



**Efecte de l'edat en les anomalies cromosòmiques  
de l'espermatozoide humà**

**Tesi Doctoral**

**Mercè Bosch González**

**2004**

# **Efecte de l'edat en les anomalies cromosòmiques de l'espermatozoide humà**

Memòria presentada per Mercè Bosch González per aspirar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona en el Programa de Doctorat de Biologia Cel·lular

Bellaterra, Abril de 2004

La Dra. Cristina Templado Meseguer, Catedràtica del Departament de Biologia Cel·lular,  
Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA:

Que na Mercè Bosch González ha realitzat sota la seva direcció el treball  
d'investigació amb el títol de "**Efecte de l'edat en les anomalies cromosòmiques de  
l'espermatozoide humà**", per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de  
Barcelona en el programa de Doctorat de Biologia Cel·lular.

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

Dra. Cristina Templado

Bellaterra, abril de 2004

Aquest treball ha rebut el suport econòmic de:

Ministeri de Ciència i Tecnologia: projecte BFI2002-01193

Generalitat de Catalunya: Grup consolidat "Citogenètica Bàsica i Clínica"

CIRIT, 1999 SGR-00104

CIRIT, 2001, SGR-00201

Mercè Bosch González ha estat beneficiària d'una beca predoctoral del Ministeri d'Educació i Cultura, AP(96).

# ÍNDEX

<b>1. Introducció</b>	<b>1</b>
1.1. Anomalies cromosòmiques a l'espècie humana	3
1.1.1. Origen meiótic de les anomalies cromosòmiques	5
<i>Origen meiótic de l'aneuploïdia</i>	5
<i>Origen meiótic de la poliploïdia</i>	7
<i>Origen meiótic de les anomalies estructurals</i>	9
1.1.2. Origen parental de les anomalies cromosòmiques	9
<i>Origen parental de les anomalies numèriques</i>	10
<i>Origen parental de les anomalies estructurals</i>	12
1.2. Anàlisi citogenètica de l'espermatozoide en individus control	13
<i>Estudi del cariotip haploide de l'espermatozoide humà</i>	12
<i>Hibridació in situ fluorescent en espermatozoides d'individus control</i>	15
1.3. Estudis en espermatozoides d'individus d'edat avançada	19
1.4. Objectius	21
<b>2. Material i mètodes</b>	<b>23</b>
2.1. Material biològic	25
2.2. Congelació de les mostres de semen	26
2.3. Obtenció d'extensions d'espermatozoides	26
2.4. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent multicolor	27
<i>Descondensació de la cromatina dels espermatozoides</i>	27
<i>Sondes utilitzades</i>	28
<i>Protocol de la tècnica de FISH multicolor</i>	28
<i>Tractament post-hibridació</i>	30
<i>Obtenció de dades</i>	30
<i>Criteris de recompte</i>	30
<i>Anàlisi estadística dels resultats</i>	32

<b>3. Resultats</b> .....	<b>33</b>
3.1. Anàlisi d'anomalies numèriques en espermatozoides .....	35
3.2. Anàlisi d'anomalies es estructurals en espermatozoides .....	40
<b>4. Discussió</b> .....	<b>45</b>
4.1. Variabilitat interindividual en la freqüència d'anomalies cromosòmiques .....	47
4.2. Efecte de l'edat sobre les anomalies numèriques .....	49
<i>Disomia 9</i> .....	49
<i>Disomia 21</i> .....	51
<i>Disomia dels cromosomes sexuals</i> .....	51
<i>Diploïdia</i> .....	52
4.3. Increment lineal d'alteracions estructurals del cromosoma 9 amb l'edat .....	53
4.4. Ratio sexual en espermatozoides normals i portadors d'anomalies .....	55
4.5. Estimació del risc d'anomalies cromosòmiques al llarg de la vida reproductiva .....	56
<b>5. Conclusions</b> .....	<b>59</b>
<b>6. Bibliografia</b> .....	<b>63</b>
<b>7. Articles</b> .....	<b>79</b>
7.1. Linear increase of diploidy in human sperm with age: A four-colour FISH study .....	81
7.2. Linear increase of structural and numerical chromosome 9 abnormalities in human sperm regarding age .....	89
<b>8. Annex</b> .....	<b>97</b>
Índex d'impacte de les revistes de l'àrea de Genètica i Herència. Journal Citation Report, 2002.	

## **1. Introducció**





## 1.1. Anomalies cromosòmiques a l'espècie humana

Les anomalies cromosòmiques, numèriques i estructurals, són la causa més important d'alteracions en el procés reproductiu humà (esterilitat, infertilitat i mortalitat), així com de malformacions congènites, retard mental i alteracions del comportament, presentant una freqüència de l'ordre del 50% en avortaments espontanis, 6% en morts perinatals i del 1% en nounats. La incidència d'anomalies numèriques i estructurals en diferents estadis de l'embriogènesi i en nounats es mostra en la Taula 1. La freqüència d'anomalies cromosòmiques va disminuint a mesura que avança el desenvolupament embrionari i s'acosta el naixement, posant de manifest l'elevada selecció negativa contra els embrions amb anomalies cromosòmiques al llarg del desenvolupament.

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

Tipus d'anomalia	% Avortaments espontanis	% Morts perinatals	% Nounats	% Gestacions Clíniques <sup>b</sup>
Trisomies	26,8	3,8	0,30	4,3
Monosomia X	8,6	0,25	<0,01	1,3
Poliploïdies	9,8	0,6	-	1,5
Estructurals	2,0	0,4	0,60	0,8
Altres	0,7	0,6	0,02	0,15
<b>Total</b>	<b>47,9</b>	<b>5,65</b>	<b>8,05</b>	<b>0,93</b>

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

<sup>b</sup> Freqüències estimades assumint un 15% d'avortaments espontanis i un 1% de morts perinatals

La freqüència d'anomalies cromosòmiques es va estimar en un 8% en embarassos clínicament reconeguts, tenint en compte un 15% d'avortaments espontanis i un 1% de morts perinatales (Jacobs, 1992; Jacobs i Hassold, 1995). Aquests percentatges serien encara superiors si es tinguessin en compte els primers estadis del desenvolupament embrionari, on la freqüència estimada d'avortaments espontanis és al voltant del 60% (Edwards, 1986; Stephenson i col 2002). A més, la freqüència d'anomalies cromosòmiques en estadis pre i periimplantacionals (85%) (Bulletti i col, 1996) es gairebé el doble de l'observada en avortaments espontanis (47,9%) (Jacobs, 1992).

Les anomalies numèriques (monosomies i trisomies totals, i poliploïdies) són les alteracions més freqüents en avortaments espontanis (veure Taula 1). Les úniques anomalies numèriques compatibles amb la vida són la monosomia del cromosoma X i les trisomies pels autosomes 13, 18 i 21, i pels cromosomes sexuals. No obstant, la trisomia 16, la més freqüent en la nostra espècie, només ha estat observada en avortaments espontanis (Hassold i Jacobs, 1984; revisat per Jacobs i Hassold, 1995) mentre que algunes altres trisomies, com la del cromosoma 1, tant sols s'han observat en embrions en estadi de vuit cèl·lules (Wat i col, 1987; Jamieson i col, 1994; Laverge i col, 1997), posant de manifest l'elevada selecció diferencial d'anomalies letals durant l'embaràs. La poliploïdia (triploïdies i tetraploïdies) és considerada una alteració letal encara que s'ha descrit el naixement de alguns poliploides mosaics, i més rarament de triploides no mosaics (Sherard i col, 1986; revisat per Zaragoza i col, 2000). Aquestes diferències en la incidència d'aneuploïdia per a cada cromosoma, podrien reflectir tant una selecció negativa embrionària, com canvis en la freqüència del seu mecanisme d'origen (veure apartat 1.1.1).

Les anomalies estructurals (bàsicament, monosomies i trisomies parcials, i reorganitzacions equilibrades), mostren un major grau de supervivència que les numèriques, essent la seva freqüència en nounats practicament el doble que la observada per a les anomalies numèriques. L'anomalia estructural més freqüent en nounats són les translocacions recíproques (1 de cada 625) , seguides de translocacions robertsonianes (1 de cada 1.000), cromosomes marcadors, delecions intersticials i terminals, i duplicacions (revisat per Shaffer i Lupski, 2000).

La majoria de les anomalies cromosòmiques s'originen *de novo* en meiosi durant la formació de les gàmetes (oogènesi i espermatogènesi) en progenitors amb cariotip somàtic normal o són heretades d'un progenitor portador d'una reorganització estructural (inversions, translocacions i insercions). La resta d'anomalies s'originen en mitosi, durant l'embriogènesi, donant lloc a individus mosaics amb dues o més línies cel·lulars amb diferent cariotip. No obstant l'origen meiòtic de la majoria de les anomalies cromosòmiques, els estudis citogenètics a l'espècie humana han estat realitzats bàsicament, en cèl·lules somàtiques (sèries de nounats i d'avortaments espontanis), degut a la major dificultat de fer aquest estudis en cèl·lules germinals.

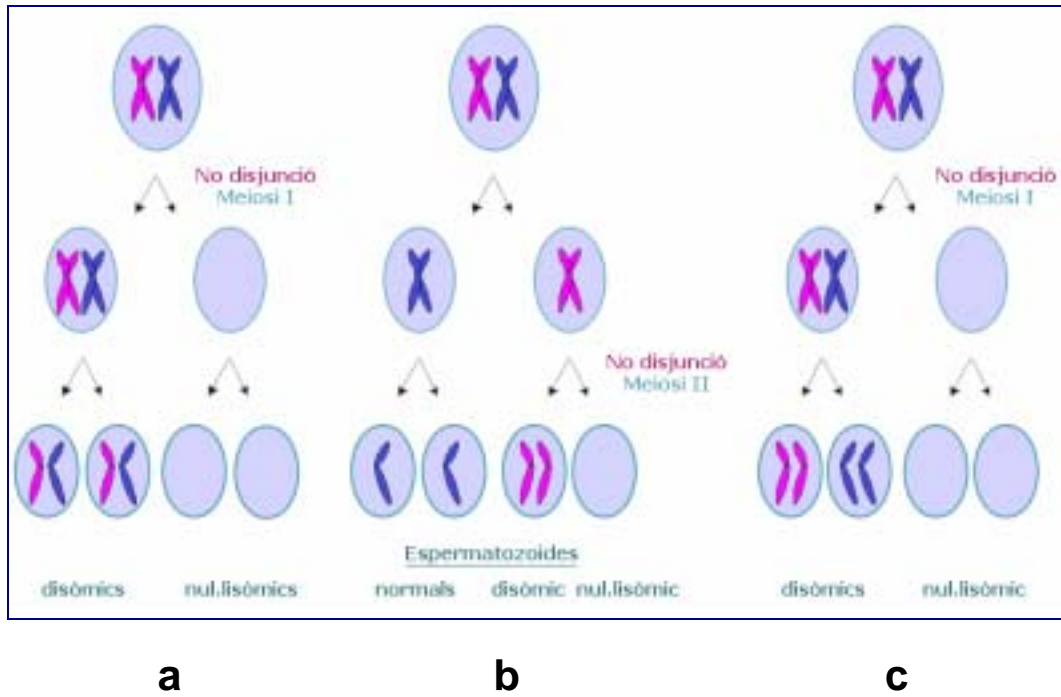
En els últims anys, la tècnica molecular d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) multicolor, utilitzant dues o més sondes de DNA simultàneament, permet l'anàlisi ràpida i fiable d'anomalies numèriques i estructurals en l'espermatozoide humà (Williams i col, 1993). Aquesta tècnica ha obert la possibilitat d'aprofundir en l'estudi del risc de transmissió d'anomalies cromosòmiques a la descendència i dels factors que les induexen (veure apartats 1.2 i 1.3).

### **1.1.1. Origen meiòtic de les anomalies cromosòmiques**

#### *Origen meiòtic de l'aneuploidia*

Durant la gametogènesi, els mecanismes que originen aneuploidies són la no disjunció i la pèrdua anafàsica, essent el primer el més freqüent a l'espècie humana (revisat per Marquez i col, 1996). La no disjunció consisteix en la no segregació d'ambdós cromosomes homòlegs durant la primera divisió meiòtica, o d'ambdues cromàtides germanes durant la segona divisió. En qualsevol dels dos casos, té lloc la formació de gàmetes nul·lisòmiques (22 cromosomes) i disòmiques (24 cromosomes), en la mateixa proporció (1:1). Més recentment, Lamb i col·laboradors (1996), van proposar que el procés de no disjunció s'iniciaria sempre a meiosi I, amb no segregació del parell de cromosomes homòlegs, seguit

de la migració durant la meiosi II, de les dues cromàtides germanes de cada cromosoma al mateix pol, donant lloc a disomies uniparentals (Figura 1).



**Figura 1.** Mecanismes de formació d'espermatozoides aneuploides. (a, b) No disjunció a primera i segona divisió meiótica, respectivament. (c) Mecanisme alternatiu de no disjunció proposat per Lamb i col·laboradors (1996)

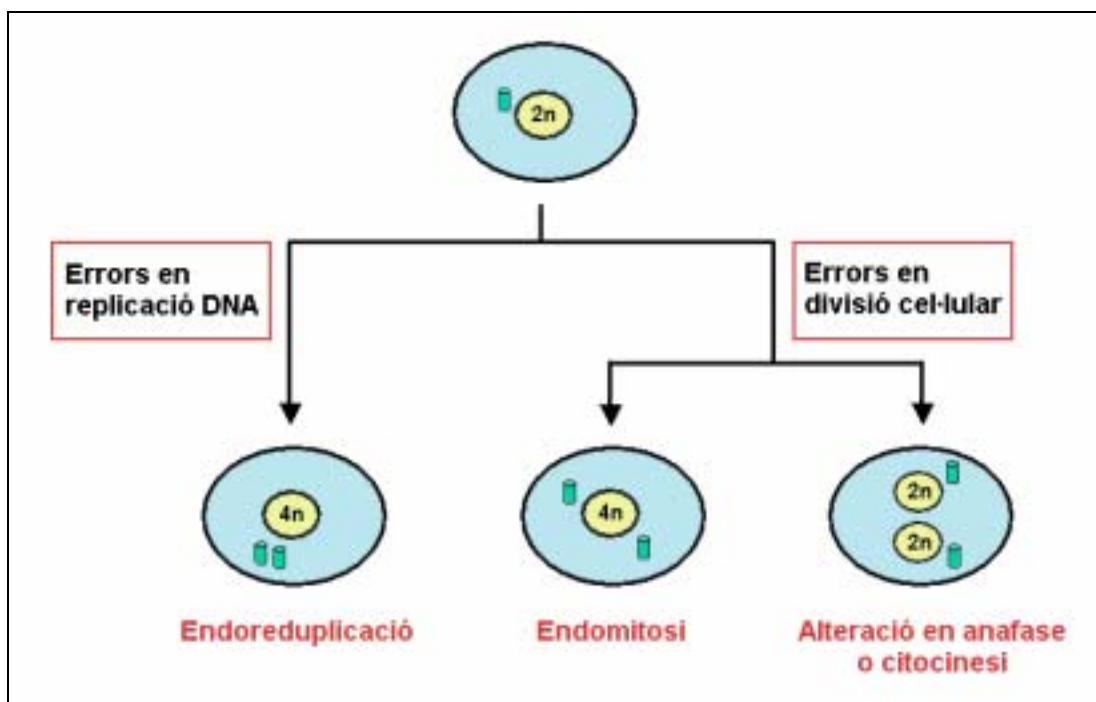
L'altre mecanisme que origina aneuploïdia és la pèrdua anafàsica, que consisteix en la no migració d'un cromosoma o d'una cromàtide al pol corresponent, durant l'anafase I o II respectivament, donant lloc a la formació de gàmetes nul·lisòmics i normals. La determinació de la freqüència d'aquest mecanisme en gàmetes és difícil per la limitació de les tècniques disponibles a l'hora de diferenciar nul·lisomies produïdes per errors durant la meiosi o per falles d'hibridació.

En els últims anys, mitjançant tècniques moleculars, s'ha correlacionat l'aneuploidia amb alteracions en la recombinació genètica (revisat per Hassold i col, 2000). En alguns organismes model, com llevat i *Drosophila*, s'han trobat mutacions que disminueixen o anul·len la recombinació, provocant bloqueig meiòtic, errors de segregació, o elevades taxes de no disjunció (Shi i col, 2002; Scott, 2003). L'estudi dels mapes de recombinació de diversos cromosomes humans (15, 16, 18, 21, X, Y) (Sherman i col, 1991; Robinson i col, 1993; MacDonald i col, 1994; Hassold i col, 1995; Lamb i col, 1996; Lamb i col, 1997; Savage i col, 1998; Bugge i col, 1998), juntament amb l'estudi de l'herència de polimorfismes de DNA en fetus trisòmics (revisat per Hassold i Hunt, 2001), indiquen que una disminució en el nombre de quiasmes així com una distribució anormal dels mateixos (posicions subòptimes, molt distals, o pericentromèriques) durant la meiosi I, augmenten el risc de no disjunció (revisat per Hassold i col, 2000; Sun i col, 2004). Tantmateix, poden existir altres factors causants de no disjunció, actuant per separat o de forma conjunta amb una recombinació aberrant, com podrien ser una separació prematura de cromàtides germanes per pèrdua de cohesió entre elles, l'adhesió dels cromosomes homòlegs a microtúbuls de diferent polaritat (revisat per Petronczki i col, 2003), factors ambientals externs (revisat per Guttenbach, 1997), o un microambient testicular alterat (Mroz i col, 1999; Egozcue i col, 2000).

### *Origen meiòtic de la poliploidia*

Recentment, mitjançant estudis de polimorfismes de microsatèl·lits en 61 embrions triploides, Zaragoza i col·laboradors (2000) van determinar que la triploidia majoritàriament s'origina per dispèrmia (fecundació d'un oòcit per dos espermatozoides) (60,6%). La resta, s'origina per fecundació d'una gàmete diploide formada durant la meiòsi (36%), com a conseqüència d'una fusió d'oòcits (3,2%), o d'errors mitòtics postmeiòtics (1,6%). La formació d'espermatozoides diploides pot resultar d'errors a la meiosi o a la mitosi amb la formació d'espermatogonies poliploides. Els principals mecanismes que donen lloc a poliploidia han estat descrits en cèl·lules somàtiques (Figura 2). La poliploidia s'origina més

freqüentment per endoreduplicació, procés en el qual els cromosomes repliquen dues o més vegades abans d'entrar en divisió. Els altres mecanismes impliquen errors en etapes crucials de la divisió cel·lular, resultant en cèl·lules poliploides degut que en cap cas té lloc la citocinesi. Pot produir-se la divisió del nucli sense trencament de l'embolcall nuclear (endomitosi) o alteracions a l'anafase o a la citocinesi (Miller i Therman, 2001; revisat per Storchova i Pellman, 2004). Recentment, la descripció en cèl·lules de mamífers no transformades d'un checkpoint (punt de control), anomenat checkpoint de tetraploïdia, que bloqueja i elimina les cèl·lules poliploides (Margolis i col, 2003), posa de manifest perquè la poliploïdia és una anomalia tant freqüent en l'espècie humana (en avortaments espontanis), com la trisomia 16 o la monosomia X (veure Taula 1).



**Figura 2.** Principals mecanismes que donen lloc a poliploïdia en cèl·lules somàtiques (adaptat de Storchova i Pellman, 2004)

### *Origen meiótic de les anomalies estructurals*

L'origen de les anomalies estructurals són trencaments al DNA, seguits d'errors de reparació del DNA que donen lloc a reorganitzacions estructurals i a la possible formació de fragments acèntrics. Un altre mecanisme que genera anomalies estructurals és l'aparellament desigual de cromosomes homòlegs durant la profase I meiótica que únicament produeix petites duplicacions i delecions de DNA. També existeix la possibilitat que l'aparellament no homòleg o la manca de reparació després d'un aparellament homòleg normal produeixin anomalies estructurals, però no hi ha cap evidència per a aquests mecanismes (Shaffer i Lupski, 2000).

Els trencaments cromosòmics poden ser provocats per factors exògens, tals com radiacions, clastògens, diferents drogues, etc. Determinades característiques inherents al genoma també predisposen a les anomalies estructurals (elements transposables, llocs fràgils, "punts calents" de trencament preferent *-hot spots-*, i duplicacions gèniques, entre d'altres) (revisat per Miller i Therman, 2001). Hi ha evidències que algunes seqüències de DNA i algunes configuracions estructurals afavoririen errors d'aparellament, com regions riques en A-T i seqüències de repeticions de baix nombre de còpies específiques de regió (LCR), o repeticions en tàndem de nombre variable (VNTR) (revisat per Shaffer i Lupski, 2000). Això podria ser la causa que alguns cromosomes estiguessin més representats en determinades reorganitzacions estructurals en espermatozoides, com per exemple, el cromosoma 3 en aberracions de tipus cromàtide, i el cromosoma 9 en trencaments no reorganitzats (Brandriff i col, 1988).

#### **1.1.2. Origen parental de les anomalies cromosòmiques**

Mitjançant estudis moleculars en nounats i avortaments espontanis s'ha pogut determinar l'origen parental de les anomalies cromosòmiques, el qual sembla ser depenent del tipus específic d'anomalia. Les aneuploidies de cromosomes autosòmics són predominantment d'origen matern, mentre que les aneuploidies de cromosomes sexuals i les anomalies estructurals *de novo* són majoritàriament d'origen patern (Olson i Magenis, 1988). Encara

que aquests estudis sobre l'origen parental proporcionen informació sobre la contribució paterna a les anomalies cromosòmiques, són limitats, donat que moltes anomalies cromosòmiques es perden de forma primerenca, abans de poder ser detectades clínicament.

### *Origen parental de les anomalies numèriques*

En els últims anys, l'origen parental de les anomalies cromosòmiques numèriques s'ha estudiat utilitzant polimorfismes de DNA amb tècniques de Southern blot i de reacció en cadena de la polimerasa (PCR). La Taula 2 mostra l'origen parental de les poliploïdies i les aneuploïdies més freqüents en l'espècie humana.

**Taula 2.** Origen parental de les anomalies cromosòmiques numèriques en l'espècie humana<sup>a</sup>

	Origen meiótic	
	Matern (%)	Patern (%)
<b>Trisomia</b>		
13	88	12
15	88	12
16	100	0
18	97	3
21	95	5
47,XXY	52	48
47,XXX	93	7
47,XYY	0	100 <sup>b</sup>
45,X	20	80
<b>Triploïdia</b>	44	66 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Dades adaptades de Lorda-Sanchez i col, 1992; Antonarakis i col, 1993; Fisher i col, 1995; Hassold i col, 1995; Jacobs i Hassold, 1995; Robinson i col, 1996; Nicolaidis i Petersen, 1998; Zaragoza i col, 2000.

<sup>b</sup> No va ésser possible diferenciar entre origen meiótic i mitòtic en el 40% dels casos

<sup>c</sup> No va ésser possible determinar l'origen en el 28.5% dels casos



En les aneuploidies dels cromosomes sexuals predomina l'origen patern: el 100% dels barons 47, XYY, el 80% de dones 45, X (Jacobs i Hassold, 1995), el 50% dels homes 47, XXY (Lorda-Sanchez i col, 1992; MacDonald i col, 1994) i el 7-10% de dones 47, XXX (Hassold i col, 1993; MacDonald i col, 1994). En canvi, les trisomies autosòmiques mostren un origen matern preferent, amb percentatges que van del 85% al 100% dels casos, depenent del cromosoma implicat, amb la majoria d'elles (70-100%) originades a meiosi I (Zaragoza i col, 1994; Sherman i col, 1994; Hassold i col, 1995; Fisher i col, 1995).

L'únic factor de risc indiscutiblement lligat a l'etiologia de les trisomies és l'edat materna (Penrose, 1933; revisat per Hassold i Hunt, 2001). El mecanisme pel qual l'edat materna afecta a la freqüència de trisomies és poc conegut. El model més acceptat (Lamb i col, 1997, revisat per Hassold i Hunt, 2001) proposa dos events necessaris per a una no disjunció depenent de l'edat: l'establiment a l'ovari fetal d'un bivalent susceptible de patir no disjunció (event independent de l'edat) i una segregació anormal d'aquest bivalent a metafase I (procés depenent de l'edat). Aquestes alteracions de segregació a metafase I podrien ser causades per errors en la regulació dels últims estadis de maduració de l'oòcit (Hunt i col, 2003; Sun i col, 2004).

Per a determinar l'origen parental de les triploïdies, s'han emprat marcadors genètics pericentromèrics i distals de diversos cromosomes, per veure si es mantenia o no l'heterozigositat parental en els embrions triploides procedents d'avortaments espontanis (Zaragoza i col, 2000). L'origen parental de la triploïdia és majoritàriament masculí (66% dels casos), tot i que en molts triploides derivats paterns (29.9%) el mecanisme d'origen no va poder ser determinat (Zaragoza i col, 2000; Macas i col, 2001). En les triploïdies paternes, l'origen més freqüent és la dispèrmia (86%), seguida de la fecundació per part d'espermatozoides diploides originats majoritàriament a meiosi I (9.3%). L'origen més freqüent de les triploïdies maternes són oòcits diploides formats a meiosi II (66%) i a meiosi I (22%). Sembla ser que els casos d'origen patern són els que predominen en avortaments espontanis i la majoria d'ells es desenvoluparien com a moles hidatiformes parcials, mentre que els derivats materns bé es perden de forma molt primerenca a l'embriogènesi, bé

sobreviuen fins estadis més avançats donant lloc a fetus relativament ben desenvolupats (Zaragoza i col, 2000).

### *Origen parental de les anomalies estructurals*

Estudis citogenètics en amniocentesi han posat de manifest que les anomalies estructurals són heretades de progenitors portadors en el 80% dels casos, mentre que el 20% restant es produeixen *de novo* (revisat per Jacobs, 1992). Mitjançant l'estudi d'heteromorfismes cromosòmics, s'ha establert que un 84% dels casos *de novo* són d'origen patern (Olson i Magenis, 1988). Aquesta elevada contribució paterna a l'origen de les anomalies estructurals *de novo* pot ser deguda fonamentalment a l'elevat nombre de divisions cel·lulars de les espermatogònies al llarg de la vida reproductiva (23 divisions per any en individus adults) (Plas i col, 2000), i a l'absència de mecanismes de reparació en estadis tardans de l'espermatogènesi. L'alt nivell de compactació de la cromatina des de l'estadi d'espermàtide fins al d'espermatozoide madur, dificulta o anul·la l'accessibilitat del DNA als enzims de reparació, augmentant el risc d'acumul d'errors de reparació i transcripció del DNA fins després de la fecundació, a l'etapa de zigot (revisat per Rosenbusch, 1995). Aquestes característiques pròpies de l'espermatogènesi fan que l'espermatozoide sigui un tipus cel·lular especialment sensible a les lesions cromosòmiques.

S'ha establert una associació entre la fragilitat cromosòmica existent en els progenitors i l'increment del risc per a produir reorganitzacions estructurals *de novo* a la descendència (Martin, 1986; Warburton, 1991; Behjati i col, 1997). En espermatozoides, s'ha observat també una correlació positiva entre llocs fràgils i punts de trencaments cromosòmics, i entre aquests punts i els detectats en anomalies estructurals *de novo* en diagnòstic prenatal (Benet i col, 1989; Estop i col, 1995; Colls i col, 1998).

L'efecte de l'edat paterna sobre les anomalies cromosòmiques ha estat menys estudiat que el de l'edat materna, encara que s'ha descrit un increment d'anomalies estructurals en espermatozoides d'individus d'edat avançada (Martin i Rademaker, 1987; revisat per Guttenbach i col, 1997) (veure apartat 1.3).

## 1.2. Anàlisi citogenètica de l'espermatozoide en individus control

La cromatina dels espermatozoides presenta un elevat grau de condensació, producte de la substitució de les histones per protamines en l'espermàtide, i la formació d'enllaços disulfur (SS) entre elles durant el trànsit epididimari dels espermatozoides. Degut a això, l'estudi citogenètic de l'espermatozoide únicament ha estat possible, fins ara, mitjançant dos tipus de metodologies: l'anàlisi del cariotip haploide (Rudak i col, 1978) i més recentment, la hibridació *in situ* fluorescent (FISH) multicolor en nuclis interfàsics descondensats (Williams i col, 1993).

### *Estudi del cariotip haploide de l'espermatozoide humà*

La tècnica de fusió interespecífica d'oòcits d'hàmmster sense zona pel·lúcida i espermatozoides humans capacitats *in vitro*, va fer possible l'estudi del complement haploide de l'espermatozoide (Rudak i col, 1978; Martin i col, 1982), donat que els cromosomes de l'espermatozoide només són visibles després del procés de fecundació. L'avantatge principal d'aquesta tècnica és que permet la detecció d'anomalies numèriques i estructurals de qualsevol cromosoma del cariotip de l'espermatozoide al mateix temps. No obstant, requereix una metodologia complexa amb un baix rendiment i cost elevat, per la qual cosa el nombre d'espermatozoides estudiats per individu és de l'ordre de centenars, en el millor dels casos. Degut a aquestes limitacions, l'estudi del cariotip haploide de l'espermatozoide només s'ha dut a terme en uns pocs laboratoris. En la Taula 3 es mostren els resultats obtingut en espermatozoides emprant el sistema hàmmster-humà en les tres sèries més grans descrites en individus control (Brandiff i col, 1990; Martin i col, 1990; Estop i col, 1995; Templado i col, 1996). La freqüència d'anomalies estructurals varia entre un 6.9% i un 9.3% i la de numèriques entre un 2.3% i un 11.5%. Les variacions en els percentatges d'alteracions estructurals poden ser degudes a l'heterogeneïtat existent entre els individus de cada sèrie, i als diferents criteris dels autors a l'hora d'incloure o no, les lesions cromosòmiques com anomalies estructurals.

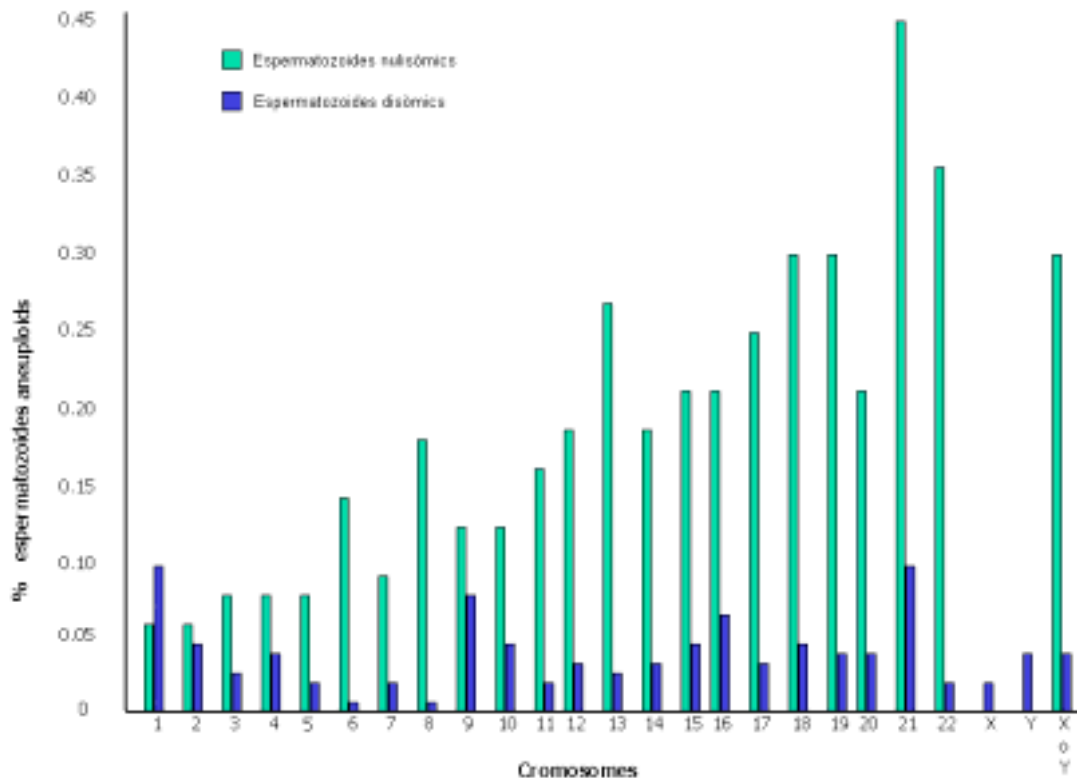
**Taula 3.** Freqüència d'anomalies cromosòmiques en el cariotip de l'espermatozoide humà

Estudi	Nº Individus	Edat	Nº Espermatòzoides	% Anomalies estructurals	% Anomalies numèriques
Brandiff i col, 1990	24	?	5.997	6.9	2.3
Martin i col, 1990	98	?	6.821	-	3.9
Estop i col, 1995 <sup>a</sup>	18	18-40	2.389	9.3	11.5
Templado i col, 1996 <sup>a</sup>	24	18-44	3.446		

<sup>a</sup> Estudis en col·laboració d'anomalies estructurals (Estop i col, 1995) i numèriques (Templado i col, 1996) amb 18 individus en comú en ambdues sèries.

La Figura 3 mostra les freqüències de disomia i nul·lisomia per a cada cromosoma en aquestes mateixes sèries (Brandiff i col, 1990; Martin i col, 1990; Templado i col, 1996). Les freqüències de disomia més altes corresponen als cromosomes 1, 9, 16 i 21. Les freqüències de nul·lisomia són força superiors a les de disomia en totes les sèries, molt probablement degut a la pèrdua artefactual de cromosomes durant l'obtenció de les extensions cromosòmiques.

Fins ara, s'ha analitzat un total aproximat de 20.000 espermatòzoides en individus control, establint-se una freqüència mitjana de 3.8% per l'aneuploïdia (entre 1.2% i 11.4%), i de 6-7% per a les anomalies estructurals (entre 0.8% i 13%) (revisat per Templado i col, 1996 i Guttenbach i col, 1997).



**Figura 3.** Freqüència de disomia (en blau) i nul·lisomia (en verd) per a cada cromosoma en individus control analitzada en el cariotip haploide de l'espermatozoide (Brandiff i col, 1990; Martin i col, 1990; Templado i col, 1996)

#### *Hibridació in situ fluorescent en espermatozoides d'individus control*

La tècnica de FISH multicolor (Williams i col, 1993), utilitzant dues o més sondes de DNA simultàniament, permet l'anàlisi ràpida i fiable d'anomalies numèriques en un gran nombre d'espermatozoides. Mitjançant aquesta tècnica s'han estudiat més de cinc milions d'espermatozoides procedents d'individus control (revisat per Shi i Martin, 2000) (veure Taula 4). La freqüència mitjana de disomia per cromosoma es situa al voltant del 0.15%, excepte pels cromosomes 21, 22, X i Y, demostrant que no tots els cromosomes presenten la mateixa tendència a la no disjunció. En quant a la freqüència de diploidia, hi ha pocs

estudis que discuteixin les dades obtingudes, no obstant, Guttenbach i col·laboradors (1997) en un estudi de revisió, xifra la freqüència mitjana entre un 0.03% i un 0.34%.

**Taula 4.** Freqüència mitjana (%) de disomia en sèries d'individus control analitzats per la tècnica de FISH en nuclis d'espermatozoide<sup>1</sup>.

Cromosomes																
1	2	4	6	7	8	9	12	13	15	16	18	20	21	22	XY	
0.09	0.09	0.09	0.05	0.06	0.05	0.14	0.16	0.11	0.13	0.11	0.05	0.11	0.19	0.50	0.27	

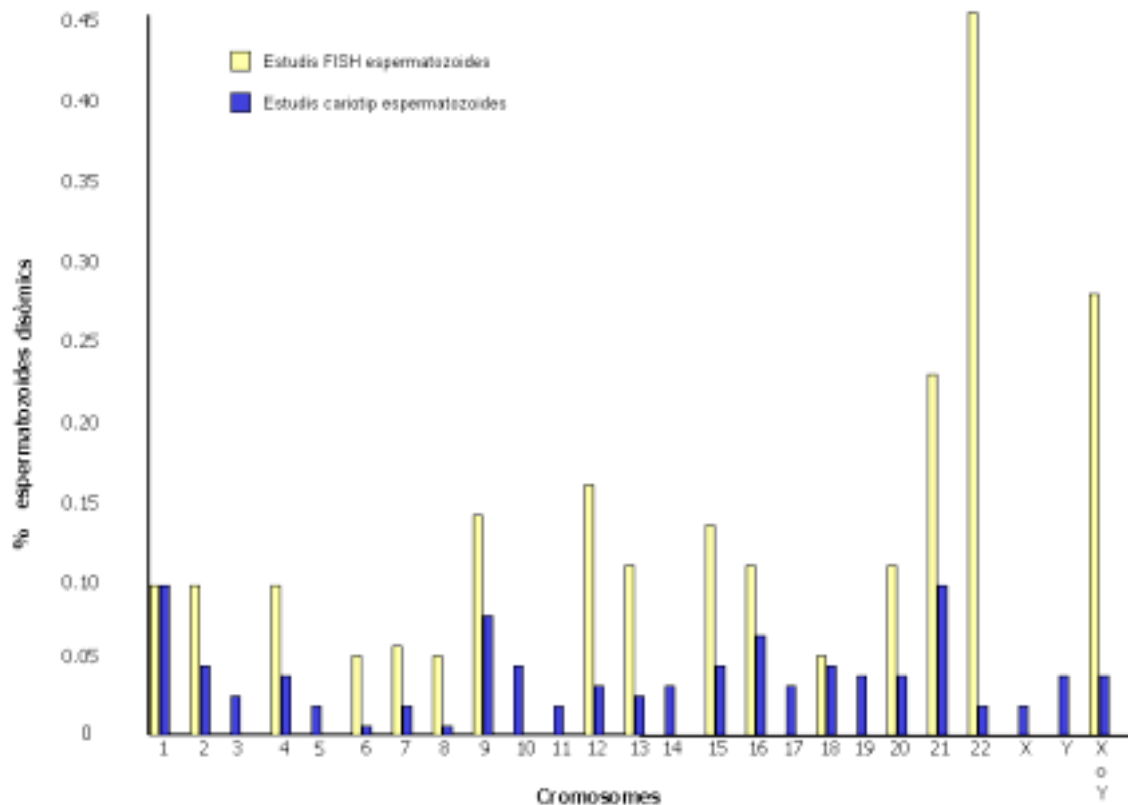
<sup>1</sup> Dades recopilades de Shi i Martin, 2000<sup>a,b</sup>; Soares i col, 2001; Rives i col, 2002

(Només s'inclouen aquells estudis amb un mínim de 10.000 espermatozoides per individu i nombre de sondes suficients per discriminar entre disomia i diploïdia).

La Figura 4 mostra gràficament les freqüències de disomia en espermatozoides d'individus control, analitzades en el cariotip de l'espermatozoide (Brandriff i col, 1988; Martin i col, 1990; Templado i col, 1996) i en nuclis interfàsics mitjançant FISH. La freqüència individual de disomia per a tots els cromosomes, excepte pel cromosoma 1, és superior en els estudis de FISH (revisat per Shi i Martin, 2000; Soares i col, 2001; Rives i col, 2002). Aquestes diferències podrien ser degudes al major nombre de cèl·lules analitzades per individu en estudis de FISH o a una sobrestima en aquest estudis degut als criteris de recompte dels diferents laboratoris.

La tècnica de FISH multicolor també ha permès determinar la incidència d'anomalies estructurals en nuclis d'espermatozoides, mitjançant l'utilització de sondes centromèriques i subtelomèriques de forma simultània per a un mateix cromosoma. Aquesta metodologia permet detectar delecions i duplicacions de fragments centromèrics o subtelomèrics, cromosomes dicèntrics i translocacions, depenent de les sondes utilitzades. La majoria d'estudis d'anomalies estructurals en nuclis interfàsics d'espermatozoides s'han dut a terme

en individus portadors de translocacions per a conèixer la segregació dels cromosomes implicats en la translocació i el risc a la seva descendència (revisat per Oliver, 2003).



**Figura 4.** Comparació de freqüències de disomia per a cada cromosoma observades en espermatozoides d'individus control analitzades en el cariotip haploide de l'espermatozoide (en blau) (Brandiff i col, 1990; Martin i col, 1990; Templado i col, 1996) i en nuclis interfàsics mitjançant FISH (en groc) (Dades recopilades de Shi i Martin, 2000; Soares i col, 2001; Rives i col, 2002)

Fins al moment, en espermatozoides d'individus control, únicament s'han estudiat les anomalies estructurals pel braç curt del cromosoma 1 (Van Hummelen i col, 1996; Baumgatner i col, 1999; Slotter i col, 2000) (Taula 5 i Figura 4). La freqüència total estimada

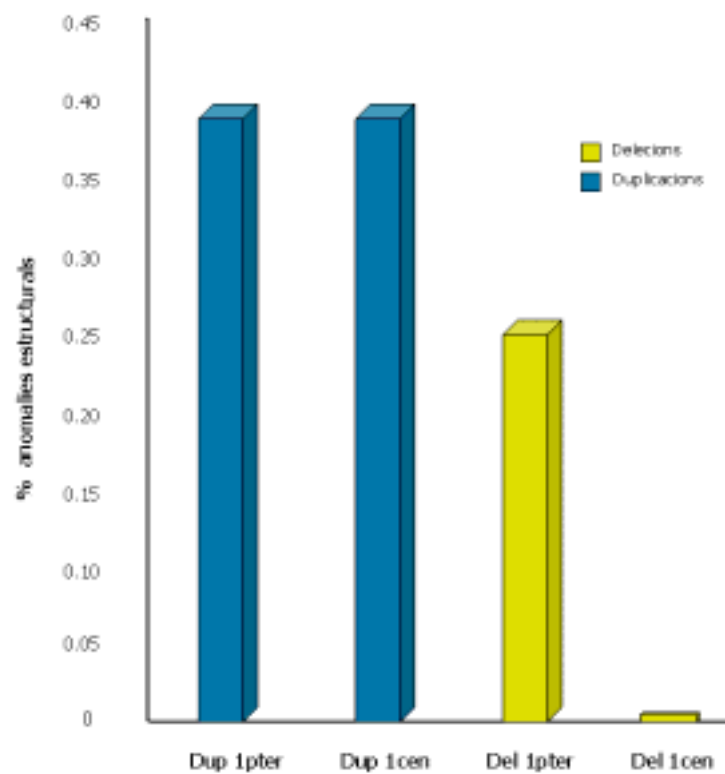
d'anomalies estructurals per aquest cromosoma es situa al voltant del 1.4% (Sloter i col, 2000), molt similar a la observada en estudis de complements cromosòmics d'espermatzoide (Brandriff i col, 1988).

**Taula 5.** Incidència d'anomalies estructurals pel cromosoma 1 en espermatzoides d'individus control analitzades en nuclis interfàsics mitjançant FISH multicolor

Estudi	Anomalies estructurals			
	% Duplicacions		% Delecions	
	1pter	1cen	1pter	1cen
Van Hummelen i col, 1996	0.032	?	0.015	?
Baumgartner i col, 1999	0.038	0.065	0.018	0.010
Sloter i col, 2000	0.045	<0.010	0.041	<0.010
Mitjana	0.038	0.037	0.025	<0.010

Les freqüències de duplicacions i delecions observades al cromosoma 1 són similars en els tres estudis, excepte per les duplicacions centromèriques degut, segons els autors, a que la sonda centromèrica utilitzada per analitzar aquest cromosoma tendeix a quedar fragmentada. Les duplicacions, tant de centròmer com de telòmer, presenten aproximadament el doble de freqüència que les delecions telomèriques, essent la de delecions centromèriques gairebé inexistent (veure Figura 4).





**Figura 5.** Freqüències d'anomalies estructurals pel cromosoma 1 en espermatozoides d'individus control analitzades en en nuclis interfàsics mitjançant FISH (Dades de Van Hummelen i col, 1996; Baumgartner i col, 1999; Slotter i col, 2000)

### 1.3. Estudis en espermatozoides d'individus d'edat avançada

Els estudis realitzats fins ara, per a determinar un possible efecte de l'edat sobre la freqüència d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides d'individus normals, donen resultats controvertits. En estudis del cariotip haploide de l'espermatozoide, o bé no es va observar correlació entre l'edat i un increment en la freqüència d'aneuploidia (Templado i col, 1996), o bé aquesta correlació va ser negativa (Martin i Rademaker, 1987). Pel que fa a les anomalies estructurals, alguns autors descriuen un increment significatiu d'aquestes

anomalies amb l'edat en complements d'espermatozoides d'individus normals (Martin i Rademaker, 1987; Prestes-Sartorelli i col, 2001), mentre que en altres estudis (Rosenbusch i col, 1992; Estop i col, 1995; Brandriff, 1985) no assoleixen significació estadística. La dispersió d'edat dels donants estudiats i el baix nombre de cariotips analitzats per individu podrien emascarar els resultats, donat que només el treball de Prestes-Sartorelli i col·laboradors (2001) va ésser dissenyat específicament per a estudiar l'efecte de l'edat.

Mitjançant la tècnica de FISH multicolor en nuclis d'espermatozoides, s'han analitzat les anomalies numèriques per a 11 dels 24 cromosomes per determinar si la seva freqüència d'aneuploïdia s'incrementava amb l'edat. No s'ha trobat cap correlació pels cromosomes 8 (Robbins i col, 1995), 9 (Luetjens i col, 2002), 12 (Martin i col, 1995), 13 (McInnes i col, 1998), 14 (Rousseaux i col, 1998), 17 (Guttenbach i col, 2000) i 18 (Luetjens i col, 2002; Griffin i col, 1995). S'han obtingut resultats controvertits pels cromosomes 1 (Martin i col, 1995; McInnes i col, 1998), 21 (McInnes i col, 1998; Rousseaux i col, 1998), així com pels cromosomes sexuals (Martin i col, 1995; Robbins i col, 1995; Luetjens i col, 2002; Griffin i col, 1995; Kinakin i col, 1997) i la diploïdia (Griffin i col, 1995; Martin i col, 1995; Kinakin i col, 1997; Guttenbach i col, 2000; Luetjens i col, 2002).

Respecte a l'efecte de l'edat en les anomalies estructurals, només ha estat analitzat el cromosoma 1 en una sèrie d'individus d'edats entre 23 i 58 anys mitjançant FISH, trobant un efecte positiu de l'edat en la freqüència de delecions centromèriques d'aquest cromosoma (McInnes i col, 1998).

Tenint en compte totes les sèries d'edat publicades fins al moment, s'han estudiat un total de 121 donants, amb edats entre els 18 i els 83 anys, amb només 14 individus majors de 60 anys. La informació obtinguda és encara insuficient, i en ocasions contradictòria, per poder determinar si la freqüència d'anomalies numèriques i estructurals en l'espermatozoide s'incrementen amb l'edat de l'individu. Seran necessaris més estudis per conèixer si el risc de transmissió d'anomalies cromosòmiques està incrementat en individus d'edat avançada. Aquesta informació és, en l'actualitat, de gran interès, donades les noves tecnologies de reproducció assistida, com la injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI), que augmenten la possibilitat de tenir descendència en edats avançades.

#### 1.4. Objectius

L'objectiu general del present treball ha estat estudiar el possible efecte de l'edat en la freqüència d'anomalies cromosòmiques presents en els espermatozoides d'individus normals, d'edats compreses entre 24 i 74 anys, amb els següents objectius concrets:

1. Analitzar la freqüència d'aneuploïdia pels cromosomes 6, 21, X i Y
2. Establir la freqüència d'anomalies numèriques i estructurals del cromosoma 9
3. Valorar la incidència d'aquestes anomalies en funció del cromosoma sexual present a l'espermatozoide



## **2. Material i Mètodes**



## 2.1. Material biològic

S'han estudiat espermatozoides procedents de mostres de semen obtingudes d'una sèrie de 18 individus d'edats compreses entre 24 i 74 anys. Per a facilitar la detecció d'un possible efecte linial de l'edat sobre la freqüència d'anomalies cromosòmiques, es va seleccionar l'edat dels donants amb la finalitat d'incloure tres individus per cada dècada (Taula 6).

**Taula 6.** Sèrie dels 18 individus estudiats en el present treball

Donant	Edat	Fumador	Fertilitat
CM1	24	Sí	-
CM3	24	No	-
CM4	25	Sí	-
CM7	30	No	Sí
CM5	37	No	-
CM2	38	No	Sí
CM6	42	Sí	Sí
C7	45	No	Sí
C8	49	No	Sí
CM8	52	No	Sí
CM9	54	No	Sí
CM10	56	Sí	Sí
CM11	60	No	Sí
CM12	62	No	Sí
CM13	64	No	Sí
CM14	71	No	Sí
CM15	72	No	Sí
CM16	74	No	Sí
Mitjana	48.8		

Cap dels individus estudiats tenia història coneguda d'exposició a mutàgens, clastògens o drogues. En tots els casos, les mostres s'obtingueren per masturbació, previa abstinència de 3 a 5 dies, dipositades en contenidors de plàstic estèrils, i mantingudes a temperatura ambient fins al moment del tractament de fixació.

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

## **2.2. Congelació de les mostres de semen**

La mostra de semen es barreja, en proporció 1:1, amb medi de criopreservació (Yavetz i col 1991), s'homogenitza, i es reparteix en criotubs estèrils que es col·loquen en un contenidor de congelació (Nalgene Cryo 1°C), on romanen a -80°C un temps mínim de 4 hores, després del qual, són transferits a un contenidor de nitrògen líquid (-196°C), on resten fins a la seva utilització.

## **2.3. Obtenció d'extensions d'espermatozoides**

Les extensions van obtenir-se directament de les mostres de semen fresques, un cop líquüades, o de mostres prèviament congelades.

Amb la finalitat d'eliminar el plasma seminal i/o el medi de congelació, les mostres es col·loquen en tubs de centrífuga i són rentades amb solució hipotònica (KCl 0.075 M), tants cops com sigui necessari fins a obtenir un botó completament net de restes. En cada rentat, la mostra es centrifuga durant 5 minuts a 600g, per tal d'eliminar el sobrenedant. Posteriorment, la mostra és fixada mitjançant 3 rentats succesius amb solució de Carnoy (3 metanol:1 àcid acètic), centrifugant a 600g durant 5 minuts. Finalment, es deixa en el tub



una quantitat mínima de fixador, s'homogenitza el botó cel·lular, i d'aquesta suspensió es diposita una gota sobre un portaobjectes desgreixat i es deixa assecar a l'aire. Aquestes extensions es conserven a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins a la seva utilització.

## 2.4. Hibridació *in situ* fluorescent multicolor

Es realitzaren dos estudis succesius mitjançant aquesta tècnica en la mateixa sèrie d'individus (veure secció Material biològic). En el primer estudi, s'analitzà la freqüència d'anomalies numèriques pels cromosomes 6, 21, X i Y i en el segon, les anomalies numèriques i estructurals pel cromosoma 9.

### *Descondensació de la cromatina dels espermatozoides*

Per aconseguir reduir l'elevada compactació del DNA de l'espermatozoide, s'utilitza el ditiotreitòl (DTT), agent químic que trenca els ponts disulfur de les protamines, permetent certa descondensació de la cromatina. El temps d'incubació de les mostres amb el DTT, depèn directament de l'edat de la mostra, de l'individu (diferents subtipus de protamines) i de l'accessibilitat que es vol aconseguir (per exemple, cal més descondensació com més petites siguin les sondes), tenint en compte no sobrepassar un temps crític a partir del qual la cromatina es descondensaria massa.

El protocol consisteix en submergir els portes en solució salina (2XSSC) durant 3 minuts, per tal d'eliminar les restes de fixador, i es deshidraten en banys succesius d'etanols (70%, 90% i 100%), de 2 minuts cadascun, finalment es deixen en solució de DTT (DTT 5mM, Tris 0.1M i Triton X-100 0.1%), prèviament escalfada a  $37^{\circ}\text{C}$ . Per eliminar les restes de DTT, els portes són submergits en solució salina (2XSSC) un parell de minuts, i rentats novament en sèrie d'etanols (70%, 90% i 100%). Els portes es deixen assecar a l'aire, i es visualitzen a contrast de fases, per controlar el grau de descondensació produït. Els temps de DTT utilitzats oscil·len entre 12 i 35 minuts.

*Sondes utilitzades*

Els tipus de sondes utilitzades (*Vysis, Inc*) per a la detecció d'anomalies numèriques i estructurals es poden consultar a la Taula 7. En el cas del cromosoma 6, utilitzat com a control intern d'hibridació, s'ha utilitzat una barreja de fluorocroms en proporció 1:1, per tal d'obtenir el color groc final.

**Taula 7.** Tipus de sondes i fluorocroms utilitzats en aquest treball

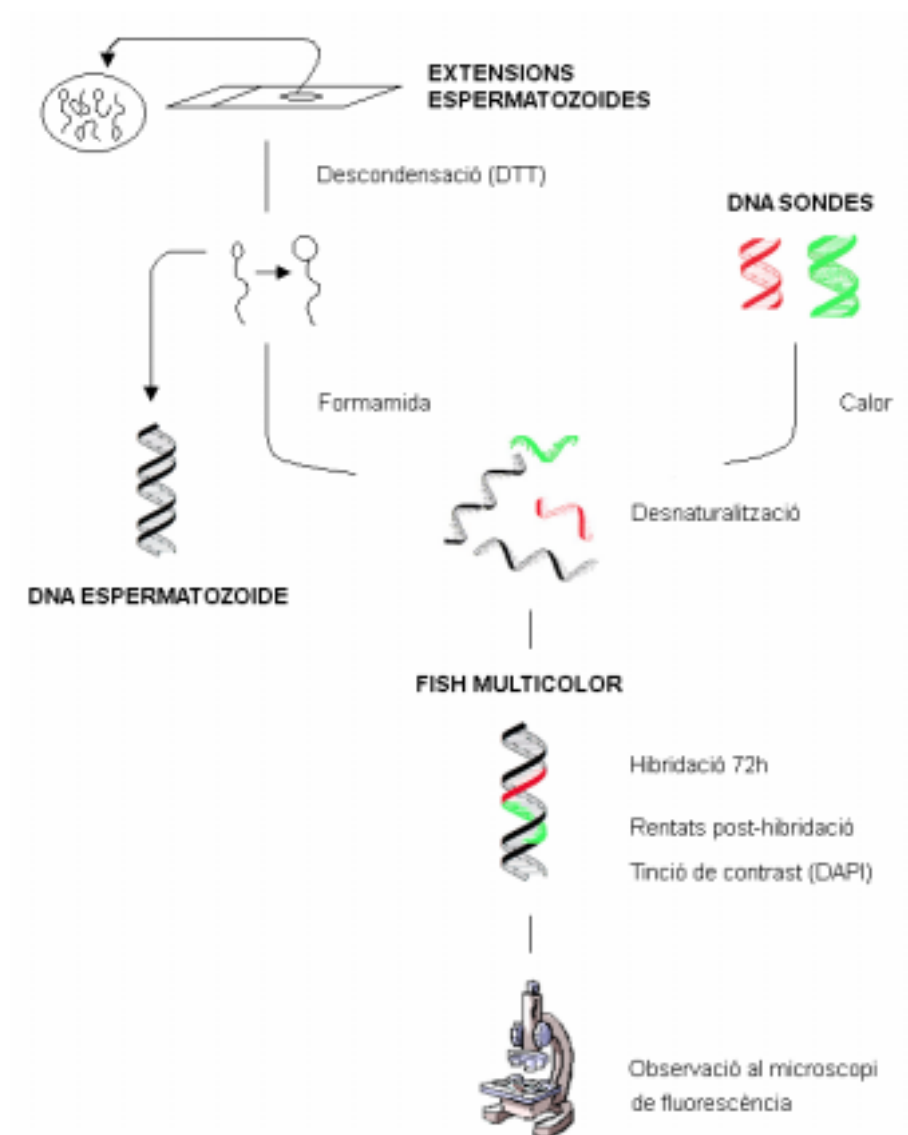
Cromosoma	Tipus sonda	Abreviatura	Fluorocrom	Color visualitzat
<b>6</b>	Centromerica	6cen	Spectrum green + red	Groc
<b>9</b>	Centromèrica	9cen	Spectrum green	Verd
<b>9</b>	Subtelomèrica 9q	9qtel	Spectrum orange	Vermell
<b>21</b>	Locus específica	LSI21	Spectrum orange	Vermell
<b>X</b>	Centromèrica	Xcen	Spectrum green	Verd
<b>Y</b>	Yqh	Yq	Aqua	Blau

*Protocol de la tècnica de FISH multicolor*

El protocol de la tècnica de FISH multicolor utilitzada per a la detecció d'anomalies numèriques i estructurals en nuclis interfàsics d'espermatozoide és bàsicament el recomanat per la casa comercial (*Vysis, Inc.*), amb algunes petites modificacions (Figura 6).

Una vegada descondensats els espermatozoides, els portes es col·loquen en una solució de formamida al 70% en 2XSSC, a 75°C durant 5 minuts, es renten en banys succesius d'etanol (70%, 85% i 100%), i es deixen assecar a l'aire. Mentre s'està desnaturalitzant el DNA, es prepara la solució d'hibridació, formada per volums entre 0.4µl i 0.6µl de cada

sonda, juntament amb un volum de tampó d'hibridació fins arribar als 10 $\mu$ l. Es realitza la desnaturalització de la barreja de sondes a 75°C, durant 5 minuts, i es diposita sobre les extensions prèviament desnaturalitzades, es cobreix amb un cubreobjectes i es deixa hibridar a 37°C, durant 72 hores en una cambra humida.



**Figura 6.** Protocol de la tècnica de FISH multicolor utilitzat en el present treball

### *Tractament post-hibridació*

Un cop passades les 72 hores, es retiren els cubreobjectes i les preparacions es renten primer en una solució salina bé de 0.4XSSC, bé de 0.7XSSC (depenent del grau de restricció del tractament), a 75°C, durant 2 minuts, i després en una solució detergent (Tween-20 0.1% / 2XSSC) a temperatura ambient, durant 1 minut. Un cop assecades les preparacions, es tenyeixen amb DAPI (Diaminophenilindol) diluït (37 ng/ml) amb Vectashield, i es conserven a 4°C fins a la seva observació al microscopi de fluorescència.

### *Obtenció de les dades*

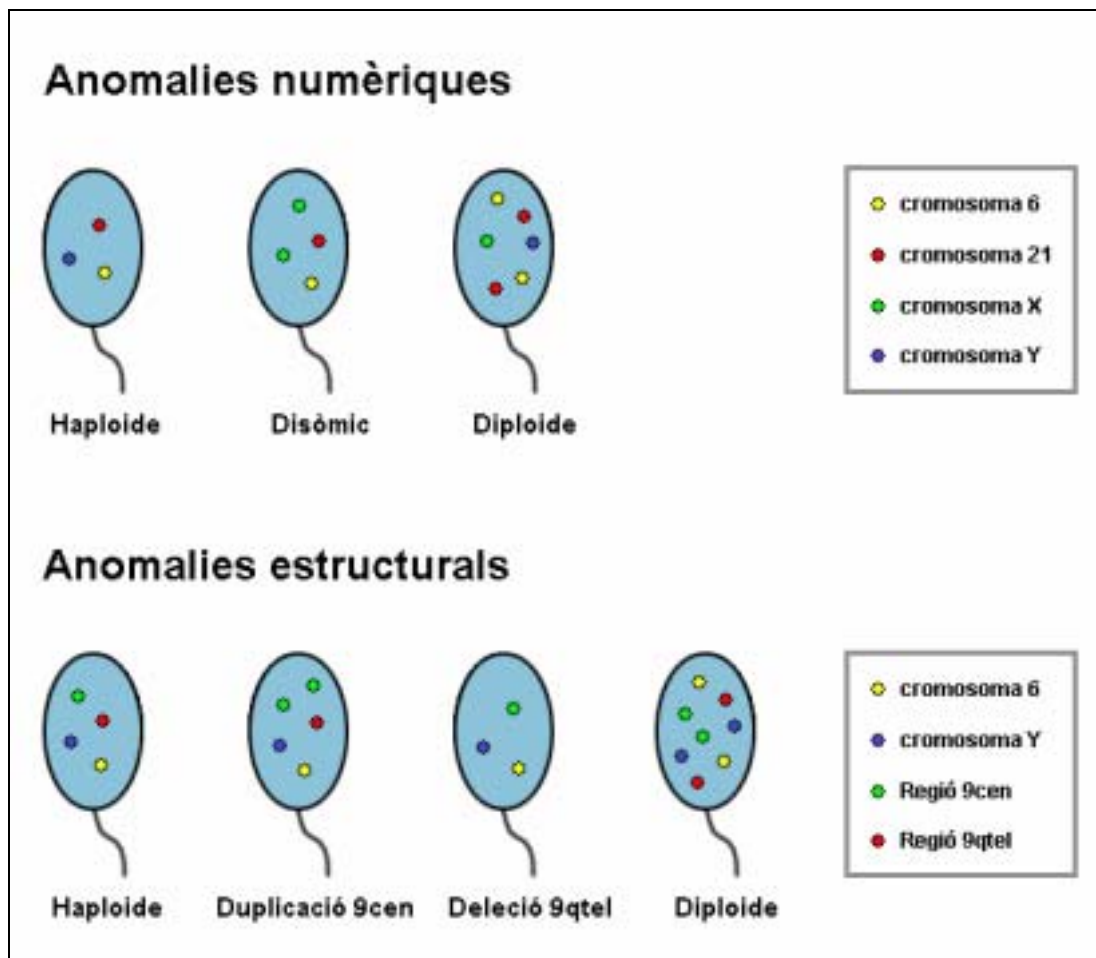
Les preparacions han estat analitzades en un microscopi de fluorescència Olympus AX70, equipat amb un filtre triple FITC / Texas Red / DAPI i dos filtres específics per FITC i Texas Red. Les imatges s'han captat amb un sistema de processament d'imatges automàtic (Cytovision Ultra, *Applied Imaging Inc. Ltd.*).

### *Criteris de recompte*

Pel recompte dels senyals d'hibridació s'han seguit estrictament els següents criteris:

- Només s'han analitzat preparacions amb un mínim d'un 99% d'eficiència d'hibridació.
- Només es van contabilitzar espermatozoides amb el limits ben definits i sense superposicions, identificats com a tals per la presència d'una cua.
- Es van considerar dues senyals per un mateix cromosoma, quan eren de la mateixa mida, tenien una brillantor similar, i estaven separades al menys per una distància equivalent al diàmetre d'una de les senyals. Aquest criteri va ser emprat tant per a les anomalies numèriques, com per a les estructurals.
- Les nul·lisomies i les delecions es van considerar quan no es detectava senyal per a les sondes corresponents.
- Tots els senyals dubtosos van ser analitzats al menys per un altre observador.

A la Figura 7 pot observar-se la diferència en el nombre de senyals visualitzades en espermatozoides normals i amb anomalies numèriques o estructurals.



**Figura 7.** Determinació d'anomalies numèriques i estructurals en espermatozoides, en funció del nombre de les senyals fluorescents observades

En l'estudi del cromosoma 9 es van codificar el 50% de les preparacions per tal que el recompte de senyals d'hibridació es dugués a terme sense conèixer l'identitat de les mostres.

### *Anàlisi estadística dels resultats*

En el primer article, es va dur a terme un model additiu generalitzat, per a cada anomalia cromosòmica, assumint que les dades seguien una distribució de Poisson, per tal d'estudiar la seva relació amb l'edat. L'heterogeneïtat existent en les dades va resultar en sobredispersió. Si aquesta era significativa, s'assumia una distribució binomial negativa per dur a terme el test. Es va analitzar la desviació per veure la tendència lineal i quadràtica amb l'edat com a variable quantitativa. El percentatge d'increment cada 10 anys per a cada anomalia cromosòmica i el seu interval de confiança (95%) van ser calculats des del coeficient del model lineal. L'estudi estadístic i els gràfics van obtenir-se a través del programa estadístic S-Plus.

Per a comparar el ratio sexual en espermatozoides disòmics pels cromosomes 6 i 21, s'emprà el test de Xi quadrat amb correcció de Yates.

En el segon article, les dades van tractar-se amb una regressió de Poisson amb l'edat com a única covariable, analitzant les tendències tant lineal, com quadràtica. En les situacions on el test de bondat de la desviació va detectar que l'assumpció de Poisson era inadequada, s'emprà una distribució binomial negativa per dur a terme el test. El percentatge d'increment cada 10 anys per a cada anomalia cromosòmica i el seu interval de confiança (95%) van ser calculats des del coeficient del model lineal. L'estudi estadístic va realitzar-se mitjançant el programa GENMOD del paquet estadístic SAS. Els gràfics van obtenir-se mitjançant el programa Excel (*Microsoft, Inc.*).

Per a determinar si el ratio sexual en espermatozoides portadors d'una anomalia estructural es desviava significativament de l'esperat 1:1, i per a comparar les freqüències d'anomalies estructurals de centròmer i telòmer del cromosoma 9, es va utilitzar el test de Xi quadrat amb correcció de Yates.

### **3. Resultats**





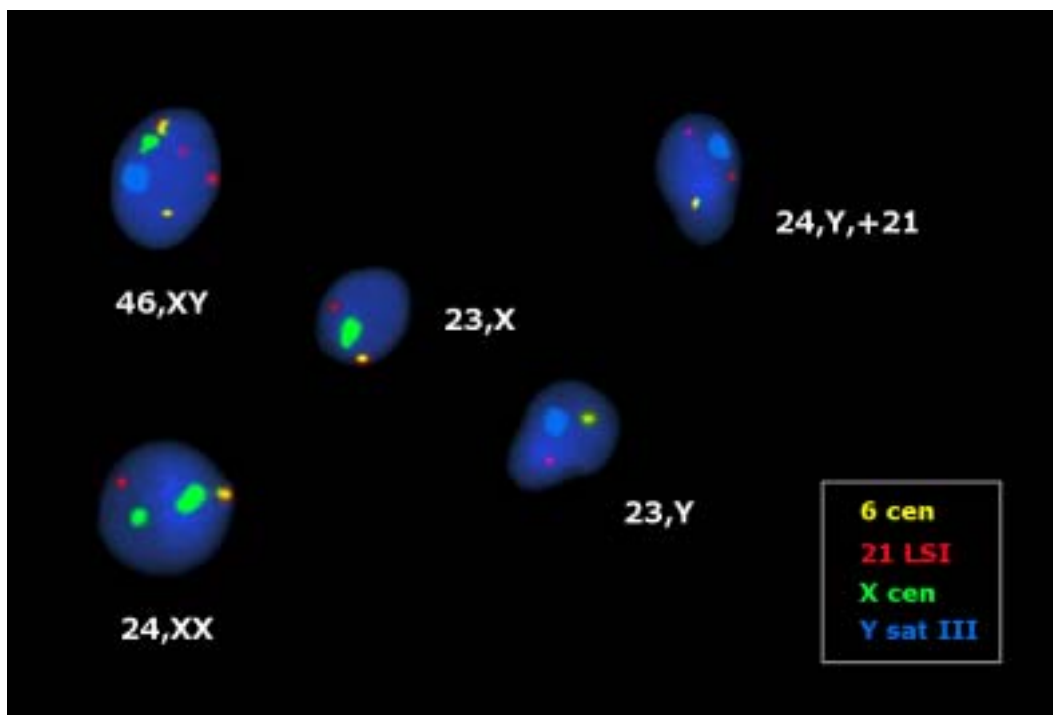
La tècnica de FISH s'ha dut a terme amb quatre colors per tal d'estudiar en els espermatozoides, de forma simultània, anomalies numèriques i estructurals i la seva possible desviació depenent del cromosoma sexual present a l'espermatozoide.

Es van estudiar un total de 384.141 espermatozoides, provinents de 18 individus d'edats compreses entre els 24 i els 74 anys d'edat, analitzant un mínim de 10.000 espermatozoides per a cadascuna de les dues tandes d'hibridació realitzades per individu.

En un primer estudi van analitzar-se les freqüències d'aneuploïdia pels cromosomes 6, 21, X i Y (veure publicació 1 a l'apartat 7). En un segon estudi es van analitzar les freqüències d'anomalies estructurals pel braç llarg del cromosoma 9, més les numèriques pels cromosomes 6, 9 i Y (veure publicació 2 a l'apartat 7).

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

La Taula 8 resumeix les freqüències individuals per a cadascuna de les anomalies numèriques estudiades, així com el ratio dels cromosomes sexuals. A la Taula 9, podem observar els resultats de les proves estadístiques utilitzades i l'increment previst per a cada tipus d'anomalia numèrica en un període de 10 anys. Els valors de significació, estan ja ajustats després de substraure el valor d'heterogeneïtat entre els individus. Els resultats, indiquen una tendència a l'increment de diploïdia ( $p < 0.0001$ ), disomia del cromosoma 9 ( $p < 0.0001$ ), i una significació marginal del total d'aneuploïdia dels cromosomes sexuals ( $p = 0.055$ ) (Figura 8). El percentatge d'increment calculat per a cada 10 anys va des d'un 5,9% en el cas de l'aneuploïdia pel cromosoma 6, fins a un 29% en l'aneuploïdia pel cromosoma 9. El tractament estadístic va mostrar una elevada heterogeneïtat interindividual significativa per a la disomia 9, 21, XY, disomia total dels cromosomes sexuals, i per a la diploïdia (veure Taula 9). L'individu CM11 va ser el que presentava freqüències més altes tant de disomia sexual, com de diploïdia (0.30% i 0.44% respectivament). El ratio sexual per a tots els individus, va ser aproximadament 1:1.



**Figura 8.** Anomalies numèriques en espermatozoides analitzades per FISH multicolor

**Taula 8.** Freqüències d'anomalies cromosòmiques numèriques analitzades mitjançant la tècnica de FISH multicolor.

Individu	Edat	Nº cèl·lules	% Disomia						% Diploïdia <sup>a</sup>	Relació <sup>a</sup> X:Y
			6 <sup>a</sup>	9	21	X	Y <sup>a</sup>	XY		
CM1	24	20895	0.03	0.03	0.04	0.01	0.06	0.07	0.30	1.03
CM3	24	21042	0.05	0.04	0.08	0.02	0.04	0.06	0.19	0.98
CM4	25	21743	0.04	0.01	0.03	0.05	0.04	0.08	0.18	1.01
CM7	30	21799	0.01	0.01	0.03	0.04	0.05	0.09	0.17	0.99
CM5	37	20875	0.03	0.03	0.05	0.04	0.04	0.06	0.18	1.03
CM2	38	21884	0.04	0.05	0.06	0.01	0.04	0.06	0.13	0.99
CM6	42	20621	0.02	0.01	0.04	0.04	0.04	0.16	0.25	1.02
C7	45	20947	0.02	0.04	0.15	0.04	0.05	0.11	0.28	0.98
C8	49	21698	0.03	0.03	0.18	0.03	0.05	0.06	0.20	0.99
CM8	52	21994	0.02	0.05	0.06	0.05	0.04	0.07	0.35	0.97
CM9	54	21584	0.08	0.16	0.07	0.04	0.04	0.09	0.28	0.97
CM10	56	21623	0.02	0.08	0.05	0.02	0.05	0.12	0.37	0.98
CM11	60	21640	0.03	0.13	0.10	0.04	0.05	0.30	0.44	1.01
CM12	62	21143	0.02	0.04	0.05	0.08	0.04	0.08	0.32	1.02
CM13	64	21736	0.06	0.08	0.13	0.04	0.04	0.03	0.47	0.99
CM14	71	20596	0.07	0.06	0.09	0.04	0.05	0.16	0.46	1.00
CM15	72	21105	0.04	0.06	0.05	0.04	0.04	0.12	0.33	1.03
CM16	74	21216	0.05	0.12	0.06	0.07	0.03	0.08	0.31	0.99
Mitjana	48.8	384.141	0.04	0.06	0.07	0.04	0.04	0.10	0.29	0.99

<sup>a</sup> Les freqüències corresponen a la mitjana dels dos estudis realitzats (articles 1 i 2)

**Taula 9.** Resultats de l'anàlisi estadística emprada per a determinar l'associació entre l'edat de l'individu i la freqüència d'anomalies cromosòmiques numèriques

Anomalia numèrica	Tendència lineal al model de regressió			Heterogeneïtat	
	% Increment per 10 anys	95% IC <sup>a</sup>		Valor P	Valor P
		Inferior	Superior		
<b>Disomia</b>					
XX	13.0	-2.0	30.3	0.09	0.64
YY	6.35	-1.9	29.3	0.095	0.99
XY	11.7	-2.8	28.4	0.12	0.0001 <sup>b</sup>
Total sexuals	8.6	-0.2	18.1	0.055 <sup>c</sup>	0.013 <sup>b</sup>
6	5.9	-10.3	25.0	0.50	0.51
9	29.0	15.0	44.6	<0.0001 <sup>d</sup>	0.004 <sup>b</sup>
21	11.4	-3.2	28.1	0.13	0.007 <sup>b</sup>
<b>Diploïdia</b>	18.8	12.5	25.2	<0.0001 <sup>d</sup>	0.046 <sup>b</sup>

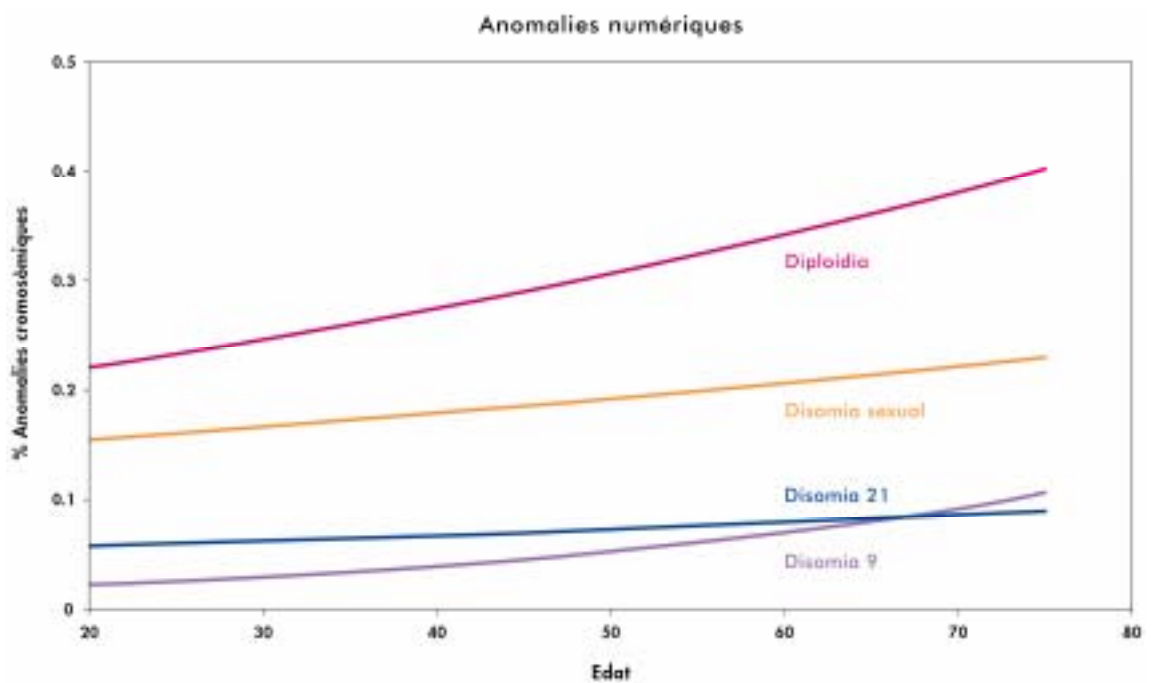
<sup>a</sup> Intèrval de confiança

<sup>b</sup> Es va assumir la distribució binomial negativa

<sup>c</sup> Significació marginal

<sup>d</sup> Tendència lineal significativa a despit de l'heterogeneïtat

La figura 9 il·lustra gràficament la tendència a l'increment lineal de les anomalies cromosòmiques numèriques analitzades amb l'edat de l'individu. Existeix una tendència a l'increment per a totes les anomalies estudiades, essent aquesta tendència més acusada en el cas de la disomia 9 i la diploïdia.



**Figura 9.** Increment lineal d'anomalies cromosòmiques numèriques amb l'edat

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

Les freqüències de les anomalies estructurals pel braç llarg del cromosoma 9 es mostren a la Taula 10, i les proves estadístiques a la Taula 11. Els valors de significació, estan ajustats després de tenir en compte els valors d'heterogeneïtat entre els individus. Els resultats van indicar una tendència a l'increment amb l'edat, de la freqüència de duplicacions parcials del cromosoma 9 (9cen,  $p < 0.0001$ , 9qtel,  $p = 0.002$ ), així com de les delecions parcials (9cen,  $p = 0.001$ , 9qtel,  $p < 0.0001$ ) (Taula 11). Les duplicacions de la regió 9qtel, van ser significativament superiors a les de la regió centromèrica ( $p = 0.017$ ) (Figura 10). Els espermatozoides portadors al mateix temps d'una anomalia estructural i del cromosoma X van ser significativament més abundants que els portadors del cromosoma Y amb el mateix tipus d'anomalia ( $p = 0.042$ ).

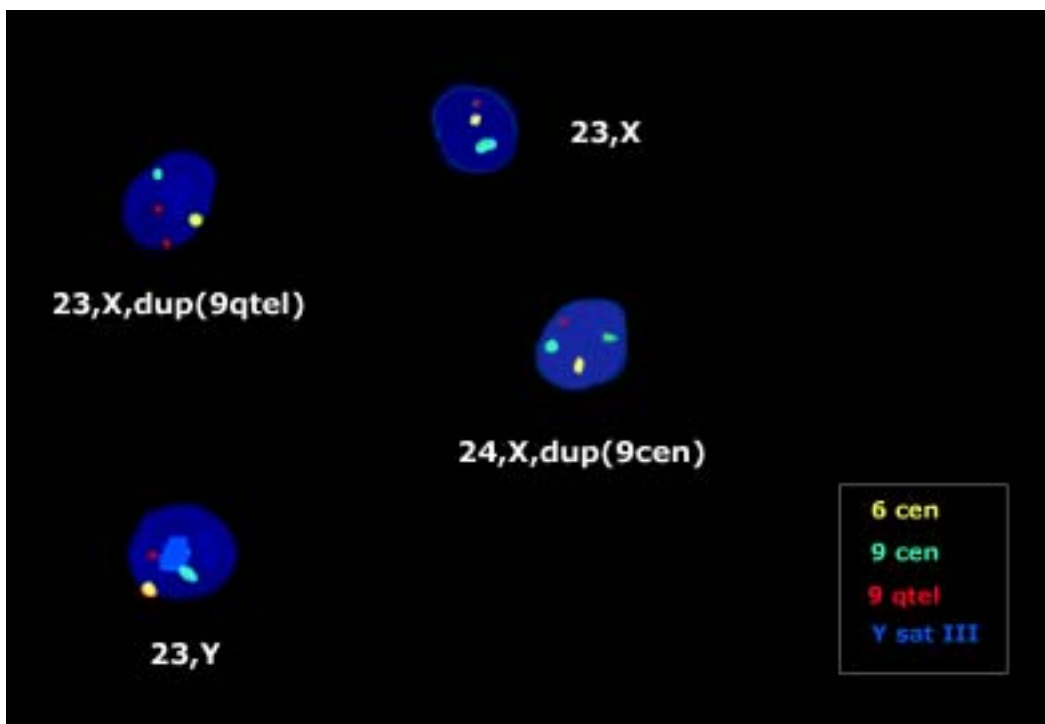
De la mateixa manera que en les anomalies numèriques, es van observar també diferències significatives entre individus per a totes les anomalies estructurals, excepte per a les duplicacions de telòmer del cromosoma 9 (veure Taula 11). Encara que aquesta heterogeneïtat disminueix el grau de significació, la tendència lineal d'aquestes alteracions mostra un alt nivell de significació.

L'individu CM9 va ser el que presentava el percentatge més elevat de duplicacions (0.35%), mentre que el CM13 mostrava la freqüència més alta de delecions (0,33%).

L'increment per a cada tipus d'anomalia en un període de 10 anys oscil·la entre el 16,5% per a les delecions centromèriques fins al 21% per a les delecions subtelomèriques.

La tendència a l'increment linial amb l'edat de les delecions i duplicacions estructurals del cromosoma 9 es mostra gràficament a la Figura 11. Les corbes indiquen una tendència similar per duplicacions i delecions totals (independentment de la regió implicada) (Figura 10a) i per delecions centromèriques i subtelomèriques (Figura 10c), mentre que aquesta

tendència era significativament diferent per duplicacions centromèriques i subtèlomèriques (Figura 10b).



**Figura 10.** Anomalies estructurals del cromosoma 9 en espermatozoides analitzades per FISH multicolor

**Taula 10.** Freqüències d'anomalies cromosòmiques estructurals del cromosoma 9 analitzades mitjançant la tècnica de FISH multicolor.

Individu	Edat	Nº cèl·lules	Anomalies estructurals					
			%			%		
			Duplicacions			Delecions		
			9cen <sup>a</sup>	9qtel <sup>b</sup>	total	9cen	9qtel	total
CM1	24	10510	0.07	0.07	0.13	0.08	0.08	0.15
CM3	24	10511	0.04	0.08	0.11	0.09	0.07	0.16
CM4	25	10475	0.03	0.13	0.16	0.09	0.05	0.13
CM7	30	10778	0.08	0.05	0.13	0.05	0.03	0.07
CM5	37	10143	0.04	0.09	0.13	0.06	0.07	0.13
CM2	38	10886	0.04	0.05	0.08	0.09	0.07	0.17
CM6	42	10328	0.05	0.11	0.15	0.08	0.02	0.10
C7	45	10378	0.00	0.07	0.07	0.03	0.03	0.06
C8	49	10556	0.10	0.11	0.22	0.08	0.07	0.15
CM8	52	10531	0.08	0.08	0.16	0.08	0.04	0.11
CM9	54	10289	0.16	0.18	0.35	0.15	0.14	0.30
CM10	56	10900	0.15	0.16	0.31	0.13	0.15	0.28
CM11	60	10963	0.16	0.15	0.31	0.06	0.15	0.22
CM12	62	10825	0.08	0.13	0.21	0.09	0.10	0.19
CM13	64	10824	0.09	0.17	0.26	0.21	0.12	0.33
CM14	71	10198	0.13	0.11	0.24	0.10	0.11	0.21
CM15	72	10289	0.12	0.15	0.27	0.13	0.18	0.31
CM16	74	10733	0.11	0.11	0.22	0.17	0.19	0.36
Mitjana	48.8	190,117	0.08	0.11	0.20	0.10	0.09	0.19

<sup>a</sup> 9cen: regió centròmerica del cromosoma 9

<sup>b</sup> 9qtel: regió subtèlomèrica del braç llarg del cromosoma 9



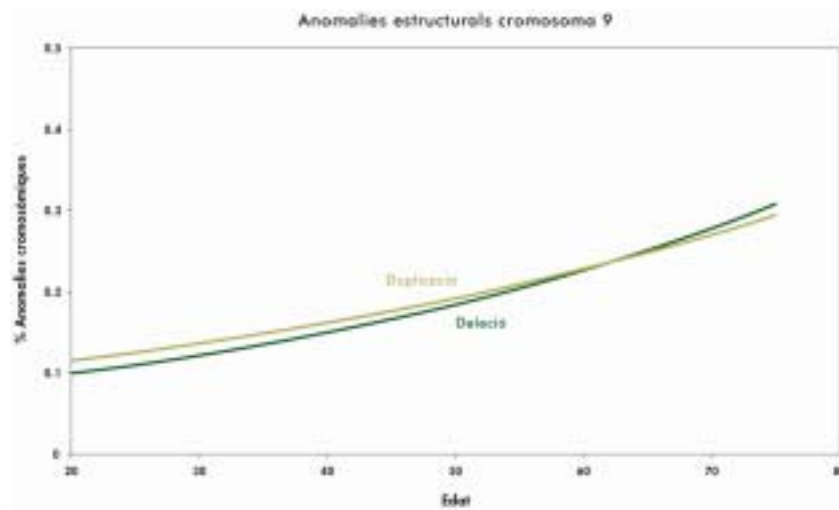
**Taula 11.** Resultats de l'anàlisi estadística emprada per a determinar l'associació entre l'edat de l'individu i la freqüència d'anomalies cromosòmiques estructurals del cromosoma 9

Anomalia estructural	Tendència lineal al model de regressió			Heterogeneïtat	
	% Increment per 10 anys	95% IC <sup>a</sup>		Valor P	Valor P
		Inferior	Superior		
<b>Duplicacions</b>					
9cen	21.2	10.3	33.1	<0.0001 <sup>c</sup>	0.003 <sup>b</sup>
9qtel	14.6	5.2	24.9	0.002	0.187
Mitjana	18.4	11.1	26.1	<0.0001 <sup>c</sup>	0.003 <sup>b</sup>
<b>Delecions</b>					
9cen	16.5	6.5	27.8	0.001	0.075
9qtel	28.0	16.5	40.5	<0.0001 <sup>c</sup>	0.037 <sup>b</sup>
Mitjana	21.9	14.2	30.0	<0.0001 <sup>c</sup>	0.001 <sup>b</sup>

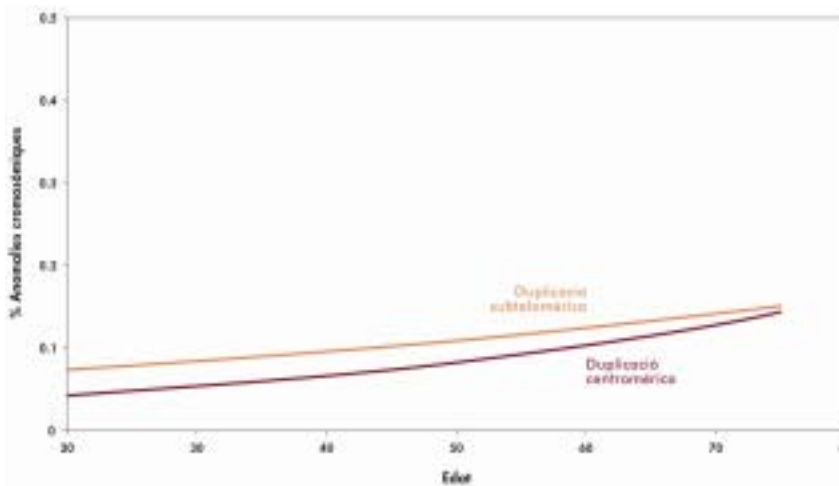
<sup>a</sup> Intèrval de confiança.

<sup>b</sup> Es va assumir distribució binomial negativa

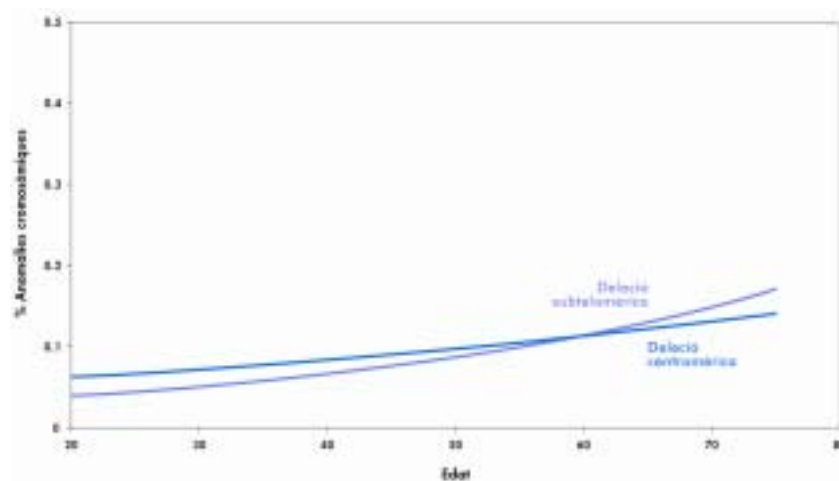
<sup>c</sup> Tendència lineal significativa a despit de l'heterogeneïtat



a



b



c

**Figura 11.** Increment lineal d'anomalies estructurals del cromosoma 9 amb l'edat. (a) Duplicacions i delecions totals. (b) Duplicacions de centròmer i de telòmer. (c) Delecions de centròmer i de telòmer

## **4. Discussió**



Aquest treball ha estat realitzat per a determinar un possible efecte de l'edat sobre les anomalies cromosòmiques en espermatozoides procedents de 18 individus seleccionats en base a la seva edat, amb 6 dels 18 donants per sobre dels 60 anys. També s'ha estudiat si les freqüències d'anomalies numèriques o estructurals mostren diferències significatives depenent del cromosoma sexual present a l'espermatozoide. Es va escollir l'anàlisi del cromosoma 21 per la seva elevada freqüència de disomia en espermatozoides d'individus control respecte d'altres autosomes (Martin i Rademaker, 1990; Spriggs i col, 1996; Rousseaux i col, 1998) i del cromosoma 9 per la seva susceptibilitat als trencaments cromosòmics en espermatozoides (Brandriff i col, 1988; Estop i col, 1991). La inversió pericèntrica inv(9)(p11q13), és un dels heteromorfismes cromosòmics humans més comuns en la població, assolint una freqüència aproximada del 1% (Gardner i Shuterland, 1996). Fins al moment, s'han publicat 10 estudis en espermatozoides en sèries d'individus d'edat, inclosos els dos estudis del present treball (articles 1 i 2, apartat 7) amb un total de 121 casos analitzats: 8 estudien anomalies cromosòmiques numèriques i únicament dos anomalies estructurals (veure Taula 12).

#### **4.1. Variabilitat interindividual en la freqüència d'anomalies cromosòmiques**

Totes les anomalies cromosòmiques numèriques i estructurals analitzades van mostrar heterogeneïtat interindividual no imputable a l'edat, excepte les disomies 6, X, i Y. Els individus que presentaven freqüències més elevades d'anomalies eren no fumadors, tenien descendència normal, i no estaven exposats a mutàgens coneguts. Aquesta variabilitat interindividual ja ha estat observada en estudis anteriors d'espermatozoides en individus control (revisat per Egozcue i col, 1997; Shi i Martín 2000; Vidal i col, 2001) i en sèries d'edat (Martin i col, 1995; Robbins i col, 1995; Kinakin i col, 1997; McInnes i col, 1998). L'heterogeneïtat existent entre el nostres donants ha estat eliminada mitjançant el model estadístic utilitzat (veure Material i Mètodes), per tal de que no afectés a l'efecte de l'edat en

**Taula 12.** Freqüència mitjana d'anomalies numèriques i estructurals en espermatozoides en sèries d'individus d'edat

Anomalies numèriques																
Estudi	Nº Ind.	Edat	% Disomia											% Diploïdia		
			1	6	8	9	12	13	14	17	18	21	XX		YY	XY
Griffin i col, 1995	24	18-60										.04	.02	.03	.10	.19
Martin i col, 1995	10	21-52	.11				.16						.07	.16	.18	.16
Robbins i col, 1995 <sup>a</sup>	14	23-49			.07								.03	.03	.10	.15
Kinakin i col, 1997 <sup>a,d</sup>	18	23-58											.05	.06	.03	.32
McInnes i col, 1998 <sup>a,d</sup>	18	23-58	.09					.13				.37				?
Rousseaux i col, 1998 <sup>a</sup>	11	21-64							.48			.72				.66
Guttenbach i col, 2000 <sup>b</sup>	3	81-83	.10							.07	.12		.11	.11	.18	.10
Luetjens i col, 2002 <sup>c</sup>	23	22-71				.75					.70		.52	.29		.03
<i>Present treball</i>	18	24-74	.03									.07				.29
<i>Present treball</i>	18	24-74	.04		.06											.28

Anomalies estructurals						
Estudi	Nº Ind.	Edat	% Del crom 1		% Del crom 9	
			% Del crom 1	% Dup crom 1	% Del crom 9	% Dup crom 9
McInnes i col, 1998 <sup>a</sup>	18	23-58	0.26	0.29		
<i>Present treball</i>	18	24-74			0.19	0.20

<sup>a</sup> Espermatozoides tractats amb solució 10mM o superior de DTT

<sup>b</sup> Espermatozoides testiculars. 1500 espermatozoides mínim per individu

<sup>c</sup> 8000 espermatozoides mínim per individu

<sup>d</sup> Estudis realitzats sobre els mateixos individus

les freqüències d'anomalies cromosòmiques.

La causa de l'elevada variabilitat entre individus per la freqüència de disomies pel mateix cromosoma pot ser deguda, a part de a diferències entre els propis individus, a les diferents metodologies de treball en els diferents laboratoris, les variacions en els criteris de recompte, i els tipus de sondes de DNA utilitzades.

En els dos estudis consecutius realitzats en la mateixa sèrie d'individus (veure articles 1 i 2, apartat 7), les freqüències d'anomalies numèriques pel cromosoma 6 i Y, i la diploidia, van ser molt similars per a tots els individus estudiats, denotant la validesa de la metodologia i dels criteris de recompte utilitzats en aquest treball.

En un estudi recent realitzat en espermatozoides de 15 individus control, Rubes i col·laboradors (2002) observen variacions interindividuais en les freqüències de disomia pel cromosoma 8 i pels cromosomes sexuals en estudis de FISH repetits set vegades per a cada individu. Els autors demostren que poden existir factors constitutius que eleven les freqüències d'aneuploidia, inherents a alguns individus normals amb una fertilitat comprovada. També suggereixen que l'anàlisi repetida de mostres procedents dels mateixos donants, proporciona major poder estadístic per a la detecció de diferències significatives entre els individus. Aquests resultats indiquen la conveniència que els estudis d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides es realitzin en sèries d'individus el més àmplies possible per atenuar la variabilitat entre donants.

## **4.2. Efecte de l'edat sobre les anomalies numèriques**

### *Disomia 9*

Es va detectar un increment significatiu en la freqüència de disomia 9 en relació amb l'edat ( $p < 0.0001$ ). Luetjens i col·laboradors (2002) en un estudi similar al nostre, van observar un increment del percentatge de disomia 9 en donants d'edat superior a 60 anys respecte del grup control (edat  $< 30$  anys), encara que aquesta diferència no va assolir significació

estadística ( $p=0.061$ ) (veure Taula 12). En individus control els resultats obtinguts per aquest cromosoma són contradictoris. En dos estudis realitzats en nuclis interfàsics d'espermatozoide amb la tècnica de PRINS (Pellestor i col, 1996) i painting cromosòmic (Rives i col, 1998), les freqüències de disomia pel cromosoma 9, van ser similars a les trobades pels altres autosomes. En canvi, Martin i Rademaker (1990) analitzant complements d'espermatozoide van observar que tant el cromosoma 9 com el 21 mostraven un nivell de disomia incrementat respecte de la resta.

La raó per la qual el cromosoma 9 presenta una elevada freqüència de disomia amb l'edat, no es coneix gaire. S'ha descrit un increment en la freqüència de disomia dels cromosomes 1, 9 i 16 respecte d'altres autosomes en espermatozoide (revisat per Guttenbach i col, 1997). Aquests tres cromosomes presenten grans blocs d'heterocromatina C en el braç llarg. S'ha descrit que les regions corresponents a bandes G fosques, poc riques en gens, presenten taxes molt baixes de recombinació durant la profase meiótica, suggerint que la recombinació s'inicia generalment en regions riques en gens (bandes G clares) (Sun i col, 2004). En tots els organismes estudiats, fins al moment, les alteracions en el procés de recombinació estan associades amb anomalies en la segregació cromosòmica. El principal motiu d'increment de no disjunció meiótica són mutacions que produeixen l'absència o reducció del nombre de quiasmes entre homòlegs (Roeder, 1997; revisat per Hassold i Hunt, 2001 i Petronczki i col, 2003). En *Saccharomyces* i *Drosophila*, la posició dels quiasmes, molt distals o molt pròxims al centròmer, també incrementen la freqüència de no disjunció meiótica (Ross i col, 1996; Koehler i Hassold, 1996).

A més, el reconeixement dels cromosomes homòlegs podria ser degut a un alt nivell d'organització cromosòmica més que a un reconeixement per homologia de seqüència (Gagne i col, 1973; Renaud i Gasser, 1997). Per tant, es podria dir que diferències en la longitud dels blocs d'heterocromatina C d'ambdós cromosomes 9, augmentaria el risc d'aparellament desigual a meiosi I i, conseqüentment, de no disjunció meiótica (Serra i col, 1990; Amiel i col, 2001).



### *Disomia 21*

Els nostres resultats indiquen que no existeix un increment de la freqüència de disomia 21 en relació amb l'edat de l'individu ( $p=0.13$ ) d'acord amb els obtinguts en altres sèries d'edat (McInnes i col, 1998; Rousseaux i col, 1998) i en sèries realitzades en complements haploides de l'espermatozoide (Martin i col, 1990; Templado i col, 1996), tot i que aquestes dues últimes no es van dissenyar en base a l'edat. Tantmateix, en casos de trisomies d'origen patern no es va trobar augmentada l'edat paterna (Yoon i col, 1996; Savage i col, 1998).

En canvi, en individus control i individus infèrtils la freqüència de disomia 21 observada en espermatozoides amb la tècnica de FISH és més elevada que per la resta d'autosomes (revisat per Egozcue i col, 2000), la qual cosa indica que en individus normals i infèrtils, aquest cromosoma és particularment susceptible a la no disjunció (Blanco i col, 1996; Griffin i col, 1996; revisat per Shi i Martín, 2000). Aquest resultat són concordants amb la baixa taxa de recombinació meiótica descrita per a aquest cromosoma, amb una mitjana d'un quiasma (generalment, en posició distal al centròmer) (Sun i col, 2004). A l'espècie humana, en trisomies 21 d'origen patern, la no disjunció és conseqüència de l'absència de quiasmes, mentre que en les d'origen matern, n'és de canvis de posició dels mateixos (revisat per Hassold i Hunt, 2001). El per què no s'observa un increment en la freqüència de disomia 21 en espermatozoides en relació a l'edat en cap de les sèries estudiades (Martin i col, 1990; Templado i col, 1996; McInnes i col, 1998; Rousseaux i col, 1998; Bosch i col, 2001) no es coneix, encara que no es pot descartar la pròpia heterogeneïtat en la població general i les diferents metodologies, ja comentades en l'apartat anterior.

### *Disomia dels cromosomes sexuals*

L'increment detectat en la freqüència del total de disomia sexual en relació a l'edat, va ser marginal ( $p=0.055$ ), i cap de les disomies sexuals per separat (XX, YY, XY) va assolir significació estadística. Recentment, dos estudis similars (Guttenbach i col, 2000; Luetjens i

col, 2002), confirmen els nostres resultats, no observant freqüències més elevades per les disomies sexuals amb l'edat de l'individu.

En canvi, en quatre estudis previs en nuclis d'espermatozoide, s'ha descrit un efecte de l'edat per l'aneuploidia dels cromosomes sexuals. No obstant, els resultats són contradictoris: entre els diferents treballs: alguns autors observeixen un increment amb l'edat per la disomia XX (Robbins i col, 1995; Griffin i col, 1995), disomia YY (Robbins i col, 1995; Martin i col, 1995; Griffin i col, 1995; Kinakin i col, 1997) i disomia XY (Griffin i col, 1995) (veure Taula 12), resultats que podrien concordar amb la formació d'un sol quiasma a la regió pseudoautosòmica entre els cromosomes X i Y durant la meiosi. L'absència d'aquest quiasma, podria resultar en univalència dels cromosomes sexuals i no disjunció a l'anafase I (revisat per Shi i col, 2001). En un estudi recent de mapes de recombinació (Sun i col, 2004), el bivalent sexual no mostrava recombinació en un 27% d'espermatoïts humans.

### *Diploïdia*

Els nostres resultats detecten una associació significativa entre la freqüència de diploïdia i l'edat ( $p < 0.002$ ). En els vuit estudis d'edat publicats fins a la data, no es troba cap correlació entre la freqüència de diploïdia i l'edat (Griffin i col, 1995; Martin i col, 1995; Kinakin i col, 1997; Guttenbach i col, 2000), no ha estat discutida (Robbins i col, 1995; Rousseaux i col, 1998; Luetjens i col, 2002), i fins i tot, no es donen dades (McInnes i col, 1998). En aquest treball, el fet d'emprar la tècnica de FISH amb 4 colors, ens permet discriminar acuradament la diploïdia (veure Figura 7, Material i Mètodes), ja que els espermatozoides diploides presenten 6 –8 senyals fluorescents (depenent del tipus d'estudi) en comptes dels 4 o 6 senyals, en la resta de estudis. Tanmateix, no es pot descartar que aquestes diferències en la incidència de diploïdia siguin degudes a la heterogeneïtat entre individus.

Les nostres dades estan d'acord amb l'elevat percentatge de triploides d'origen patern (entre els quals aproximadament un 10% s'originen d'espermatozoides diploides, Zaragoza i col, 2000). També s'han trobat altes freqüències de diploïdia en espermatozoides de portadors de reorganitzacions equilibrades (Van Hummelen i col, 1997), pares amb

descendència amb la síndrome de Down d'origen patern (Blanco i col 1998) i pacients infèrtils (Aran i col, 1999; Pang i col, 1999).

La causa de l'elevada freqüència de diploïdia en espermatozoides d'homes d'edat avançada no es coneix, però ha d'estar associada a un increment, amb l'edat, de la freqüència dels mecanismes que generen poliploïdia en les espermatogònies o en els espermatòcits (veure apartat 1.1.1). En cèl·lules somàtiques, la poliploïdia s'ha correlacionat amb una resposta adaptativa o patològica de la cèl·lula a l'estrés mecànic o metabòlic (revisat per Storchova i Pellman, 2004). En el cas dels espermatozoides, una possible explicació de l'increment de diploïdia amb l'edat, seria un augment en el nombre d'anomalies sinàptiques, relacionat amb un microambient testicular progressivament deteriorat. Això donaria lloc a un increment d'errors en la segregació cromosòmica, durant la meiosi I, que comportaria una aturada de la citocinesi, i la subseqüent formació d'espermatozoides diploides (Egozcue i col, 2000; Egozcue i col, 2002).

### **4.3. Increment lineal d'alteracions estructurals del cromosoma 9 amb l'edat**

En l'anàlisi de les anomalies estructurals del cromosoma 9 vam trobar freqüències incrementades amb l'edat en tots els tipus estudiats: duplicacions, i delecions, tant de centròmer com de la regió subtelomèrica del braç llarg.

En l'únic estudi similar fins al moment, dut a terme per a estudiar l'increment d'anomalies estructurals del cromosoma 1 amb l'edat paterna, McInnes i col·laboradors (1998), només van trobar un efecte significatiu de l'edat en la freqüència de delecions centromèriques d'aquest cromosoma. Altres estudis realitzats en el cariotip de l'espermatozoide (Martin i Rademaker, 1987; Prestes-Sartoreli i col, 2001), van observar una correlació positiva entre l'edat del donant i les anomalies estructurals, en comparar les dades obtingudes en el grup control i el d'edat avançada.

L'associació entre l'edat i l'increment d'anomalies estructurals, podria ser deguda a l'elevat nombre de divisions per any de les espermatogònies en aquest individus (Plas i col, 2000), o a una disminució o absència de reparació del DNA en espermatogènesi tardana deguda, molt probablement, a l'alt nivell de compactació que experimenta la cromatina en aquest estadi. S'ha descrit, en cèl·lules somàtiques de mamífer, una relació entre l'augment d'heterocromatització i una disminució en l'efectivitat dels mecanismes de reparació amb l'edat (Lezhava, 2003). Martin i Rademaker (1987) proposaven com a causa de l'increment d'anomalies estructurals en espermatozoides amb l'edat, un acúmulo de lesions al DNA degudes a una exposició més perllongada als agents ambientals.

El cromosoma 9 té una alta susceptibilitat als trencaments, mostrant una predisposició a presentar lesions en espermatozoides humans d'individus control (Brandriff i col, 1988; Estop i col, 1995). Ambdós estudis coincideixen en que aquest cromosoma poseeix un nombre molt més elevat de punts de trencament dels que hi correspondrien per probabilitat, i que el 50% d'aquests punts, es troben localitzats entre el centròmer i el segment 9qh+. En cèl·lules somàtiques, Starke i col·laboradors (2002) van proposar que l'homologia entre la regió 9p12 i 9q13-q21.1 i les regions dels braços curts dels cromosomes acrocèntrics humans, podien fer aquests cromosomes més tendents a les reorganitzacions i a tenir un risc més alt d'efectes intercromosòmics entre ells.

Curiosament, es va detectar un excés d'espermatozoides amb duplicacions parcials de la regió 9qtel, respecte als portadors de duplicacions parcials de la regió 9cen ( $p=0.017$ ). En un estudi similar en individus control, analitzant el cromosoma 1 (Sloter i col, 2000) també els espermatozoides portadors de duplicacions i delecions parcials de la regió 1p eren cinc vegades més freqüents que els portadors de la mateixa anomalia en la regió 1cen.

L'excés de duplicacions parcials de la regió 9qtel, també podria reflectir un excés de fragments acèntrics en espermatozoide, com ha estat prèviament descrit en estudis de cromosomes d'espermatozoide, tant en individus control (Brandriff i col, 1988; Estop i col, 1991; Benet i col, 1992), com en individus d'edat avançada (Martin i Rademaker, 1987; Prestes-Sartorelli i col, 2001).

Les duplicacions i delecions parcials observades en espermatozoides poden reflectir la presència de reorganitzacions estructurals desequilibrades de qualsevol tipus (translocacions, inversions, duplicacions, delecions, etc). Malauradament, en aquest tipus d'estudi no es pot determinar el tipus específic d'anomalia estructural, ja que la tècnica de FISH en nuclis interfàsics d'espermatozoide només pot discriminar entre algunes aberracions estructurals, depenent de les sondes utilitzades, com delecions, duplicacions, insercions i translocacions.

#### **4.4. Ratio sexual en espermatozoides normals i portadors d'anomalies**

El fet d'emprar sondes pels cromosomes sexuals (cromosomes X i Y en el primer article, i cromosoma Y en el segon, veure apartat 7), va permetre comprovar si existeix una correlació entre els diferents tipus d'anomalies cromosòmiques estudiades i el cromosoma sexual present als espermatozoides portadors d'anomalies. De fet, en estudis epidemiològics ha estat descrit un excés de nounats de sexe masculí amb la síndrome de Down (Petersen i col, 1993; Savage i col, 1998) i de femelles portadores de la inversió pericèntrica del cromosoma 9 (Yamada, 1992).

Els nostres resultats no mostren cap evidència de segregació preferencial del cromosoma 21, ni amb el cromosoma X, ni amb el cromosoma Y ( $p=0.61$ ), d'acord amb les dades d'altres estudis en complements d'espermatozoides (Templado i col, 1996). Això no implica que no hi pugui haver una selecció positiva de embrions masculins trisòmics pel cromosoma 21, donant lloc a l'excés de mascles nascuts amb aquesta trisomia. En nuclis d'espermatozoides analitzats per FISH (Griffin i col, 1996), es va descriure un excés d'espermatozoides disòmics pel cromosoma 21 portadors del cromosoma Y, i es va suggerir la tendència del cromosoma extra 21 a segregar preferencialment amb el cromosoma Y. Més recentment, Baumgartner i col·laboradors (1999), van fer el mateix suggeriment, tot i que els seus resultats no van assolir significació estadística ( $p=0.07$ ).

Pel que fa al cromosoma 9, es va observar un excedent d'espermatozoides amb anomalies estructurals per a aquest cromosoma, portadors en principi del cromosoma X ( $p=0.042$ ). No obstant això, en aquest estudi (article 2, apartat 7), no es va emprar sonda específica per al cromosoma X, si no només pel cromosoma Y, per la qual cosa es va assumir que aquells espermatozoides sense marcatge de cromosoma Y, eren portadors del cromosoma X, tot reconeixent una subestima dels espermatozoides nul·lisòmics pel cromosoma X. A despit d'aquesta subestima, els resultats serien coherents amb l'excés de femelles portadores de cromosomes 9 reorganitzats (Yamada, 1992).

#### **4.5. Estimació del risc d'anomalies cromosòmiques al llarg de la vida reproductiva**

En l'estudi realitzat dels percentatges d'increment de cada anomalia cromosòmica estudiada, podem observar que tots ells augmenten al llarg del temps, uns de forma molt lleugera, com la disomia 6 (5.9%), i altres de forma més accentuada, com la diploïdia (18.8%), la disomia 9 (29%), o les delecions parcials de la regió 9q terminal (28%). Si tenim en compte que aquests increments són per a cada 10 anys i per a cada tipus d'anomalia, tot i tenir en compte les baixes freqüències d'aquestes anomalies, seria de preveure que al menys en alguns casos, comportessin un increment de més del 100% al llarg de la vida fèrtil de l'individu.

La Taula 13 mostra els increments cada 10 anys per a cada anomalia, i el supòsit acumulat durant quaranta anys de vida, assumint que els percentatges es mantenen al llarg de la vida reproductiva. Per a la disomia 9, l'increment seria del 116% en un període de quaranta anys. Aplicant aquestes dades, per exemple, al individu CM1 (el més jove de la nostra sèrie) la freqüència de disomia 9 als 24 anys (0.04%) s'incrementaria fins a més del doble (0.09%) als 64 anys. Si tenim en compte l'increment per a tots els cromosomes estudiats, incloent la diploïdia, en aquest mateix individu, la freqüència d'anomalies passaria d'un 0.69% a un 1.18%, pel mateix període de temps.

**Taula 13.** Increments esperats de totes les anomalies cromosòmiques analitzades

Anomalia cromosòmica	% Increment cada 10 anys	% Increment en 40 anys
Disomia XX	13.0	52.0
Disomia YY	6.35	25.4
Disomia XY	11.7	46.8
Disomia 6	5.9	23.6
Disomia 9	29.0	116.0
Disomia 21	11.4	45.6
Diploïdia	18.8	75.2
Duplicacions 9cen	21.2	84.8
Duplicacions 9qtel	14.6	58.4
Deleccions 9cen	16.5	66.0
Deleccions 9qtel	28.0	112.0
<b>Total increment</b>	<b>176.45</b>	<b>705.80</b>

Donat que només s'han estudiat les anomalies cromosòmiques numèriques per a 5 cromosomes (6, 9, 21, X, Y), la diploïdia, i les anomalies estructurals per a un sol braç cromosòmic (9q), els percentatges d'increment d'anomalies de tots els cromosomes, tant numèriques com estructurals, al llarg de la vida reproductiva d'un individu podrien assolir freqüències molt més elevades. L'aparició de les noves tècniques de reproducció assistida, que ofereixen la possibilitat de paternitat en edats més avançades, fan que sigui de gran interès l'estudi de l'efecte de l'edat sobre les anomalies de tots els cromosomes en l'espermatozoide humà, per tal de conèixer el risc real a la descendència.





## **5. Conclusions**



1. Existeix una variabilitat interindividual, no atribuïble a l'edat, en les freqüències de les anomalies cromosòmiques analitzades, excepte per a les disomies 6, X i Y. El tractament estadístic utilitzat va minimitzar l'efecte d'aquesta heterogeneïtat, per tal que no emmascarès l'efecte de l'edat de l'individu en les anomalies cromosòmiques analitzades.
2. De totes les disomies estudiades, únicament s'ha observat un increment lineal de disomia pel cromosoma 9 amb l'edat, indicant que no tots els cromosomes mostren la mateixa susceptibilitat a la no disjunció meiótica amb l'edat de l'individu.
3. L'augment lineal en la freqüència de diploïdia suggereix un increment, amb l'edat, de la freqüència dels mecanismes que originen poliploïdia durant l'espermatogènesi, i està d'acord amb l'elevada freqüència de triploïdes d'origen patern. Actualment, encara no es coneixen els factors que indueixen la formació d'espermatozoides diploïdes.
4. Tots els tipus d'anomalies estructurals del cromosoma 9 estudiats van mostrar un increment significatiu en la seva freqüència amb l'edat, resultat no sorprenent tenint en compte les característiques inherents al procés de l'espermatogènesi, i el majoritari origen patern de les anomalies estructurals *de novo*.
5. Únicament la disomia 9 i les anomalies estructurals per aquest cromosoma presenten una segregació preferent amb el cromosoma X. La correlació entre les anomalies estructurals i el cromosoma X podria explicar l'elevat percentatge, observat a la població, de dones portadores de reorganitzacions que impliquen al cromosoma 9.
6. La tendència a l'increment per a cada període de 10 anys varia per les diferents anomalies, essent les més elevades la de disomia 9 i la diploïdia. Futurs estudis en sèries d'edat de la resta de cromosomes de l'espermatozoide, permetran conèixer el risc real d'increment d'anomalies cromosòmiques en la descendència d'individus d'edat avançada.



## **6. Bibliografia**



## **A**

---

Amiel A, Sardos-Albertini F, Fejgin MD, Sharony R, Diukman R, Bartoov B. (2001). Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv 9) and C-heterochromatin. *J Hum Genet*, 46: 245-250.

Antonarakis SE. (1993). Human chromosome 21: genome mapping and exploration, circa 1993. *Trends Genet*, 9:142-148.

Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, Egozcue J, Veiga A. (1999). Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril*, 72: 696-701.

## **B**

---

Baumgartner A, Van Hummelen P, Lowe XR, Adler ID, Wyrobek AJ. (1999). Numerical and structural chromosomal abnormalities detected in human sperm with a combination of multicolor FISH assays. *Environ Mol Mutagen*, 33: 49-58.

Behjati F, Mullarkey M, Bergbaum A, Berry AC, Docherty Z. (1997). Chromosome deletion 17p11.2 (Smith-Magenis syndrome) in seven new patients, four of whom had been referred for fragile-X investigation. *Clin Genet*, 51: 71-74.

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

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

Blanco J, Gabau E, Gomez D, Baena N, Guitart M, Egozcue J, Vidal F. (1998). Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in a population with a high prevalence of Down syndrome: increased incidence in cases of paternal origin. *Am J Hum Genet*, 63: 1067-1072.

Brandriff B, Gordon L, Ashworth L, Watchmaker G, Moore D 2nd, Wyrobek AJ, Carrano AV. (1985). Chromosomes of human sperm: variability among normal individuals. *Hum Genet*, 70: 18-24.

Brandriff BF, Gordon LA, Moore D 2nd, Carrano AV. (1988). An analysis of structural aberrations in human sperm chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 47: 29-36.

Brandriff BF, Gordon LA, Carrano AV. (1990). Cytogenetics of human sperm: structural aberrations and DNA replication. *Prog Clin Biol Res*, 340B: 425-434.

Bugge M, Collins A, Petersen MB, Fisher J, Brandt C, Hertz JM, Tranebjaerg L, de Lozier-Blanchet C, Nicolaidis P, Brondum-Nielsen K, Morton N, Mikkelsen M. (1998). Non-disjunction of chromosome 18. *Hum Mol Genet*, 7: 661-669.

Bulletti C, Flamigni C, Giacomucci E. (1996). Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update*, 2: 118-136.

## **C**

---

Colls P, Martínez-Pasarell O, Perez MM, Egozcue J, Templado C. (1998). Sperm chromosome analysis in the father of a child with a de-novo reciprocal translocation t(11;15)(q12;q22) by G-banding and fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod*, 13: 60-64.

## **E**

---

Edwards RG. (1986). Causes of early embryonic loss in human pregnancy. *Hum Reprod*, 1: 185-198.

Egozcue J, Blanco J, Vidal F (1997). Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update*, 5: 441-452.



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

Egozcue S, Blanco J, Vidal F, Egozcue J. (2002). Diploid sperm and the origin of triploidy. *Hum Reprod*, 17: 5-7.

Estop AM, Cieply K, Vankirk V, Munne S, Garver K. (1991). Cytogenetic studies in human sperm. *Hum Genet*, 87: 447-451.

Estop AM, Marquez C, Munne S, Navarro J, Cieply K, Van Kirk V, Martorell MR, Benet J, Templado C. (1995). An analysis of human sperm chromosome breakpoints. *Am J Hum Genet*, 56: 452-460.

## **F**

---

Fisher JM, Harvey JF, Morton NE, Jacobs PA. (1995). Trisomy 18: studies of the parent and cell division of origin and the effect of aberrant recombination on nondisjunction. *Am J Hum Genet*, 56: 669-675.

## **G**

---

Gagne R, Laberge C, Tanguay R. (1973). Cytological aspect and intranuclear localization of the heterochromatic segments of C9 chromosomes in man. *Chromosoma*, 41: 159-166.

Gardner RJM, Sutherland GR. (1996). Chromosome abnormalities and genetic counselling. *Oxford Monograph on Medical Genetics*. New York: Oxford University Press, 1996, vol29, pp 139-152.

Griffin DK, Abruzzo MA, Millie EA, Sheean LA, Feingold E, Sherman SL, Hassold TJ. (1995). Non-disjunction in human sperm: evidence for an effect of increasing paternal age. *Hum Mol Genet*, 4: 2227-2232.

Griffin DK, Abruzzo MA, Millie EA, Feingold E, Hassold TJ. (1996). Sex ratio in normal and disomic sperm: evidence that the extra chromosome 21 preferentially segregates with the Y chromosome. *Am J Hum Genet*, 59: 1108-1113.

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

Guttenbach M, Kohn FM, Engel W, Schmid M. (2000). Meiotic nondisjunction of chromosomes 1, 17, 18, X, and Y in men more than 80 years of Age. *Biol Reprod*, 63: 1727-1729.

## **H**

---

Hassold TJ, Jacobs PA. (1984). Trisomy in man. *Annu Rev Genet*, 18: 69-97.

Hassold T, Hunt PA, Sherman S. (1993). Trisomy in humans: incidence, origin and etiology. *Curr Opin Genet Dev*, 3: 398-403.

Hassold TJ, Merrill M, Adkins K, Freeman S, Sherman S. (1995). Recombination and maternal age-dependent nondisjunction: molecular studies of trisomy 16. *Am J Hum Genet*, 57: 867-874.

Hassold TJ, Sherman S, Hunt P. (2000). Counting cross-overs: characterizing meiotic recombination in mammals. *Hum Mol Genet*, 9: 2409-2419.

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

Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M, Hodges CA, Ilagan A, Voigt RC, Thomas S, Thomas BF, Hassold TJ. (2003). Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol*, 13: 546-553.

## **J**

---

Jacobs PA. (1992). The chromosome complement of human gametes. *Oxf Rev Reprod Bio*, 14: 47-72.

Jacobs PA, Hassold TJ. (1995). The origin of numerical chromosome abnormalities. *Adv Genet*, 33: 101-133.

Jamieson ME, Coutts JR, Connor JM. (1994). The chromosome constitution of human preimplantation embryos fertilized in vitro. *Hum Reprod*, 9: 709-715.

## **K**

---

Kinakin B, Rademaker A, Martin R. (1997). Paternal age effect of YY aneuploidy in human sperm, as assessed by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 78: 116-119.

Koehler KE, Hawley RS, Sherman S, Hassold T. (1996). Recombination and nondisjunction in humans and flies. *Hum Mol Genet*, 5: 1495-1504.

## **L**

---

Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, Gu Y, Shen J, Saker D, May KM, Avramopoulos D, Petersen MB, Hallberg A, Mikkelsen M, Hassold TJ, Sherman SL. (1996). Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet*, 14: 400-405.

Lamb NE, Feingold E, Savage A, Avramopoulos D, Freeman S, Gu Y, Hallberg A, Hersey J, Karadima G, Pettay D, Saker D, Shen J, Taft L, Mikkelsen M, Petersen MB, Hassold T, Sherman SL. (1997). Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. *Hum Mol Genet*, 6: 1391-1399.

Laverge H, De Sutter P, Verschraegen-Spae MR, De Paepe A, Dhont M. (1997). Triple colour fluorescent in-situ hybridization for chromosomes X,Y and 1 on spare human embryos. *Hum Reprod*, 12: 809-814.

Lezhava T. (2003), Chromosome and aging: genetic conception of aging. *Biogerontology*, 2: 253-260.

Lorda-Sanchez I, Binkert F, Maechler M, Robinson WP, Schinzel AA. (1992). Reduced recombination and paternal age effect in Klinefelter syndrome. *Hum Genet*, 89: 524-530.

Luetjens CM, Rolf C, Gassner P, Werny JE, Nieschlag E. (2002). Sperm aneuploidy rates in younger and older men. *Hum Reprod*, 17: 1826-1832.

## **M**

---

Macas E, Imthurn B, Keller PJ. (2001). Increased incidence of numerical chromosome abnormalities in spermatozoa injected into human oocytes by ICSI. *Hum Reprod*, 16: 115-120.

MacDonald M, Hassold T, Harvey J, Wang LH, Morton NE, Jacobs P. (1994). The origin of 47,XXY and 47,XXX aneuploidy: heterogeneous mechanisms and role of aberrant recombination. *Hum Mol Genet.*, 3: 1365-1371.

Margolis RL, Lohez OD, Andressen PR. (2003). G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. *J Cel Biochem*, 88: 673-683.

Marquez C, Egozcue J, Martorell MR, Moreno V, Templado C. (1996). Colcemid increases the frequency of chromosome abnormalities in human sperm. *Cytogenet Cell Genet*, 72: 164-70.

Martin RH, Lin CC, Balkan W, Burns K. (1982). Direct chromosomal analysis of human spermatozoa: preliminary results from 18 normal men. *Am J Hum Genet*, 34: 459-468.

Martin RH. (1986). A fragile site 10q25 in human sperm chromosomes. *J Med Genet*, 23: 279.

Martin RH, Rademaker AW. (1987). The effect of age on the frequency of sperm chromosomal abnormalities in normal men. *Am J Hum Genet*, 41: 484-492.

Martin RH, Rademaker A. (1990). The frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements. *Cytogenet Cell Genet*, 53: 103-107.

Martin RH, Spriggs E, Ko E, Rademaker AW. (1995). The relationship between paternal age, sex ratios, and aneuploidy frequencies in human sperm, as assessed by multicolor FISH. *Am J Hum Genet*, 57: 1395-1399.

McInnes B, Rademaker A, Martin R. (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. *Hum Reprod*, 13: 2489-2494.

Miller OJ, Therman E. *Human chromosomes*. 4<sup>th</sup> edition. Springer Verlag, New York, 2001.

Mroz K, Hassold TJ, Hunt PA. (1999). Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors. *Hum Reprod*, 14: 1151-1156.

## **N**

---

Nicolaidis P, Petersen MB. (1998). Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod*, 13: 313-319.

## **O**

---

Oliver Bonet M. *Estudi citogenètic i molecular del procés meiòtic en individus portadors de translocacions recíproques equilibrades* (2003). Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Olson SD, Magenis RE. Preferential paternal origin of the novo structurals rearrangements. A: *The cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements*. Daniel A (editor), Alan R Liss, New York. 1988; pp 583-599.

**P**

---

Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, Kearns WG. (1999). Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 14: 1266-1273.

Pellestor F, Girardet A, Coignet L, Andreo B, Charlieu JP. (1996). Assessment of aneuploidy for chromosomes 8, 9, 13, 16, and 21 in human sperm by using primed in situ labeling technique. *Am J Hum Genet*, 58: 797-802.

Penrose LS. (1933). The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. *J Genet*, 27: 219-224.

Petersen MB, Antonarakis SE, Hassold TJ, Freeman SB, Sherman SL, Avramopoulos D, Mikkelsen M. (1993). Paternal nondisjunction in trisomy 21: excess of male patients. *Hum Mol Genet*, 2: 1691-1695.

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

Plas E, Berger P, Hermann M, Pflüger H. (2000). Effects of aging on male fertility?. *Exp Geront*, 35: 543-551.

Prestes Sartorelli EM, Mazzucatto LF, de Pina-Neto JM. (2001). Effect of paternal age on human sperm chromosomes. *Fertil Steril*, 76: 1119-1123.

**R**

---

Renaud H, Gasser SM. (1997). Heterochromatin: a meiotic matchmaker?. *Trends Cell Biol*, 7: 201-205.

Rieder CL, Schultz A, Cole R, Sluder G. (1994). Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J Cell Biol*, 127: 1301-1310.

Rives N, Mazurier S, Bellet D, Joly G, Mace B. (1998). Assessment of autosome and gonosome disomy in human sperm nuclei by chromosome painting. *Hum Genet*, 102: 616-623.

Rives N, Langlois G, Bordes A, Simeon N, Mace B. (2002). Cytogenetic analysis of spermatozoa from males aged between 47 and 71 years. *J Med Genet*, 39: E63.

Robbins WA, Baulch JE, Moore D 2nd, Weier HU, Blakey D, Wyrobek AJ. (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. *Reprod Fertil Dev*, 7: 799-809.

Robinson WP, Bernasconi F, Mutirangura A, Ledbetter DH, Langlois S, Malcolm S, Morris MA, Schinzel AA. (1993). Nondisjunction of chromosome 15: origin and recombination. *Am J Hum Genet*, 53: 740-751.

Robinson WP, Langlois S, Schuffenhauer S, Horsthemke B, Michaelis RC, Christian S, Ledbetter DH, Schinzel A. (1996). Cytogenetic and age-dependent risk factors associated with uniparental disomy 15. *Prenat Diagn*, 16: 837-844.

Roeder GS. (1997). Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev*, 11: 2600-2621.

Rosenbusch B, Strehler E, Sterzik K. (1992). Cytogenetics of human spermatozoa: correlations with sperm morphology and age of fertile men. *Fertil Steril*, 58: 1071-1072.

Rosenbusch B. (1995). Cytogenetics of human spermatozoa: What about the reproductive relevance of structural chromosome aberrations?. *J Ass Reprod Genet*, 6: 375-383.

Ross LO, Maxfield R, Dawson D. (1996). Exchanges are not equally able to enhance meiotic chromosome segregation in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 4979-4983.

Rousseaux S, Hazzouri M, Pelletier R, Monteil M, Usson Y, Sele B. (1998). Disomy rates for chromosomes 14 and 21 studied by fluorescent in-situ hybridization in spermatozoa from three men over 60 years of age. *Mol Hum Reprod*, 4: 695-699.

Rubes J, Vozdova M, Robbins WA, Rezacova O, Perreault SD, Wyrobek AJ. (2002). Stable variants of sperm aneuploidy among healthy men show associations between germinal and somatic aneuploidy. *Am J Hum Genet.*, 70: 1507-1519.

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

## S

---

Savage AR, Petersen MB, Pettay D, Taft L, Allran K, Freeman SB, Karadima G, Avramopoulos D, Torfs C, Mikkelsen M, Hassold TJ, Sherman SL. (1998). Elucidating the mechanisms of paternal non-disjunction of chromosome 21 in humans. *Hum Mol Genet*, 7: 1221-1227.

Scott Hawley, R. (2003). Human meiosis: Model organisms address the maternal age effect. *Curr. Biol*, 13: 305-307.

Serra A, Brahe C, Millington-Ward A, Neri G, Tedeschi B, Tassone F, Bova R. (1990). Pericentric inversion of chromosome 9: prevalence in 300 Down syndrome families and molecular studies of nondisjunction. *Am J Med Genet Suppl*, 7: 162-168.

Shaffer LG, Lupski JR. (2000). Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet*, 34: 297-329.

Sherard J, Bean C, Bove B, DeDuca V, Estévil KI, Karcsh HJ, Munshi G, Reamer JF, Suazo G, Wilmoth D, Dahlke MB, Weiss C, Borgaonkar DS. (1986). Long survival in a 69,XXY triploid male. *Am J Med Genet*, 25: 307-312.

Sherman SL, Takaesu N, Freeman SB, Grantham M, Phillips C, Blackston RD, Jacobs PA, Cockwell AE, Freeman V, Uchida I, Mikkelsen M, Kurnit DM, Buraczynska M, Keats BJB, Hassold TJ. (1991). Trisomy 21: association between reduced recombination and nondisjunction. *Am J Hum Genet*, 49: 608-620.

Sherman SL, Petersen MB, Freeman SB, Hersey J, Pettay D, Taft L, Frantzen M, Mikkelsen M, Hassold TJ. (1994). Non-disjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: evidence for a maternal age-dependent mechanism involving reduced recombination. *Hum Mol Genet*, 3: 1529-1535.

Shi Q, Martin RH. (2000). Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of meiotic chromosome segregation in a 47,XY male and a review of the literature. *Am J Med Genet*, 93: 40-46.



Shi Q, Martin RH. (2001). Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction*, 121: 655-666.

Shi Q, Spriggs E, Field LL, Rademaker A, Ko E, Barclay L, Martin RH. (2002). Absence of age effect on meiotic recombination between human X and Y chromosomes. *Am J Hum Genet*, 71: 254-261.

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

Soares SR, Vidal F, Bosch M, Martinez-Pasarell O, Nogues C, Egozcue J, Templado C. (2001). Acrocentric chromosome disomy is increased in spermatozoa from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet*, 108: 499-503.

Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH. (1996). Aneuploidy in human sperm: the use of multicolor FISH to test various theories of nondisjunction. *Am J Hum Genet*, 58: 356-362.

Starke H, Seidel J, Henn W, Reichardt S, Volleth M, Stumm M, Behrend C, Sandig KR, Kelbova C, Senger G, Albrecht B, Hansmann I, Heller A, Claussen U, Liehr T. (2002). Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *Eur J Hum Genet*, 10: 790-800.

Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. (2002). Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod*, 17: 446-451.

Storchova Z, Pellman D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 45-54.

Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker A, Navarro J, Benet J, Martin RH. (2004). Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am J Hum Genet*, 74: 521-531.

## T

---

Templado C, Marquez C, Munne S, Colls P, Martorell MR, Ciepły K, Benet J, Van Kirk V, Navarro J, Estop AM. (1996). An analysis of human sperm chromosome aneuploidy. *Cytogenet Cell Genet*, 74: 194-200.

## V

---

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

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

Vidal F, Blanco J, Egozcue J. (2001). Chromosomal abnormalities in sperm. *Mol Cell Endocrinol*, 183: S51-S54.

## W

---

Warburton D. (1991). De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet*, 49: 995-1013.

Watt JL, Templeton AA, Messinis I, Bell L, Cunningham P, Duncan RO. (1987). Trisomy 1 in an eight cell human pre-embryo. *J Med Genet*, 24: 60-64.

Williams BJ, Ballenger CA, Malter HE, Bishop F, Tucker M, Zwingman TA, Hassold TJ. (1993). *Hum Mol Genet*, 2: 1929-1936.

## Y

---

Yamada K. (1992). Population studies of INV(9) chromosomes in 4,300 Japanese: incidence, sex difference and clinical significance. *Jpn J Hum Genet*, 37: 293-301.

Yavetz H, Yogev L, Homonnai Z, Paz G. (1991). Prerequisites for successful human sperm cryobanking: sperm quality and prefreezing holding time. *Fertil Steril*, 55: 812-816.

Yoon PW, Freeman SB, Sherman SL, Taft LF, Gu Y, Pettay D, Flanders WD, Khoury MJ, Hassold TJ. (1996). Advanced maternal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of chromosomal error: a population-based study. *Am J Hum Genet*, 58: 628-33.

## Z

---

Zaragoza MV, Jacobs PA, James RS, Rogan P, Sherman S, Hassold TJ. (1994). Nondisjunction of human acrocentric chromosomes: studies of 432 trisomic fetuses and liveborns. *Hum Genet*, 94: 411-417.

Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A, Hassold TJ. (2000). Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. *Am J Hum Genet*, 66: 1807-1820.

## **7. Articles**

**7.1. Linear increase of diploidy in human sperm with age: A four color FISH study**

**European Journal of Human Genetics, 9: 533-538. (2001)**

**Factor d'impacte: 3.136 (Journal Citation Report, 2002)**



**7.2. Linear increase of structural and numerical chromosome 9 abnormalities in human sperm regarding age.**

**European Journal of Human Genetics, 11: 754-759. (2003).**

**Factor d'impacte: 3.136 (Journal Citation Report, 2002)**

## **8. Annex**

Índex d'impacte

Àrea de Genètica i Herència

*Journal Citation Report, 2002*