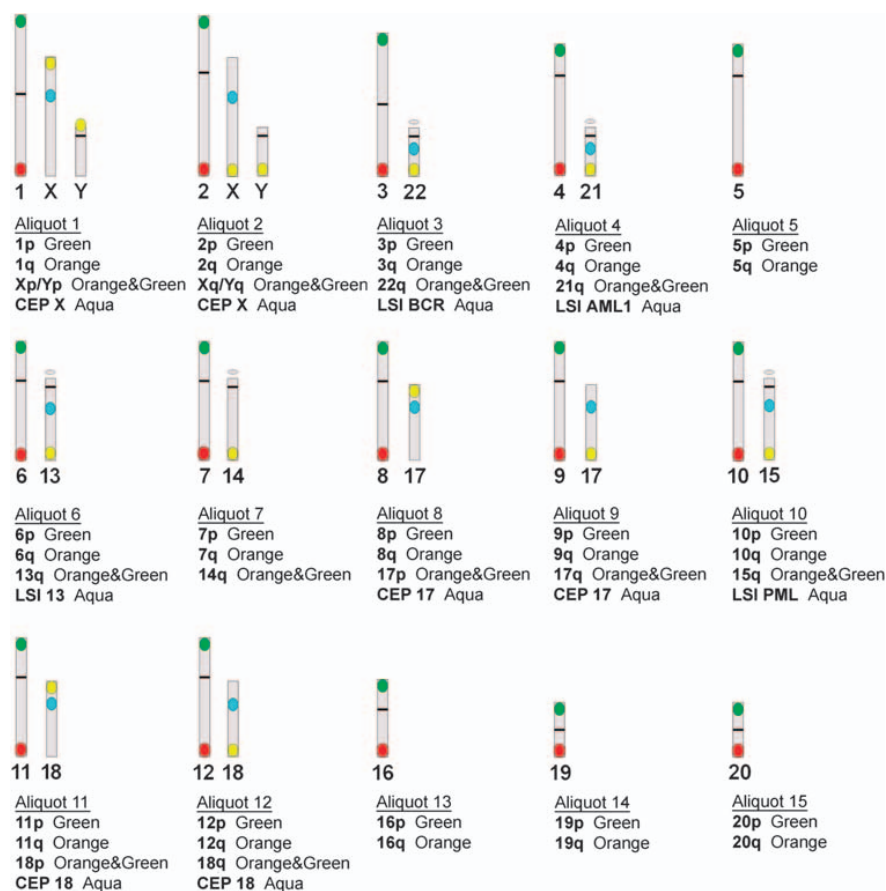
We worked with spermatozoa from 10 healthy male donors ages from 23 to 74 years old from the Andrology Service of the Fundació Puigvert (Barcelona, Spain). Before the start of the research, all of the sperm donors signed their consent to the study. The study was approved by the Institutional Ethics Committee of the Universitat Autònoma of Barcelona, and the Ethics Committee of the Fundació Puigvert.

Our donors had no history of exposure to any known mutagens, clastogens, radiation or recreational drugs. Six of our donors, namely C1, C2, C6, C7, C9 and C10, had children. The same donors had been used in previous studies on the frequency of numerical abnormalities of chromosomes 6, 9, 21, X and Y<sup>22,24</sup> and the frequency of structural abnormalities of chromosome 9<sup>24</sup> in human sperm. Sperm samples were obtained by masturbation after an abstinence period of at least 3 days.

### FISH with subtelomeric DNA probes

Slide preparation and pretreatments before hybridization were performed following the protocols described elsewhere.<sup>24</sup> Similarly, the supplier's protocol with slight modifications was followed for the hybridization procedure.<sup>24</sup>

We used the panel of DNA probes ToTelvysion multicolor FISH (Abbott Molecular). Figure 1 depicts the chromosome location, color and



**Figure 1** The 15 aliquots of the FISH probe panel used showing both the chromosome location and the color of the probes (spectrum orange, spectrum green and spectrum aqua) from each aliquot.

aliquot distribution of the panel of probes used in this study. These include subtelomeric probes specific for the short and long arms of all chromosomes except the p arm of the acrocentrics (13, 14, 15, 21 and 22) and a number of centromeric (CEP) probes (CEP X, CEP 17, CEP 18) and locus specific probes (LSIs): LSI 13 (13q14), LSI PML, (15q22), LSI AML, (21q22), LSI BCR, (22q11). For the sex chromosomes, the probe mix used in this study (Figure 1) does not allow the discrimination between numerical and structural aberrations nor the determination of structural aberrations present in each of the sex chromosome, thus the sex chromosomes results have not been included in this study.

This FISH protocol will measure duplications and deletions that include the following chromosomal regions: (a) telomeres q of all autosomes, (b) telomeres p of all autosomes except acrocentric ones and (c) centromere and LSI specific for 6 out of 22 autosomes. The duplications and deletions detected are not necessarily limited to subtelomeric ones but could be whole arm or partial. They would correspond to chromosome structural aberrations, such as unbalanced reciprocal translocations, unbalanced Robertsonian translocations, unbalanced peri and paracentric inversions, isochromosomes, dicentric chromosomes, terminal deletions and duplications, segmental deletions and duplications, whole arm deletions and duplications, acentric fragments, and ring chromosomes. Interstitial deletions and/or duplications not including the targeted probes, most microdeletions and microduplications, and balanced structural aberrations would not be detected (Figure 2).

#### Data collection and scoring criteria

Only slides with a hybridization efficiency of at least 99% were scored. Only intact and non-overlapped decondensed sperm, identified because of the presence of a tail, were evaluated. For each probe, two signals were scored as such only if they had the same intensity, size and color and were separated by a distance equal to or higher than the probe signal diameter. If two signals were recorded for a subtelomeric, centromeric or LSI probe it was considered a duplication (partial or whole arm). When we observed the absence of one of these signals for a chromosome, it was recorded as deletion (partial or whole arm). The presence of two signals for subtelomere p and q regions and two signals for the corresponding centromeric or LSI probe was considered disomy and it was not scored as a structural duplication. In mixtures with only two

subtelomeric probes, the presence of two signals for both subtelomeric probes was considered disomy. Slides were coded before the microscope scoring.

#### Statistical analysis

The propensity to duplications versus the propensity to deletions for each individual was assessed by both the paired Student's *t*-test and the non-parametric Wilcoxon signed-rank test. The  $\chi^2$ -test was used to analyze the propensity of structural abnormalities for each chromosome relative to a uniform distribution after including a correction for chromosome length. A generalized estimating equation (GEE)<sup>25</sup> was used for assessing the differences between the two age groups for the different types of chromosomal instability. The GEE approach is an extension of generalized linear models designed to account for repeated within-individual measurements. The GEE statistical model has been proved instrumental for the comparison of chromosomal instability between two groups (see De la Chica *et al*<sup>26</sup> for further statistical details). Statistical significance was set at  $P < 0.05$ . Statistical analyses were carried out with SAS/STAT release 9.1 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

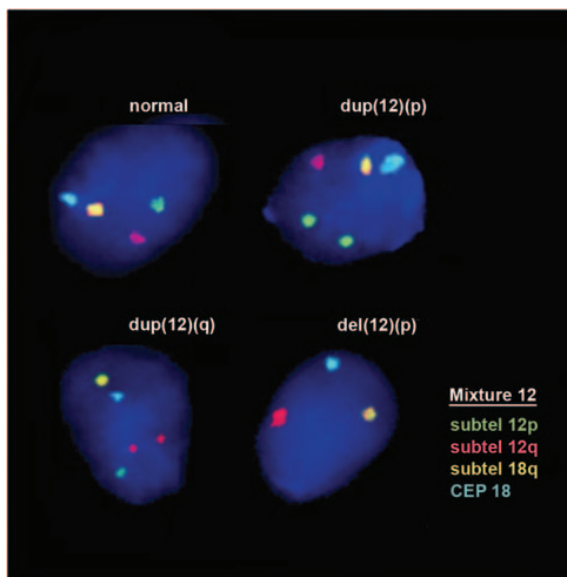
#### RESULTS

We analyzed 1000 spermatozoa per chromosome (15 aliquots) with a total of 15 000 sperm for each donor for a total of 150 000 cells. The donors were divided into two groups according to age: a cohort of five individuals younger than 40 (between 23 and 37 years old) and a cohort of five individuals older than 60 years of age (ages 60–74).

#### Frequency of structural abnormalities

Table 1 shows the percentages of structural chromosome abnormalities (duplications and deletions) in each individual, and the mean and standard error of the mean (SEM) of response variables for each group age

The frequency of structural abnormalities ranged from 4.4% (C3 and C5) to 6.7% (C9) in the younger group and from 4.5% (C1) to 7.7% (C6) in the older group. The SEM for the total of structural abnormalities was higher (0.60) in the older group than in the younger group (0.44) meaning that there was more heterogeneity or interindividual variability within the older group. Two outliers contribute significantly to the increase in variability within each group. Indeed, the frequency of deletions (2.5%), duplications (4.2%) and total structural abnormalities (6.7%) of donor C9 from the younger group was at or above the mean for older donors. Likewise, within the older group there was C1 whose percentages of deletions (1.0%), duplications (3.5%) and total structural (4.5%) were close to the mean of younger donors.



**Figure 2** FISH in human decondensed sperm nuclei using one of the 15 mixtures of the FISH panel (mixture 12) showing structural aberrations for chromosome 12: deletions for subtelomere 12p and duplications for subtelomeres 12p and 12q.

**Table 1** Percentages of structural chromosome abnormalities in spermatozoa from 10 healthy donors in each group of age

Donor	Age	% Duplications	% Deletions	% Total structural
C3	24	2.9	1.5	4.4
C4	25	3.5	1.1	4.6
C5	37	3.1	1.3	4.4
C8	23	2.9	1.7	4.6
C9	30	4.2	2.5	6.7
Mean (SEM)	28	3.3 (0.25)	1.6 (0.2)	4.9 (0.4)
C1	74	3.5	1.0	4.5
C2	64	4.4	2.7	7.1
C6	72	5.3	2.4	7.7
C7	60	3.7	2.4	6.1
C10	62	5.7	1.9	7.6
Mean (SEM)	66	4.5 (0.4)	2.1 (0.3)	6.6 (0.6)

The mean frequency of duplications was statistically higher than that of deletions in both the older (4.5%) vs (2.1%;  $P=0.0053$ ) and the younger group (3.3%) vs (1.62%;  $P=0.0012$ ) when using the paired Student's *t*-test. However, under a more conservative approach (the non-parametric Wilcoxon signed-rank test) the *P*-values switch to  $P=0.0625$  for both older and younger groups resulting in a lack of statistical relevance. All men from both groups had higher frequencies of duplications than deletions, regardless of age (see Table 1). The ratio of duplications to deletions is maintained throughout the age groups, 2.1 in the younger cohort and 2.2 in the older, thus, in each group of age, for each deletion observed we scored ~2 duplications. Table 2 shows the frequencies of duplications and deletions per chromosome arm and the total of structural abnormalities per chromosome in all donors studied. The higher frequency of duplications is observed across the range of all chromosome arms with some exceptions, such as 2q, 3q, 4p, 7p, 8p and 19q.

#### Structural abnormalities in the older and younger groups

We scored a total of 330 structural abnormalities in the older group and 247 in the younger group. The older cohort had a higher incidence of structural abnormalities across the board, including deletions, duplications and total structural anomalies.

The statistical analysis showed a significant difference in the incidence of total structural abnormalities between the older (6.6%) and younger groups (4.9%) ( $P=0.0499$ , GEE analysis). If donor C9 from the younger group who has outlier values for the group, was removed from the analysis, the *P*-value shifted to  $P=0.0190$ , increasing the significance between older and younger. A similar trend was obtained when removing instead the outlier in the older group (donor C1), the *P*-value shifted to  $P=0.0154$ . The frequency of

duplications was statistically different when comparing both groups of age (4.5 vs 3.3%;  $P=0.0400$  GEE analysis). As for deletions, although more were found in the older group (2.1%) than in the younger (1.6%), the difference was not statistically relevant.

#### Age effect on the distribution of structural abnormalities per chromosome

Pooling all chromosomes together, the mean frequency of structural abnormalities per chromosome was 0.31% in the older group and was higher ( $P=0.004$ ) than that of the younger group (0.23%).

The percentage of structural abnormalities for each chromosome (Figure 3) follows the same trajectory in both groups with the exception of chromosome 12 where there is a statistical divergence between older and younger (0.34 and 0.12%, respectively;  $P=0.01$ , GEE analysis). For chromosome 16 the frequency of structural abnormalities also shows a divergent trajectory but it is not statistically significant (Figure 3a). The percentage of duplications is statistically different for chromosome 12 (0.28 older vs 0.1 younger;  $P=0.0286$ ), and for chromosome 19 (0.26 older vs 0.16 younger) in which there is a clear divergence between the curves, ( $P=0.0239$ ; Figure 3b). The incidence of deletions follows a similar trajectory for both groups with absence of statistical significance in any of the chromosomes (Figure 3c).

When we pooled all donors together (Table 2), we observed a percentage of structural abnormalities ranging from 0.12 for chromosome 22 to 0.43 for chromosome 1. The second chromosome in number of structural abnormalities was chromosome 5 (0.37%) followed by chromosome 9 (0.36%), which was third. A tendency to a higher rate of abnormalities in larger chromosomes was observed, however, a direct proportionality between the number of

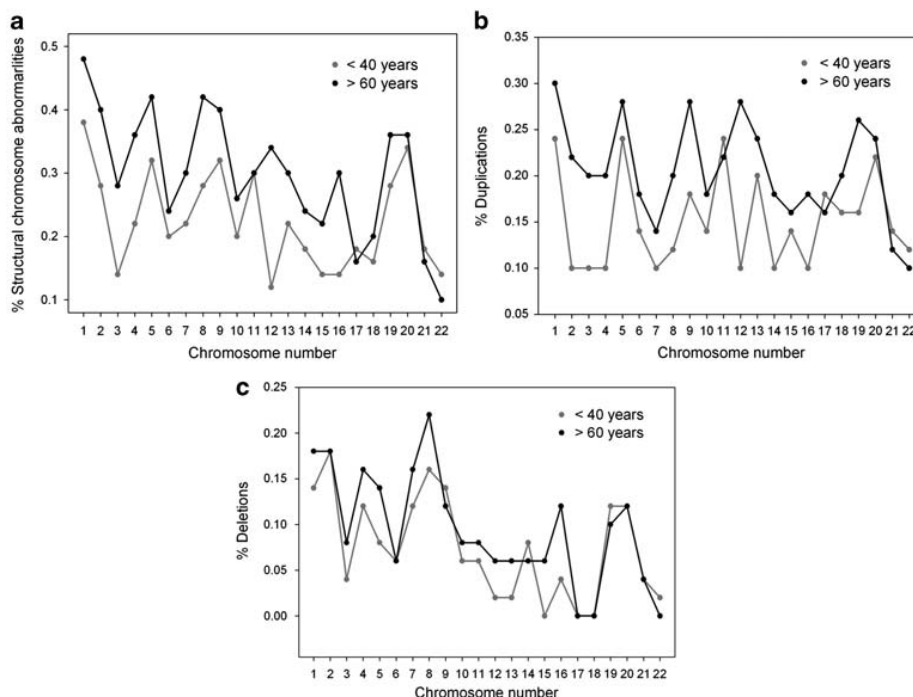
**Table 2 Percentages of structural abnormalities in each chromosome arm in spermatozoa from all of the 10 individuals studied**

Chromosome <sup>a</sup>	<i>p</i> arm			<i>q</i> arm			% Total structural
	% Duplication	% Deletion	% Total	% Duplication	% Deletion	% Total	
1	0.15	0.10	0.25	0.12	0.06	0.18	0.43
2	0.09	0.02	0.11	0.07 <sup>b</sup>	0.16 <sup>b</sup>	0.23	0.34
3	0.11	0.01	0.12	0.04 <sup>b</sup>	0.05 <sup>b</sup>	0.09	0.21
4	0.08 <sup>b</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.16	0.07	0.06	0.13	0.29
5	0.14	0.02	0.16	0.12	0.09	0.21	0.37
6	0.10	0.02	0.12	0.06	0.04	0.10	0.22
7	0.02 <sup>b</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.10	0.10	0.06	0.16	0.26
8	0.04 <sup>b</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.13	0.12	0.10	0.22	0.35
9	0.08	0.06	0.14	0.15	0.07	0.22	0.36
10	0.11	0.04	0.15	0.05	0.03	0.08	0.23
11	0.05	0.04	0.09	0.18	0.03	0.21	0.30
12	0.12	0.04	0.16	0.07	0.00	0.07	0.23
13	ND	ND	ND	0.22	0.04	0.26	0.26
14	ND	ND	ND	0.14	0.07	0.21	0.21
15	ND	ND	ND	0.15	0.03	0.18	0.18
16	0.08	0.05	0.13	0.06	0.03	0.09	0.22
17	0.01	0.00	0.01	0.16	0.0	0.16	0.17
18	0.09	0.00	0.09	0.09	0.0	0.09	0.18
19	0.18	0.04	0.22	0.03 <sup>b</sup>	0.07 <sup>b</sup>	0.10	0.32
20	0.12	0.09	0.21	0.11	0.03	0.14	0.35
21	ND	ND	ND	0.13	0.04	0.17	0.17
22	ND	ND	ND	0.11	0.01	0.12	0.12

Abbreviation: ND, not determined.

<sup>a</sup>10 000 spermatozoa analyzed/chromosome.

<sup>b</sup>Chromosome arms for which the frequency of duplications is not higher than that of deletions.



**Figure 3** (a) Percentage of chromosome structural abnormalities per chromosome in each group of age. (b) Percentage of duplications per chromosome. (c) Percentage of deletions per chromosome.

abnormalities and chromosome length was not maintained. Indeed, the rate of abnormalities in chromosomes 19 and 20 (0.32 and 0.35, respectively) were on the same order as larger chromosomes, namely chromosome 2 (0.34), 5 (0.37), 8 (0.35) and 9 (0.36). In those donors younger than 40 chromosome 3 had a lower (0.14%) than expected (0.34%) percentage of duplications and deletions, whereas chromosomes 19 (0.28%), 20 (0.34%) and 21 (0.18%) had higher than expected percentages (0.13, 0.13, 0.09%, respectively;  $P < 0.05$ ). In those 60 or older, chromosomes 19 and 20 demonstrated a higher percentage of structural abnormalities than expected (0.36 vs 0.18%, respectively) and (0.36 vs 0.17%, respectively;  $P < 0.05$ ).

## DISCUSSION

The multicolor multichromosome assay provides a measure of the number of duplications and deletions (terminal, partial including the subtelomere or other targeted areas, or whole arm) present in the spermatozoa of an ejaculate. These duplications and deletions result from presumably *de novo* structural chromosome rearrangements that may arise during the spermatogonial divisions or in meiosis. The specific type of structural aberration that lead to the duplications and deletions observed by our assay could not be determined because the multicolor multichromosome FISH assay does not discriminate among these aberrations.

The overall mean of structural abnormalities was 5.8% which is in line with what has been reported with the hamster oocyte assay for normal donors (6.6%)<sup>15</sup> and reports of FISH studies of structural abnormalities of chromosome 1 extrapolated to the whole genome (4.4–6.1%).<sup>27</sup> Although these numbers are comparatively similar it is important to keep in mind that our study includes only unbalanced rearrangements and direct chromosome studies with the hamster test included both balanced and unbalanced aberrations.

The older patients had a higher rate of structural abnormalities (6.6%) compared with the younger cohort (4.9%). Along these lines, a positive age effect on the frequencies of duplications and deletions for chromosome 9<sup>22</sup> and for chromosome 2<sup>23</sup> was reported in FISH studies of spermatozoa. We demonstrate that distribution of duplications and deletions was not linear along the chromosomes. A tendency toward a higher rate of abnormalities in larger chromosomes was observed, however, direct proportionality between the number of abnormalities and chromosome length was not detected. In both younger and older patients, chromosomes 19 and 20 had an excess of abnormalities, whereas chromosomes 3 and 6 had less than expected. Non-random distribution of breaks on chromosome 9 has been reported in sperm karyotypes<sup>14</sup> and in FISH studies an age dependent linear trend on chromosome 9 breaks was reported.<sup>22</sup> Our observations show a propensity of chromosome 9 to break higher than expected yet without statistical significance. Moreover, previous reports of chromosome 4 having a lower than expected number of breaks in sperm karyotypes<sup>15</sup> were confirmed in this study but without reaching statistical significance.

Both duplications and deletions were seen more frequently in the older men. The increase in duplications with age was statistically significant as opposed to the increase in the frequency of deletions, which, although higher in older men, was not significant. The ratio of duplications to deletions was maintained around 2 in both groups, meaning that for each deletion observed we scored 2 duplications (2.1 in the younger cohort and 2.2 in the older). The higher frequency of duplications was observed in all donors, younger and older, and across the range of all chromosome arms with a few exceptions (2q, 3q, 4p, 7p, 8p and 19q). Sloter *et al*<sup>23</sup> observed a slight trend toward higher frequencies of sperm with segmental duplications vs deletions in each man, regardless of age. Likewise, several authors<sup>28–30</sup>

showed that duplications of 1p were more frequent than deletions in human spermatozoa. The excess of duplications observed in sperm nuclei could be a reflection of the excess in acentric fragments described in sperm karyotypes.<sup>15,18–21</sup> and metaphase I spermatocytes.<sup>31</sup> Acentric fragments can either acquire a neocentromere and be rescued, or be lost.<sup>32</sup> This could explain the excess of duplications detected in spermatozoa with respect to the rate of subtelomeric duplications in subjects with a clinical phenotype.

The higher rate of duplications could be explained by a mitotic origin rather than a meiotic origin for some of these *de novo* abnormalities. Translocations, inversions, insertions, isochromosomes and small deletions and duplications are considered stable rearrangements and it has been postulated that they would originate in spermatogenic mitotic divisions or during meiosis.<sup>15</sup>

The number of spermatogonial divisions accumulates with increasing age. In males, germ cells divide continuously. At the spermatogonial phase a man of 50 years could accumulate 840 replications each increasing the chances for DNA damage and errors in transcription. Thomas *et al*<sup>12</sup> report a paternal origin in 96% of *de novo* non-recurrent balanced reciprocal translocations. They all appeared to be unique events not mediated by sequence homology (unlike meiotic rearrangements) and showed a strong paternal age effect suggesting a mitotic spermatogonial origin. On the contrary, the frequency of recurrent *de novo* t(11;22) in sperm has been found to be independent of the age of the donors<sup>33</sup> and it might be homology mediated and of meiotic origin.

#### Environmental insults and age

Environmental insults and exposures over a lifetime may increase DNA damage in sperm of older men and contribute to the incidence of childhood diseases that increase with paternal age.<sup>34</sup> Men over 50 have a higher pregnancy loss and decreased live birth rate.<sup>35</sup> There is increased DNA fragmentation with age, a consequence of defective apoptosis, oxidative stress, meiotic and spermiogenic abnormalities.<sup>36</sup> Singh *et al*<sup>37</sup> report that the amount of DNA damage in sperm of men aged 35–57 is three times that of men <35 years. The accumulation of unrepaired DNA damage in male germ cells, plus a progressively deteriorating testicular environment–host factors, could manifest as an age-related increase in chromosomal structural abnormalities that could be passed onto the zygote in the form of *de novo* structural rearrangements.

#### Clinical significance

The sperm carrying *de novo* structural rearrangements may father offspring with clinically significant *de novo* chromosome aberrations (microscopic and submicroscopic) or *de novo* submicroscopic clinical variants.

Contrary to that observed in sperm nuclei, studies carried out in selected populations of patients, have found that *de novo* deletions are more frequent than duplications. Ravnán *et al*<sup>38</sup> in a FISH study limited to subtelomeric regions of a highly selected population of patients with developmental disabilities and normal karyotypes, detected more *de novo* clinically significant subtelomeric deletions than subtelomeric duplications, and more subtelomeric deletion variants than subtelomeric duplication variants. A contributing factor to explain the differences between spermatozoa and clinical studies could be that duplications are associated with milder phenotypes and thus individuals with duplications are less likely to be included in highly selected populations, such as patients with developmental disabilities. Moreover, the FISH subtelomeric probes used in this study can potentially detect benign polymorphic variants<sup>39,40</sup> that

do not result in pathologic phenotype. This could be another contributing factor to explain the differences between spermatozoa and clinical studies.

#### Conclusion

Our work shows an increase in structural abnormalities (duplications and deletions) in the spermatozoa of older men. Our findings demonstrate the presence of an excess of duplications versus deletions in both groups at a ratio of 2 to 1 which can only be explained by mechanisms other than meiotic recombination as their source or by a negative selection of germinal cells carrying deletions during spermatogenesis. Partial or whole arm duplications exceeded deletions across the board for most of the chromosome arms. Chromosome 12 rates of structural abnormalities differ significantly in the two groups of age. This work is the first study addressing the frequencies of sperm chromosome structural aberrations of all autosomes in a single assay thus contributing to clarify the amount of damage present in human spermatozoa and in relation to age. The next challenge resides in the elucidation of the specific types of chromosome abnormalities that are produced at each stage of germ cell production, the relative contributions of each mechanism involved in the production of sperm with structural chromosome abnormalities, and how both processes are affected by age.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (SAF2007-65913) and the Generalitat de Catalunya, Spain (2005FI00399, 2009SGR-01107).

- Jacobs PA: The chromosome complement of human gametes. *Oxf Rev Reprod Biol* 1992; **14**: 47–72.
- Hassold TJ: Nondisjunction in the human male. *Curr Top Dev Biol* 1998; **37**: 383–406.
- Olson SD, Magenis RE: Preferential paternal origin of *de novo* structural rearrangements. In: Daniel A (ed): *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. New York: Alan R Liss, 1988, pp 583–599.
- Thomas NS, Durkie M, Van Zyl B *et al*: Parental and chromosomal origin of unbalanced *de novo* structural chromosome abnormalities in man. *Hum Genet* 2006; **119**: 444–450.
- Cody JD, Perce JF, Brkanac Z *et al*: Preferential loss of the paternal alleles in the 18q- syndrome. *Am J Hum Genet* 1997; **69**: 280–286.
- Dallapiccola B, Mandich P, Bellone E *et al*: Parental origin of chromosome 4p deletions in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet* 1993; **47**: 921–924.
- Overhauser J, McMahon J, Oberlander S *et al*: Parental origin of chromosome 5 deletions in the Cri-Du-Chat syndrome. *Am J Med Genet* 1990; **37**: 83–88.
- De Gregori M, Ciccone R, Magini P *et al*: Cryptic deletions are a common finding in “balanced” reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet* 2007; **44**: 750–762.
- Baptista J, Mercer C, Prigmore E *et al*: Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. *Am J Hum Genet* 2008; **82**: 927–936.
- Kurahashi H, Bolor H, Kato T *et al*: Recent advance in our understanding of the molecular nature of chromosomal abnormalities. *J Hum Genet* 2009; **54**: 253–260.
- Ohye T, Inagaki H, Kogo H *et al*: Paternal origin of the *de novo* constitutional t(11;22)(q23;q11). *Eur J Hum Genet* 2010; **18**: 783–787.
- Thomas NS, Morris JK, Baptista J, Ng BL, Crolla JA, Jacobs PA: *De novo* apparently balanced translocations in man are predominantly paternal in origin and associated with a significant increase in paternal age. *J Med Genet* 2010; **47**: 112–115.
- Martin RH, Rademaker AW, Hildebrand K, Long-Simpson L, Peterson D, Yamamoto J: Variation in the frequency and type of sperm chromosomal abnormalities among normal men. *Hum Genet* 1987; **77**: 108–114.
- Brandriff BF, Gordon LA, Moore II D, Carrano AV: An analysis of structural aberrations in human sperm chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1988; **47**: 29–36.
- Estop AM, Marquez C, Munne S *et al*: An analysis of human sperm breakpoints. *Am J Hum Genet* 1995; **56**: 452–460.

- 16 Templado C, Bosch M, Benet J: Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 2005; **111**: 199–205.
- 17 Buwe A, Guttenbach M, Schmid M: Effect of paternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 2005; **111**: 213–228.
- 18 Martin RH, Rademaker AW: The effect of age on the frequency of sperm chromosome abnormalities in normal men. *Am J Hum Genet* 1987; **41**: 484–449.
- 19 Sartorelli EM, Mazzucatto LF, de Pina-Neto JM: Effect of paternal age on human sperm chromosomes. *Fertil Steril* 2001; **76**: 1119–1123.
- 20 Brandriff B, Gordon L, Ashworth L et al: Chromosomes of human sperm: variability among normal individuals. *Hum Genet* 1985; **70**: 18–24.
- 21 Rosenbusch B, Strehler E, Abt M, Sterzik K: Correlation between cytogenetic anomalies of human spermatozoa and sperm morphology as well as age of patients studied. *Zentralbl Gynakol* 1993; **115**: 113–116.
- 22 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**: 754–759.
- 23 Slotter ED, Marchetti F, Eskenazi B et al: Frequency of human sperm carrying structural aberrations of chromosome 1 increases with advancing age. *Fertil Steril* 2007; **87**: 1077–1086.
- 24 Bosch M, Rajmil O, Egozcue J, Templado C: Linear increase of diploidy in human sperm with age: a four-colour FISH study. *Eur J Hum Genet* 2001; **9**: 533–538.
- 25 Liang KY, Zeger SL: Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 1986; **73**: 13–22.
- 26 De la Chica RA, Ribas I, Giraldo J, Egozcue J, Fuster C: Chromosomal instability in amniocytes from fetuses of mothers who smoke. *JAMA* 2005; **293**: 1212–1222.
- 27 Schmid TE, Brinkworth MH, Hill F et al: Detection of structural and numerical chromosomal abnormalities by ACM-FISH analysis in sperm of oligozoospermic infertility patients. *Hum Reprod* 2004; **19**: 1395–1400.
- 28 Van Hummelen P, Lowe XR, Wyrobek AJ: Simultaneous detection of structural and chromosome abnormalities in sperm of healthy men by multicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Genet* 1996; **98**: 608–615.
- 29 Baumgartner A, Van Hummelen P, Lowe XR, Adler ID, Wyrobek AJ: Numerical and structural chromosome abnormalities detected in human sperm with a combination of multicolor FISH assays. *Environ Mol Mutagen* 1999; **33**: 49–58.
- 30 Slotter E, Lowe X, Moore DI, Nath J, Wyrobek AJ: Multicolor FISH analysis of chromosomal breaks, duplications, deletions, and numerical abnormalities in the sperm of healthy men. *Am J Hum Genet* 2000; **67**: 862–872.
- 31 Uroz L, Rajmil O, Templado C: Meiotic chromosome abnormalities in fertile men: Are they increasing? *Steril Fertil*, 2010; doi:10.1016/j.fertnster.2010.06.042.
- 32 Warburton PE: Chromosomal dynamics of human neocentromere formation. *Chromosome Res* 2004; **12** (6): 617–626.
- 33 Kato T, Yamada K, Inagaki H et al: Age has no effect on the *de novo* constitutional t(11;22) translocation frequency in sperm. *Fertil Steril* 2007; **88**: 1446–1448.
- 34 Aitken RJ, Koopman P, Lewis SEM: Seeds of concern. *Nature* 2004; **432**: 48–52.
- 35 Fratarelli JL, Miller KA, Miller BT, Elkin-Hirsch J, Scott Jr RT: Male age negatively impacts embryo development and reproductive outcome in donor oocyte assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2008; **90**: 97–103.
- 36 Tarozzi N, Bizarro D, Flamigni C, Borini A: Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2007; **14**: 746–757.
- 37 Singh NP, Muller CH, Berger RE: Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003; **80**: 1420–1430.
- 38 Ravnán JB, Tepperberg JH, Papenhausen P et al: Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 2006; **43**: 478–489.
- 39 Knight SJ, Regan R, Nicod A et al: Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 1999; **354** (9191): 1676–1681.
- 40 Martin CL, Waggoner DJ, Wong A et al: Molecular rulers for calibrating phenotypic effects of telomere imbalance. *J Med Genet* 2002; **39**: 734–740.









ARTICLE 2

**“Paternal age and numerical chromosome abnormalities in  
human spermatozoa”**

Cytogenetic and Genome Research (2016): en viat,  
pendent de publicar

Factor d'impacte (actual): 1.561



1 **PATERNAL AGE AND NUMERICAL CHROMOSOME ABNORMALITIES IN HUMAN**  
2 **SPERMATOZOA**

3 **Anna Donate<sup>1</sup>, Anna M Estop<sup>2</sup>, Jesús Giraldo<sup>3</sup>, and Cristina Templado<sup>1</sup>**

4 1. Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Departament de Biologia Cel·lular,  
5 Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona,  
6 Bellaterra, 08193, Barcelona, Spain

7

8 2. Formerly Reprogenetics, 3 Regent Street, Livingston, NJ 07039, USA  
9

10 3. Grup Biomatemàtic de Recerca, Institut de Neurociències, and Unitat de  
11 Bioestadística, Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia i de Medicina  
12 Preventiva, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra,  
13 08193, Spain

14

15

16 **Corresponding author:**

17 Cristina Templado

18 Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica

19 Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

20 Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona,

21 08193, Spain.

22 Tel: +34 93 581 1905

23 E-mail: [cristina.templado@uab.es](mailto:cristina.templado@uab.es)

24

- 25 **Running title:** Age and sperm chromosome abnormalities
- 26 **Keywords:** Paternal age / Sperm FISH / Numerical chromosomal abnormalities /
- 27 Disomy / Diploidy

28 **ABSTRACT**

29 This study explores the relationship between sperm numerical chromosome  
30 abnormalities and age in healthy men. We performed FISH in the spermatozoa of 10  
31 donors from the general population: 5 men younger than 40 years old and 5 fertile men  
32 older than 60. We analysed 1,000 sperm nuclei for each chromosome with a total of  
33 15,000 sperm nuclei for each donor. We used a single sperm sample per donor thus  
34 minimizing intra-donor variability and optimizing consistent analysis. FISH with a  
35 *TelVysion* assay, which provides data on aneuploidy of 19 chromosomes, was used in  
36 order to gain a more genome-wide perspective of the levels of aneuploidy. Aneuploidy  
37 and diploidy rates observed in the younger and older groups were compared. There  
38 were no significant differences in the incidence of autosomal disomy, sex chromosome  
39 disomy, total chromosome disomy, diploidy, nor total numerical abnormalities between  
40 younger and older men. This work confirms that aneuploidy of the sex chromosomes is  
41 more common than that of the autosomes, and that the relationship between the two  
42 does not change with age. Our results suggest that some probe combinations have a  
43 tendency to show higher levels of diploidy thus potentially affecting FISH results and  
44 highlighting the limitations of FISH.

45

## 46 INTRODUCTION

47 In both males and females, an inefficient meiosis may result in germ cells with missing  
48 or extra chromosomes, a chromosomal abnormality known as aneuploidy. The excess  
49 chromosome 21 in trisomic fetuses and live births originates from the father only in 5-  
50 10% of cases (Hassold and Sherman, 2000). The levels of aneuploidy in spermatozoa  
51 are lower (1.8%-4.5%)(Templado et al. 2005, 2011a) than in oocytes (20%) (Angell,  
52 1991). One reason for this difference may be the existence of a post-meiotic checkpoint  
53 in spermatogenesis, arresting specifically either aneuploid spermatids or spermatozoa  
54 (Uroz and Templado, 2012).

55 It has long been known that oocyte aneuploidy increases with advanced maternal age  
56 (Risch et al. 1986) while the existence of a similar paternal age effect for aneuploidy  
57 has been controversial. Cytogenetic studies focusing on paternal age and the risk of  
58 abnormal offspring have revealed an increased incidence of structural chromosome  
59 abnormalities (Olson and Magenis, 1988) and spontaneous abortions (Kushnir et al.  
60 2010; Neusser et al. 2015). However, epidemiological studies have failed to show a  
61 clear association between paternal age and aneuploidy. Initially this association is  
62 observable because advanced maternal age is correlated with advanced paternal age.  
63 However, when efforts are made to separate the confounding effects of maternal age,  
64 a resulting paternal age effect on aneuploidy in the offspring has not been  
65 demonstrated. Recently, a retrospective study (Steiner et al. 2015) showed an inverse  
66 relationship between age and chances of fathering offspring with chromosome  
67 aneuploidy, whereas others authors (De Souza et al. 2010) report a weak association  
68 with paternal age and some aneuploidies in the offspring.

69 Sperm chromosome studies via the hamster-egg fusion and FISH protocols on sperm  
70 have demonstrated that the male germ cell is more prone to chromosome breakage  
71 than to aneuploidy (Estop et al. 1995). Moreover, paternal age is associated with an  
72 increased risk for chromosome breaks in the spermatozoa (Templado et al. 2011b).

73 The spermatozoa of normal men carry low levels of aneuploidy (1.8% to 4.5%)  
74 depending on technical approach with some inter-donor variability (Rubes et al. 2005;  
75 Templado et al. 2011a, 2013).

76 Studies on sperm (karyotypes and FISH) show no evidence for a paternal age effect on  
77 sperm aneuploidy for most of the autosomes (reviewed in Buwe et al. 2005; Fonseka  
78 and Griffin, 2011). A few FISH studies on sperm nuclei have shown slight increases in  
79 autosomal disomies for chromosomes 1 (Martin et al. 1995), 9 (Bosch et al. 2003) and  
80 21 (Rousseaux et al. 1998), whereas others have detected moderate increases in sex  
81 chromosome aneuploidy usually involving 2-fold differences between the youngest and  
82 the oldest (Griffin et al. 1995; Robbins et al. 1995; Kinakin et al. 1997; Rubes et al.  
83 2005; reviewed in Buwe et al. 2005). Most of these FISH reports are based on the few  
84 chromosomes viable in live birth trisomies, and rarely have touched on the topic of  
85 diploidy. FISH yields an elevated number of cells quickly, but requires highly trained  
86 observers, stringent scoring criteria and consistency of analysis. Comparisons between  
87 laboratories of results obtained with this assay are difficult because of a lack of  
88 standardization on sperm decondensation techniques, the size and location of probes,  
89 and an abundance of use of centromeric probes, which may show split signals and  
90 concentrate in the nuclear center, inter-scorer variability and scorer experience.  
91 Moreover, different chromosomes may be studied in different individuals, at different  
92 times and in independent sperm samples.

93 In this report we present the rates of disomy and diploidy observed in the spermatozoa  
94 of 10 males with ages ranging from 23 to 74 years old divided into two age groups.

95 We performed FISH on 150,000 sperm nuclei with subtelomeric, centromeric and locus  
96 specific probes of the *TelVysion* assay, which allows the simultaneous detection of  
97 numerical abnormalities of 19 chromosomes and thus provides a genome-wide  
98 appreciation of the levels of aneuploidy. The main goals were: 1) To establish the rates



99 of aneuploidy in 17 autosomes and the sex chromosomes in a single study using a  
100 single sperm sample/donor thus minimizing intra-donor variability and optimizing  
101 consistent analysis and scoring standards, 2) To determine whether there is an  
102 association between aneuploid and/or diploid sperm and age, and 3) To assess the  
103 reliability of scoring for diploidy in multiple assays with different chromosome  
104 combinations.

105

106 **MATERIALS AND METHODS**

107

108 Sperm donors

109 We worked with spermatozoa from 10 healthy male donors aged between 23 and  
110 74 years old. The donors were divided into two groups according to age: a group of  
111 five individuals younger than 40 (between 23 and 37 years old, mean age 27.8,  
112 SEM 2.6) and a group of five individuals older than 60 years of age (ages 60-74,  
113 mean age 66.4, 2.8 SEM).

114 Our donors had no history of exposure to any known mutagens, clastogens, radiation  
115 or recreational drugs. All of the older donors (C1, C2, C6, C7, and C10) and one young  
116 (C9) were fertile. Nine of the ten donors (exception C8) had been included in previous  
117 studies on the frequency of disomy of chromosomes 6, 21, X and Y (Bosch et al.  
118 2001), chromosome 9 structural abnormalities and diploidy (Bosch et al. 2003) and in a  
119 report on the relationship of chromosomal structural abnormalities and age (Templado  
120 et al. 2011b).

121 The Institutional Ethics Committee of the Universitat Autònoma of Barcelona and the  
122 Ethics Committee of the Fundació Puigvert of Barcelona approved this study and all  
123 sperm donors signed the participating consent.

124

125 FISH with subtelomeric DNA probes

126 We used the panel of DNA probes *TelVysion* multicolour FISH (Vysis, Abbot). Slide  
127 preparation and pre-treatments before hybridization were performed following the  
128 protocols described elsewhere (27). Briefly, the slides were incubated in a pepsin  
129 solution for 13 minutes at 37°C, washed in 2xSSC for 3 minutes, and dehydrated in an

130 ethanol series. Sperm nuclei chromatin were decondensed in a DTT solution (5 mM  
131 dithiothreitol, 0,1 M Tris, 0,1% Triton X-100) at 37°C for 15-35 min, washed in 2xSSC  
132 for 3 min and dehydrated in an ethanol series. The decondensation level of the sperm  
133 chromatin was controlled under the phase contrast microscope. Decondensation was  
134 allowed up to when most of the sperm heads had acquired a rounded shape. Similarly, for  
135 the hybridization procedure, the supplier's protocol with slight modifications was  
136 followed (27).

137 Figure 1 depicts the chromosome location, colour and aliquot distribution of the panel  
138 of probes used in this study. Our new FISH probe approach provides more internal  
139 scoring control (with 2 probes per chromosome) compared to a single point of  
140 reference that is more commonly utilized. The panel includes 43 subtelomeric probes  
141 specific for the short and long arms of all chromosomes except the p arm of the  
142 acrocentrics (13, 14, 15, 21 and 22), 3 centromeric (CEP) probes (CEP X, CEP 17,  
143 CEP 18) and 4 locus specific probes (LSIs): LSI 13 (13q14), LSI PML (15q22), LSI  
144 AML (21q22), LSI BCR (22q11). Our FISH protocol (*Te/Vysion* multicolour FISH)  
145 measures disomy in all autosomes with the exception of chromosomes 5, 14, 16, 19  
146 and 20. For chromosomes 5, 16, 19 and 20 disomy and diploidy could not be  
147 distinguished because the 2 probes for each of these chromosomes are in a stand-  
148 alone mix. Due to the fact that aliquot 7 did not contain the 2 probes required for  
149 scoring chromosome 14 disomy, it was not included in the calculations of disomy.  
150 Aliquot 7, which had 3 probes only, was not included in the scoring of diploidy.

151

152 →Figure 1

153

154 **Data collection and scoring criteria**

155 Only slides with a hybridization efficiency of at least 99% were scored. Only intact and  
156 non-overlapped decondensed sperm, identified because of the presence of a tail, were  
157 evaluated. For each probe, two signals were scored as such only if they had the same  
158 intensity, size and colour and were separated by a distance equal to or higher than the  
159 probe signal diameter. Slides were coded before the microscope scoring. We analysed  
160 1,000 spermatozoa for each of the 15 aliquots with a total of 15,000 sperm for each  
161 donor. The same observer scored all of the slides.

162

163 **Disomy:** The observation of 2 signals for subtelomeric p plus 2 signals for  
164 subtelomeric q, or centromeric or LSI of the same chromosome was considered disomy  
165 in an aliquot with probes for more than one chromosome. Disomy counts for the sex  
166 chromosomes (aliquots 1 and 2) and for chromosomes 17 (aliquots 8 and 9) and 18  
167 (aliquots 11 and 12) were measured from 2,000 sperm each because probes for these  
168 chromosomes were present in 2 different aliquots (1,000 counts from each).

169 **Diploidy:** Diploidy was assessed in aliquots containing 4 or 5 probes (total 10  
170 aliquots). When 2 signals were observed for all of the 4 probes in aliquots 3, 4, 6, 8, 9,  
171 10, 11 and 12 in spermatozoa with one tail, it was scored as diploidy. In aliquots 1 and  
172 2 (5 probes each), 2 signals for 3 or 4 probes were needed to score diploidy depending  
173 on whether the sperm cell contained a Y (1 probe) or and X (2 probes) (see Figure 1).

174

### 175 **Statistical analysis**

176 Differences in the propensity for disomy and diploidy abnormalities between the two  
177 age groups were evaluated using a generalized estimating equation, GEE method. The  
178 GEE model was used because it takes into account the possible within-individual  
179 correlation. The GEE model was fitted using the REPEATED statement in the  
180 GENMOD procedure. The conservative Type 3 statistics score was used for the

181 analysis of the effects in the model. For diploidy, aliquot analysis was conducted by  
182 comparing in each individual each aliquot count with the mean of the remaining  
183 aliquots. In this case, the non-parametric Wilcoxon test in two versions either the  
184 signed-rank test or the rank-sum test was used. Statistical significance was set at  
185  $p < 0.05$ . Statistical analyses were carried out with SAS/STAT release 9.02 (SAS  
186 Institute Inc; Cary, NC).

187       **RESULTS**

188       In the present study we analysed 15,000 spermatozoa for each of the 10 donors  
189       and a total of 150,000 cells. The donors were divided into two groups according to  
190       age: a group of five individuals younger than 40 (mean age 27.8) and a group of five  
191       individuals older than 60 years of age (mean age 66.4).

192       Table I shows the percentages of disomy. Total autosomal disomy (17 autosomes) in  
193       the younger group was 0.98 and lower in the older group (0.85), but the difference was  
194       not statistically significant ( $p=0.5679$ ). Likewise, when we compared disomy  
195       frequencies for each autosome between the two donor age groups, no statistical  
196       differences were observed for any of the chromosomes (Figure 2). However, when  
197       looking at autosomal disomy collectively in the 10 donors, our results show a decreased  
198       frequency of disomy for chromosomes 7 (0) and 18 (0.015) with respect to the mean of  
199       the remaining chromosomes ( $p=0.0020$  and  $p=0.0078$  Wilcoxon signed-rank test,  
200       respectively). Total acrocentric (#13, 14, 15, 21 and 22) disomy was the same in the  
201       young and older group (0.26). However, there was an increase in the frequency of  
202       disomy for each of the small acrocentrics namely chromosomes 21 and 22, from 0.06  
203       in the young to 0.10 in the older donors although it is not statistically significant.

204

205       → Table I

206       → Figure II

207       The total percentage of sex chromosome disomy was 0.19 in the younger men as  
208       well as in the older. Frequencies of XX, YY and XY were not statistically different in  
209       the 2 groups of age, neither was total sex chromosome disomy.

210       Total chromosome disomy (17 autosomes plus sex chromosomes) was not  
211       statistically different between younger (1.17) and older (1.04) donors ( $p=0.5817$ ).

212 A 2-fold higher mean sex chromosome disomy (0.095 in both young and old)  
213 compared to mean autosomal disomy of the 17 autosomes analysed (0.057 in  
214 young and 0.05 in old) was observed. Likewise, when looking collectively at the  
215 whole group, we observed a statistically higher rate ( $p=0.0273$ ) of sex chromosome  
216 disomy (0.095) compared with that of autosomal disomy (0.0538).

217

## 218 **Diploidy**

219 Table II depicts the data on diploidy. In each individual, independent values on  
220 diploidy were assessed for aliquots containing at least 4 probes for a total 10  
221 independent values (Figure 1). Variations on the scoring of diploidy depending on  
222 the aliquot were observed across all donors. In each individual, we calculated the  
223 difference between the diploidy values in each aliquot and the mean of remaining  
224 aliquots. Taken the whole group of 10 individuals together, our results indicate that  
225 aliquots 4 (4p 4q 21q 21LSI) and 9 (9p 9q 17CEN 17q) have a significant tendency  
226 to show higher levels of diploidy ( $p=0.0195$  and  $p=0.0332$ , respectively).

227

228 → Table II

229 Diploidy as a mean of the values obtained from the 10 aliquots utilized to measure  
230 diploidy, was (0.27) the younger group and (0.20) in the older. This decrease was not  
231 statistically significant.

232 The percentages of all of the numerical chromosome abnormalities in each  
233 individual and each group age are shown in Table III.

234

235 → Table III

236

237       There were no significant differences in the percentages of total numerical  
238       chromosome abnormalities assessed as disomy (17 autosomes plus sex  
239       chromosomes) plus diploidy between the two age groups.

240



241 **DISCUSSION**

242 This study was designed to determine if numerical chromosome abnormalities in  
243 human sperm are influenced by the age of the donor. An effort was made to include  
244 young donors (<40 years) and older donors (>60 years) in order to highlight a  
245 potential age effect. Our objectives were to determine the rates of aneuploidy in 17  
246 autosomes and sex chromosomes in a single study using a single sperm  
247 sample/donor thus minimizing intra-donor variability and optimizing consistent  
248 analysis and scoring standards. We also set up to investigate the potential  
249 association between aneuploid or diploid sperm and age and, finally, to test the  
250 reliability of scoring for diploidy in multiple FISH assays with different chromosome  
251 combinations. Despite of the sample size, the interindividual variability was taken  
252 into account in the statistical analysis.

253 Our methods in the current study have been restrictive and may have contributed to  
254 an overall observation of lower rates of disomy and diploidy. We needed 2 signals  
255 for 2 different probes of the same chromosome (the majority subtelomeric or LSI  
256 probes) to score disomy, whereas previous studies of the same authors (Bosch et  
257 al., 2003) and the majority of reports on sperm chromosome disomy are usually  
258 based on 1 centromeric probe/chromosome. Likewise, for the scoring of diploidy we  
259 currently needed 2 signals of 3 or 4 probes (mostly non-centromeric probes) in 2  
260 chromosomes whereas our previous report (Bosch et al. 2001) required 2 signals of  
261 3 probes (mostly centromeric probes) in 3 chromosomes. It is well known that  
262 centromeric or Satellite III probes may display split signals as they detect large  
263 blocks of repetitive DNA. Overall, our rate of chromosome 21 disomy using an LSI  
264 and a telomeric probe was 0.08 (range 0.00-0.20), which compares with what was  
265 recently described by Iwarsson *et al* (2015) using a chromosome 21 LSI and a  
266 telomeric probe. They report disomy 21 of 0.13 %, with a range of 0.00 %-0.25%.

267 Specificity and sensitivity of FISH in interphase somatic cells have been established  
268 (Shaffer and Bui, 2007) but equivalent studies have not been carried out in sperm.  
269 There is no technical standard for consistency in the degree of decondensation of  
270 the sperm nucleus (a required step prior to hybridization), which may affect the  
271 distance between signals. Alternatively, subtelomeric and LSI probes detect short  
272 non-repetitive sequences (60-200 kb in *TelVysion* assay), offering frequently small  
273 and faint signals.

274

### 275 **Disomy and paternal age**

276 There was a slight decrease in autosomal disomy (17 chromosomes) from the younger  
277 to the older group, which was not significant. A significant decrease in disomy in older  
278 men was noted in sperm complements obtained by the hamster technique (Martin and  
279 Rademaker, 1987). Interestingly, a recent extensive retrospective report of live born  
280 children with trisomy 13, 18 and 21 suggests that younger fathers have a higher risk of  
281 offspring with chromosomal aneuploidies (Steiner et al. 2015).

282 Most of the published studies addressing paternal age effect on sperm aneuploidy  
283 are based on observations of the few viable human aneuploidies and have rarely  
284 touched on diploidy. Moreover, the age of the donors seems to fluctuate towards  
285 late middle age and very few reports contain older donors in their 60's and 70's.  
286 Interdonor variability on aneuploidy of healthy men is wide (Rubes et al. 2005;  
287 Tempest et al. 2009) and transient intra donor variability has been reported as well  
288 (Tempest et al. 2009) rendering the study of frequency of aneuploidy with age  
289 difficult to assess. Hidden germ cell line mosaicism could be a cause of inter-  
290 individual differences in the rates of sperm aneuploidy. Known environmental  
291 exposures that affect the rate of aneuploidy in spermatozoa include smoking, to a  
292 lesser extent alcohol and caffeine (Robbins et al. 1997) and exposures to some

293 pesticides. DNA-damaging agents such as chemotherapy also affect the rate of  
294 aneuploidy (Martin et al. 1999).

295 Previous FISH studies have found no evidence of a paternal age effect on sperm  
296 aneuploidy for most autosomes (reviewed in Buwe et al. 2005). Only few reports have  
297 shown slight increases in autosomal disomy for chromosomes 1 (Martin et al. 1995), 9  
298 (Bosch et al. 2003) and 21 (Rousseaux et al. 1998). We have found that for both  
299 chromosomes 21 and 22 the frequency of disomy increases with age from 0.06 in the  
300 young to 0.10 in the older group (for both chromosomes) although these increases are  
301 not statistically significant. Sperm aneuploidy for chromosome 21 is 0.17% (based on  
302 numerous studies reviewed in Templado et al., 2011a) and for chromosome 22 is  
303 reported at 0.47% (based only on 2 studies) and these two frequencies are the highest  
304 among all autosomes. Overall, our disomy 21 (0.08) is about half of the disomy of the  
305 sex chromosomes (0.19), which is in line with that reported in the literature (Templado  
306 et al., 2011a). It is not clear whether advanced paternal age is a risk factor for trisomy  
307 21 (reviewed in Fonseka and Griffin).

308 In the current study, there were no significant differences in the incidence of sex  
309 chromosome disomy between younger donors and older donors. Some authors have  
310 detected moderate increases in sex chromosome aneuploidy between younger and  
311 older men (Griffin et al. 1995; Kinakin et al. 1997; Guttenbach et al. 2000). The  
312 differences observed for the sex chromosomes in the different studies could be  
313 attributed to interindividual variations (Guttenbach et al. 2000)

314 The incidence of sex chromosome disomy was approximately double that of mean  
315 autosome disomy in both groups of age and when looking at all donors collectively.

316 Elevated sex chromosome aneuploidy compared to autosomal disomy has been  
317 reported in sperm karyotypes (Martin and Rademaker, 1990) and numerous FISH  
318 studies (reviewed in Templado et al. 2011a, 2013) where most authors report a 2-fold -

319 3-fold increase compared to autosomal non-disjunction. This work confirms that  
320 aneuploidy of the sex chromosomes is more common than that of the autosomes and  
321 suggests that the relationship between the two does not change with age. The sex  
322 chromosomes might be more prone to meiotic errors, such as achiasmate non-  
323 disjunction or premature separation of sister chromatids, the two main mechanisms  
324 described in human spermatogenesis (Uroz and Templado, 2012).

325

### 326 **Diploidy and paternal age**

327 In our study there is a small decrease in the frequency of diploidy with paternal age,  
328 although it is not statistically significant. Similarly, Robbins *et al* (1995, 1997)  
329 described a decrease of diploidy with age, however, their results showed statistical  
330 significance. The majority of authors do not observe an age effect on diploidy (Griffin  
331 *et al.* 1995; Martin *et al.* 1995; Lütjens *et al.* 2002; reviewed in Buwe *et al.* 2005 and  
332 Fonseka and Griffin, 2011).

333 Our earlier studies (Bosch *et al.* 2001, 2003) in 18 donors from 18 to 74 years of  
334 age, we found a lineal increase of diploidy with age. In the current report 9 of 10  
335 donors were common with our earlier study. However, here we have a new young  
336 donor (C8) with high diploidy and in the earlier study 3 older ones (not studied here)  
337 with high diploidy. Donor selection bias may also have contributed to the  
338 differences in the rates of diploidy in the 2 reports, in addition to the different probe  
339 mix used as discussed earlier.

340 The design of our study allows the comparison of the frequency of diploidy detected  
341 by each aliquot of 4 probes or more and on each individual donor. Comparing the  
342 frequency of diploidy of a particular aliquot with the mean result of the remaining  
343 aliquots, we observed that aliquots 4 (4p 4q 21q LSI 21) and 9 (9p 9q 17CEN 17q)  
344 display statistically significant levels of diploidy. This suggests that, in agreement

345 with others authors (Finch et al. 2008), probe combinations may affect FISH results.  
346 Moreover, due to the relatively low number of spermatozoa analysed per aliquot  
347 small differences may be magnified. Alternatively, the possibility that some sperm  
348 cells scored as diploid might, in fact, be double disomics cannot be ruled out (Godo  
349 et al. 2013).

350 In summary, this is the only study addressing age with simultaneous assessment of  
351 disomy in 19 chromosomes (17 autosomes and the sex chromosomes) in one  
352 single study using a single sperm sample per donor thus minimizing intra-donor  
353 variability and optimizing consistent analysis and scoring standards. In addition,  
354 diploidy was assessed by multiple assays in each individual. Although a small  
355 decrease in the incidence of autosomal disomy and diploidy was observed in the  
356 older men, there were no significant differences on the incidence of autosomal  
357 disomy, sex chromosome disomy, total chromosome disomy, diploidy, nor total  
358 numerical abnormalities in healthy men. Our results show that although the  
359 incidence of sex chromosome disomy is higher than autosomal disomy in both  
360 young and old, the relationship between sex chromosome disomy and autosomal  
361 disomy does not change with age. Our results indicate that some aliquots have a  
362 significant tendency to show higher levels of diploidy suggesting that probe  
363 combinations may affect FISH results thus highlighting the limitations of FISH.  
364 Calculating a conservative measure of aneuploidy as twice the frequency of total  
365 chromosome disomy (here extrapolated to 24 chromosomes), the younger men  
366 have 2.69% and the older have 2.39%. These numbers are half of that seen in FISH  
367 studies (4.5%) (reviewed in 18) and in the ranges of the conservative aneuploidy  
368 quoted for sperm karyotypes (1.8%) (reviewed in Templado et al. 2005).  
369 Alternatively, given that an increase of aneuploidy with age has not been clearly  
370 demonstrated in spermatozoa of healthy men, we wonder whether in men with

371 infertility and in men with high number of abnormal forms who have higher levels of  
372 sperm aneuploidy to start with, such an effect would be detectable.

373

374 **AUTHOR'S ROLES**

375 AD: carried out the experiments, generated the data, data analysis and critical  
376 discussion. AE: data analysis, critical discussion and manuscript drafting. JG: data  
377 analysis, statistical analysis, and critical discussion. CT: study design, supervised the  
378 experiments, data analysis, critical discussion and manuscript drafting.

379

380

381 **CONFLICT OF INTEREST**

382 None to declare

383

384

385 **REFERENCES**

- 386 1. Angell R: Predivision in human oocytes at meiosis I. A mechanism for trisomy  
387 formation in man. *Hum Genet* 86:383-387 (1991).
- 388 2. Bosch M, Rajmil O, Martínez-Pasarell O, Egozcue J, Templado C: Linear increase  
389 of diploidy in human sperm with age. a four-colour FISH study. *Eur J Hum Genet*  
390 9:533-538 (2001).
- 391 3. Bosch M, Rajmil O, Egozcue J, Templado C: Linear increase of structural and  
392 numerical chromosome 9 abnormalities in human sperm regarding age. *Eur J Hum*  
393 *Genet* 11:754-759 (2003).
- 394 4. Buwe A, Guttenbach M, Schmid M: Effect of paternal age on the frequency of  
395 cytogenetic abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res*  
396 111:213-228 (2005).
- 397 5. De Souza E, Morris JK, EUROCAT Working Group: Case-control analysis of  
398 paternal age and trisomic anomalies. *Arch Dis Child* 95:893-897 (2010).
- 399 6. Estop AM, Márquez C, Munné S Navarro J, Ciepły et al: An analysis of human  
400 sperm chromosome breakpoints. *Am J Hum Genet* 56:452-460 (1995).
- 401 7. Finch KA, Fonseka KGL, Abrogrein A, Ioannou D, Handyside AH et al: Nuclear  
402 organization in human sperm: preliminary evidence for altered sex chromosome  
403 centromere position in infertile males. *Hum Reprod* 23:1263-70 (2008).
- 404 8. Fonseka KGL, Griffin DK: Is there a paternal age effect for aneuploidy? *Cytogenet*  
405 *Genome Res* 133:280-291 (2011).
- 406 9. Godo A, Blanco J, Vidal F, Anton E: Accumulation of numerical and structural  
407 chromosome imbalances in spermatozoa from reciprocal translocation carriers.  
408 *Hum Reprod* 28:840-849 (2013).



- 409 10. Griffin DK, Abruzzo MA, Millie EA, Sheean LA, Feingold E et al: Non-disjunction in  
410 human sperm: evidence for an effect of increasing paternal age. *Hum Mol Genet*  
411 12:2227-2232 (1995).
- 412 11. Guttenbach M, Köln, Engel W, Schmid M: Meiotic nondisjunction of chromosomes  
413 1, 17, 18, X and Y in men more than 80 years of age. *Cytogenet Genome Res*  
414 63:1727-1729 (2000).
- 415 12. Hassold T, Sherman S: Down syndrome: genetic recombination and the origin of  
416 the extra chromosome 21. *Clin Genet* 57:95-100 (2000).
- 417 13. Iwarsson E, Kvist U, Hultén MA: Disomy 21 in spermatozoa and the paternal origin  
418 of trisomy 21 Down syndrome. *Molecular Cytogenetics* 8:67 (2015).
- 419 14. Kinakin B, Rademaker A, Martin R: Paternal age effect of YY aneuploidy in human  
420 sperm, as assessed by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*  
421 78:116-119 (1997).
- 422 15. Kushnir VA, Scott RT, Frattarelli JL: Effect of paternal age on aneuploidy rates in  
423 first trimester pregnancy loss. *J Med Genet Genom* 2:38-43 (2010).
- 424 16. Lütjens CM, Rolf C, Gassner P, Werny JE, Nieschlag E: Sperm aneuploidy rates  
425 in younger and older men. *Hum Reprod* 7:1826-1832 (2002).
- 426 17. Martin RH, Rademaker AW: The effect of age on the frequency of sperm  
427 chromosome abnormalities in normal men. *Am J Hum Genet* 41:484-92 (1987).
- 428 18. Martin RH, Rademaker AW: The frequency of aneuploidy among individual  
429 chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements. *Cytogenet Cell*  
430 *Genet* 53:103-107 (1990).
- 431 19. Martin RH, Spriggs E, Ko E, Rademaker AW: The relationship between  
432 paternal age, sex ratios, and aneuploidy frequencies in human sperm, as  
433 assessed by multicolor FISH. *Am J Hum Genet* 57:1395-1399 (1995).
- 434 20. Martin RH, Ernst S, Rademaker A, Barclay L, Ko E et al: Analysis of sperm

- 435 chromosome complements before, during, and after chemotherapy. *Cancer Genet*  
436 *Cytogenet* 108:133-136 (1999).
- 437 21. Neusser M, Rogenhofer N, Dürl S, Ochsenkühn R, Trottmann M et al:  
438 Increased chromosome 16 disomy rates in human spermatozoa and  
439 recurrent spontaneous abortions. *Fertil Steril* 104:1130-1137 (2015).
- 440 22. Olson SD, Magenis RE: Preferential paternal origin of de novo structural  
441 chromosome rearrangements, in Daniel A (ed): *The cytogenetics of mammalian*  
442 *autosomal rearrangements*. pp 583–599 (Alan R Liss, New York 1988).
- 443 23. Risch N, Stein Z, Kline J, Warburton D: The relationship between maternal age  
444 and chromosome size in autosomal trisomy. *Am J Hum Genet* 39:68-78 (1986).
- 445 24. Rousseaux S, Hazzouri M, Pelletier R, Monteil M, Usson Y et al: Disomy rates for  
446 chromosomes 14 and 21 studied by fluorescent in situ hybridization in  
447 spermatozoa from three men over 60 years of age. *Mol Hum Reprod* 4:695-699  
448 (1998).
- 449 25. Robbins WA, Baulch JE, Moore D 2nd, Weier HU, Blakey D et al: Three-probe  
450 fluorescence in situ hybridization to assess chromosome X, Y, and 8 aneuploidy in  
451 sperm of 14 men from two healthy groups: evidence for a paternal age effect on  
452 sperm aneuploidy. *Reprod Fertil Dev* 7:799-809 (1995).
- 453 26. Robbins WA, Vine MF, Truong KY, Everson RB: Use of FISH (Fluorescence in situ  
454 hybridization) to assess effects of smoking, caffeine and alcohol on aneuploidy  
455 load in sperm of healthy men. *Environ Mol Mutagen* 30:175-183 (1997).
- 456 27. Rubes J, Vozdova M, Oracova E, Perreault SD: Individual variations in the  
457 frequency of sperm aneuploidy in humans. *Cytogenet Genome Res* 111:229–236  
458 (2005).
- 459 28. Shaffer LG, Bui TH: Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods  
460 in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 145C:87-98 (2007).

- 461 29. Steiner B, Masood A, Rufiback K, Niedrist D, Kundert O et al: An unexpected  
462 finding: younger fathers have a higher risk for offspring with chromosomal  
463 aneuploidies. *Eur J Hum Genet* 23:466-472 (2015).
- 464 30. Tempest HG, Ko E, Rademaker A, Chan P, Robaire B, Martin RH: Intra-individual  
465 and inter-individual variations in sperm aneuploidy frequencies in normal men.  
466 *Fertil Steril* 91:185-191 (2009).
- 467 31. Templado C, Bosch M, Benet J: Frequency and distribution of chromosome  
468 abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 111:199-205  
469 (2005).
- 470 32. Templado C, Vidal F, Estop AM: Aneuploidy in human spermatozoa. *Cytogenet*  
471 *Genome Res* 113:91-99 (2011a).
- 472 33. Templado C, Donate A, Giraldo J, Bosch M, Estop AM: Advanced age increases  
473 chromosomal structural abnormalities in human spermatozoa. *Eur J Hum Genet*  
474 19:45-51 (2011b).
- 475 34. Templado C, Uroz L, Estop AM: New insights on the origin and relevance of  
476 aneuploidy in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 19:634-643 (2013).
- 477 35. Uroz L, Templado C: Meiotic non-disjunction mechanisms in human fertile males.  
478 *Hum Reprod* 27:1518-1524 (2012).
- 479

480 **TITLES AND LEGENDS TO FIGURES**

481

482

483 **Figure 1.** The 15 aliquots of the FISH probe panel used showing both the chromosome  
484 location and the colour of the probes (spectrum Orange, spectrum Green and spectrum  
485 Aqua) from each aliquot.

486

487 **Figure 2.** Percentage of chromosome disomy in each of the 17 autosomes analysed  
488 and in each age group.

489

490

Table I. Sperm disomy in each of the 17 autosomes and sex chromosomes per donor and age group

Donor	Age (years)	% Disomy																					
		CR 1	CR 2	CR 3	CR 4	CR 6	CR 7	CR 8	CR 9	CR 10	CR 11	CR 12	CR 13	CR 15	CR 17	CR 18	CR 21	CR 22	Total auto-somes	XX	YY	XY	Total sex chrom
C8	23	0.10	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.30	0.10	0.10	0.00	0.10	0.00	0.10	0.05	0.10	0.10	1.45	0.00	0.10	0.05	0.15
C3	24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.30	0.10	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.45	0.00	0.20	0.00	0.20
C4	25	0.10	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.40	0.10	0.00	0.00	0.10	0.10	0.20	0.05	0.00	0.20	0.00	1.35	0.00	0.00	0.30	0.30
C9	30	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.10	0.05	0.00	0.00	0.35	0.00	0.10	0.10	0.20
C5	37	0.10	0.10	0.10	0.00	0.20	0.00	0.10	0.00	0.20	0.00	0.10	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.20	1.30	0.00	0.00	0.10	0.10
Mean <40 years	27.8	0.08	0.10	0.04	0.00	0.04	0.00	0.10	0.08	0.06	0.08	0.06	0.06	0.08	0.06	0.02	0.06	0.06	0.98	0.00	0.08	0.11	0.19
C7	60	0.10	0.10	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.10	0.00	0.10	0.10	0.05	0.00	0.00	0.10	0.85	0.00	0.00	0.10	0.10
C10	62	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.10	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.10	0.05	0.10	0.20	1.05	0.00	0.15	0.20	0.35
C2	64	0.00	0.00	0.10	0.10	0.10	0.00	0.10	0.10	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	0.05	0.00	0.20	0.00	0.95	0.05	0.10	0.00	0.15
C6	72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.10	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.10	0.60	0.00	0.05	0.10	0.15
C1	74	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.20	0.20	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.80	0.00	0.05	0.15	0.20
Mean >60 years	66.4	0.06	0.02	0.02	0.04	0.02	0.00	0.10	0.06	0.06	0.10	0.06	0.04	0.02	0.04	0.01	0.10	0.10	0.85	0.01	0.07	0.11	0.19
Mean Total disomy		0.07	0.06	0.03	0.02	0.03	0.00	0.10	0.07	0.06	0.09	0.06	0.05	0.05	0.05	0.02	0.08	0.08	0.92	0.01	0.08	0.11	0.19

Table II. Independent values of sperm diploidy observed in each donor and aliquot

Donor	Age (years)	% Diploidy										% Mean diploidy
		Aliquot 1 <sup>a</sup>	Aliquot 2 <sup>a</sup>	Aliquot 3 <sup>b</sup>	Aliquot 4 <sup>b</sup>	Aliquot 6 <sup>b</sup>	Aliquot 8 <sup>b</sup>	Aliquot 9 <sup>b</sup>	Aliquot 10 <sup>b</sup>	Aliquot 11 <sup>b</sup>	Aliquot 12 <sup>b</sup>	
Chromosomes studied in each aliquot		1, X, Y	2, X, Y	3, 22	4, 21	6, 13	8, 17	9, 17	10, 15	11, 18	12, 18	
C8	23	0.20	0.10	0.40	0.40	0.30	0.50	0.60	0.20	0.50	0.10	0.33
C3	24	0.10	0.20	0.20	0.20	0.30	0.40	0.40	0.20	0.30	0.30	0.26
C4	25	0.40	0.10	0.10	0.50	0.40	0.30	0.20	0.70	0.30	0.20	0.32
C9	30	0.00	0.30	0.10	0.20	0.20	0.20	0.30	0.10	0.40	0.10	0.19
C5	37	0.30	0.10	0.10	0.20	0.30	0.20	0.40	0.30	0.20	0.20	0.23
C7	60	0.20	0.30	0.10	0.40	0.10	0.20	0.30	0.30	0.00	0.00	0.19
C10	62	0.40	0.30	0.20	0.50	0.10	0.20	0.50	0.30	0.10	0.10	0.27
C2	64	0.10	0.30	0.20	0.30	0.00	0.30	0.20	0.10	0.00	0.20	0.17
C6	72	0.10	0.10	0.00	0.30	0.00	0.10	0.20	0.20	0.20	0.40	0.16
C1	74	0.20	0.20	0.30	0.30	0.20	0.10	0.20	0.20	0.10	0.30	0.20
<i>Mean</i>	47.1	0.20	0.20	0.17	0.33	0.19	0.26	0.33	0.26	0.21	0.19	0.23

<sup>a</sup>Diploidy values assessed in aliquots containing 5 probes on 4 regions

<sup>b</sup>Diploidy values assessed in aliquots containing 4 probes

Table III: Numerical chromosome abnormalities in spermatozoa of 10 healthy donors and age group

<i>Donor</i>	<i>Age (years)</i>	<i>% Total Disomy<sup>a</sup></i>	<i>% Diploidy</i>	<i>% Total numerical</i>
C8	23	1.60	0.33	3.53
C3	24	0.65	0.26	1.56
C4	25	1.65	0.32	3.62
C9	30	0.55	0.19	1.29
C5	37	1.40	0.23	3.03
<i>Mean &lt; 40 years</i>	27.8	1.17	0.27	2.61
C7	60	0.95	0.19	2.09
C10	62	1.40	0.27	3.07
C2	64	1.10	0.17	2.37
C6	72	0.75	0.16	1.66
C1	74	1.00	0.20	2.20
<i>Mean &gt; 60 years</i>	66.4	1.04	0.20	2.28

<sup>a</sup> Includes percentage of disomy of all chromosomes with the exception of chromosomes 5, 14, 16, 19 and 20







## AGRAÏMENTS

Pensava que ja escrivint la tesi ja havia fet el més difícil...però m'equivocava...

Primerament, gràcies al departament i a la Cristina per acollir-me i donar-me la possibilitat de poder investigar quan vaig acabar la carrera. Sobretot a Cristina, que sense la seva insistència, segur que no ho hagués pogut fer. Amb ella he après moltes coses, com a alumne i com a persona. Gràcies de tot cor!!

Altres parts molt importants, que en el meu treball actual tindria el nom de "col-laboradora necessària", seria l'Anna Estop. Aquest rol se li dona a la persona que sense ella no es podria perpetrar un crim....ayy, perdó, els meus articles. Gràcies per donar-nos part del teu valuós temps quan t'escapaves dels teus EEUU i et deixaves caure per Sabadell.

Agrair l'ajuda dels diferents professors d'aquest departament, que sempre han tingut la porta oberta del seu despatx per tots els dubtes que he tingut: Carme, Rosa, Quima i Jordi. Tampoc m'oblido del Jesús Giraldo, el meu geni estadístic particular i de la Mercè Bosch, amb qui vaig capficar-me amb el fabulós món de la FISH!

De la meua primera etapa en aquest departament, he de dir que va ser una etapa on realment vaig agafar la passió del laboratori, treballant colze amb colze amb el meu inestimable amic Javi, amb l'Ari i amb la Mònica. Tots quatre, hem rigut, hem descarregat les nostres angoixes i vam aprendre moltíssimmm!! També va ser d'agrair l'ajuda dels alumnes més avançats, com eren l'Imma, en Jordi i l'Ignasi. I no m'oblido de la persona més afectuosa i divertida d'aquest departament: M<sup>a</sup> Àngels!! Què avorrit seria aquest laboratori sense tu!!

Gràcies també a l'ajuda de l'Àngels i de l'Ana Utrabo, dos dones molt treballadores que encara que no es noti molt la seva presència, la seva feina no té preu. Sempre tenen la mà oberta pel que calgui.

Molts bons records amb la Raquel García, l'Albert Obradors, l'Elsa, la Yolanda, la Gemma, la Laia Uroz (t'he trobat a faltar per intercanviar situacions!!), la Cris Gutiérrez i en Jorge....Amb tots ells vaig coincidir una primera etapa en aquest laboratori, abans de marxar cap al món forense. De la meua segona etapa realitzant la tesi, l'etapa actual, només tinc paraules d'agraïment per l'Alba, en Keivan i la Pi. M'heu fet sentir molt a gust!!

Una altre part, no menys important, són els amics i companys que tinc a la meva actual feina, que han aguantat durant tres anys els meus patiments (Carina, Marta, Marc, Lydia, Rafa "El pelusilla", l'Edu, en Pep, l'Enric, l'Albert, la Susana, la Cori..)..quina paciència heu tingut!! Mercii!!

GRÀCIES a la meva família, perquè sense la seva inestimable ajuda, no ho hagués pogut aconseguir!! Gràcies als pares, que m'han donat totes les eines que tenien al seu abast per poder realitzar aquesta tesi. I sobretot, a l'Edu, per ser sempre qui m'escoltava quan li deia que no podia més, que no l'acabaria mai... sempre m'ha donat ànims per seguir!!



