



# **Origen patern de la síndrome de Klinefelter: Anàlisi citogenètic i molecular de l'espermatozoide**

Memòria presentada per

**Núria Arnedo Santamaria**

per a aspirar al grau de  
Doctor en Ciències Biològiques

Tesi realitzada sota la direcció de les Dres. Carme Nogués Sanmiquel i Cristina Templado Meseguer, professors del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona

Dra. Carme Nogués

Dra. Cristina Templado

Bellaterra, Juny 2007

Aquest treball s'ha realitzat amb el següent finançament:

- Ministerio de Educación y Ciencia; projecte BFI2002-01193
- Generalitat de Catalunya 2005SGR-00495
- Generalitat de Catalunya 2005SGR-00437

Núria Arnedo va gaudir d'una beca de Formació de personal Investigador de la Universitat Autònoma de Catalunya durant l'any 2001.

A la Laura,

als meus pares,

a la meva germana,

al Germán,

a tots vosaltres...

## AGRAÏMENTS

En primer lloc he d'agraïr a les meves directores de tesi el fet que hagi arribat fins aquí. Sense el seu ajut no hauria estat capaç d'aconseguir-ho.

En segon lloc, però no per això menys important, a tota la meva família perquè sense el seu suport probablement ja hauria plegat fa temps. Als meus pares, a la Meritxell, a l'Hèctor i als avis. També a aquells que van començar aquest camí amb mi però que no estan amb nosaltres ara que he aconseguit acabar. Tots ells han hagut de suportar els bons i els mals moments pels que he passat aquests anys i sempre m'han ofert la seva esquena per a recolzar-hi el cap. Des de la meva mare que m'acompanyava a buscar mostres de sang o semen i a posar gels verticals de nit a la UAB (perquè em feia por anar sola!!) fins a la meva germana, el meu cunyat i la meva "yaya" que han fet de cangur per a què pogués fer tesi a casa sola o anés a les reunions de correccions. També he de donar-li les gràcies al meu marit, el Germán, que m'ha donat sempre el seu suport i que m'ha ajudat més del que es pensa i del que jo li he agraït. I sobretot a la reina de la casa, la Laura, que ha hagut de compartir l'atenció de la seva mami amb aquesta tesi. Vosaltres us mereixeu aquest títol tant com jo!

L'altra persona a la que he d'agraïr especialment el seu ajut és aquella que va fer possible que m'involucrés en aquest projecte, el Jordi Camps. Però li he de donar les gràcies no només per això sinó també perquè sempre que li he demanat ajut me l'ha donat. Sobretot perquè sense ell no hauria aconseguit mai que em sortís la hibridació de subtelòmers. Però no només per ser un magnífic company de laboratori sinó per ser un dels meus millors amics.

Les altres persones que m'han donat el seu suport incondicional són les meves millors amigues. La Yolanda C i la Tània, les quals, malgrat no saber ben bé de què anava això sempre han estat al meu costat. I com no, la Natàlia, la Clàudia i la Laura Latre, que m'han sabut dir "tonta" quan ho he necessitat, amb les que he compartit molts bons moments, viatges divertidíssims i que m'han animat en els moments més durs d'aquests anys. Tampoc sense el vostre granet de sorra avui no estaria aquí.

Si seguim en ordre d'importància els següents que he d'esmentar són la Mercè i el Sergio. Els meus "germans" grans que em van ensenyar la majoria de tècniques de laboratori que he anat utilitzant en aquesta tesi. En aquest capítol he d'incloure una altra

vegada a la Carme Nogués que no ha dubtat mai en posar-se la bata i entrar amb mi al laboratori per a posar una PCR o carregar-me un gel vertical quan jo no podia i per a anar a buscar mostres allà on fes falta. També, encara que ella ni se n'hagi adonat, a la Olga Martínez Pasarell que va introduir-me en aquest món gràcies a la feina que havia fet abans que jo entrés en el grup de recerca. També agrair el seu ajut a les persones que han fet els 12 crèdits amb mi: la Bet, la Laia i la Yolanda. Part d'aquesta feina és gràcies a elles, sobretot a la Yolanda que m'ha carregat o revelat molts gels quan la feina no em permetia fer-ho a mi i que ha estat una companya i amiga des que va arribar a la Unitat. Moltes gràcies!!

També he d'agrair a la Carme Fuster, la Cristina Hernando, la Mònica Santos i el Vincenzo Cirigliano la part de CGH d'aquesta tesi. Ells van introduir-me en el món de la genòmica comparada i van fer possible l'estudi del cromosoma Y en anell mitjançant aquesta tècnica.

Ara he de recordar a tots els companys de les Unitats tant de Ciències com de Medicina. Tots han contribuït, des de les secretàries fins als tècnics, els titulars i els "matxaques". Però m'agradaria esmentar personalment als que han contribuït en major grau. A la Sílvia que sempre m'ha ofert el seu ajut (i la seva impresora en color!), al Marc que s'ha fet un tip de preparar-me solucions i amb qui he mantingut llargues i interessants converses de futbol (segur que no vols tornar a ser culé?), a la Fanny i al Jordi Benet els qui per proximitat d'àrea de recerca m'han resolt molt dubtes i al Leo que amb el seu bon humor és capaç d'alegrar un mal dia a qualsevol. Pel que fa als matxaques de Ciències: als meus companys de despatx que m'han suportat tot i no deixar-los fumar, a la Zaida i l'Esther que m'han assessorat en temes estadístics i de meiosi masculina, a la Cristina Camprubí i al Pep que van fer possible que arribés a ser capaç de fer gels verticals i a tots aquells amb els que m'he creuat al laboratori i que m'han fet més agradables aquests anys de feina. Pel que fa als matxaques de Medicina: a la Maria Oliver i a l'Imma que em van introduir en el món del Cytovision, a l'Ignasi, a la Cristina Hernando, a la Rossana, a la Mònica, a la Montse Codina i a tota la resta que malgrat passar poques estones amb ells sempre m'han tractat com si fos una més. A la Marta Martín amb qui em sento molt identificada ja que li passa com a mi, al ser mig d'un lloc i mig d'un altre. Amb ella i amb la Laura L vam passar moltes hores divertides (laborables i festives) a microscopis de Medicina en els primers anys de tesi. També a

l'Esther i a la Núria Camats que encara que estan sovint a l'IBF han estat unes inmillorables companyes.

També als companys de Fisiologia Animal (especialment a l'Albert) pel seu suport en moments de necessitat (per què els gels verticals deixen de sortir a l'estiu?).

No vull oblidar-me de l'Ana Castellano. Ella ha fet possible que aquesta tesi tingui portada i imatges de qualitat. Moltes gràcies per ajudar-me sempre que t'ho he demanat i per no dubtar a invertir una estona per a millorar les meves imatges degut a la meva poca traça amb l'ordinador.

I, sobretot, a cadascun dels pacients i les seves famílies que han fet possible aquest estudi. He de destacar a la família del cromosoma en anell, a qui vaig molestar molts dies amb visites o trucades i que sempre tenien un refresc o un cafè per a mi. No puc deixar de dir que no he fet "morcillas" amb la sang que treiem!! (vaig prometre que ho posaria i així ho he fet). A tots els laboratoris i hospitals que han fet possible aconseguir les mostres. Al Dr.Rajmil pel seu ajut a nivell més andrològic. A la Mercè Bosch (una altra vegada) i a l'Esmeralda per ajudar-me amb les extraccions de sang a domicili. Als practicants del dispensari que no van dubtar en donar-nos tubs d'EDTA-K3 per a les extraccions de sang. També a la Pilar Grao i l'Emma Triviño que van passar-me flascons de cultiu d'amniòcits i còrion per a posar a punt les tècniques d'extracció de DNA. Als companys de Parc Taulí (especialment al Txema) que em van introduir en el món de l'extracció de DNA de placenta.

I en la dura tasca d'arreglar el manuscrit per a la seva impressió i enquadernació he de tornar a esmentar la meva germana, l'Edu i el Germán que m'han donat suport informàtic i moral, fent possible que la tesi així quedat com veieu.

Espero no haver-me oblidat de ningú. Si ha estat així no ho he fet intencionadament. Són molts anys i han passat moltes persones per la meva vida però tots han contribuït en major o menor grau, fins i tot sense elles adonar-se'n. Gràcies. Us vull dedicar a tots vosaltres aquesta tesi.

# ÍNDIX

<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	1
1.1. L'aneuploïdia a l'espècie humana .....	1
1.2. La síndrome de Klinefelter.....	3
1.3. Aneuploïdia en l'espermatozoide utilitzant tècniques d'hibridació in situ fluorescent (FISH) .....	5
1.4. Recombinació en el parell XY .....	7
1.5. Cromosomes en anell .....	8
1.6. Hipòtesi .....	11
1.7. Objectius .....	11
<b>2. MATERIAL I MÈTODES</b> .....	13
2.1. Material biològic .....	13
2.2. Tècnica de bandes G .....	15
2.3. Tècnica d'hibridació in situ fluorescent (FISH).....	15
2.4. Tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) .....	18
2.5. Tècnica d'hibridació genòmica comparada (CGH).....	22
2.6. Anàlisi estadístic de les dades.....	22
<b>3. RESULTATS</b> .....	23
3.1. Origen parental de la síndrome de Klinefelter.....	23
3.2. FISH en espermatozoides de pares amb un fill/avortament amb la síndrome de Klinefelter .....	23
3.3. Anàlisi citogenètic i molecular en cèl·lules somàtiques en la família r(Y).....	26
3.4. Anàlisi de delecions en el cromosoma Y en anell.....	28
<b>4. DISCUSSIÓ</b> .....	29
4.1. Origen patern de la síndrome de Klinefelter .....	29
4.2. Increment de disomia XY en espermatozoides de pares amb descendència Klinefelter d'origen patern.....	29
4.3. Comportament mitòtic del cromosoma Y en anell .....	33
4.4. Mecanisme de formació del cromosoma Y en anell.....	34
4.5. Segregació meiótica del cromosoma Y en anell en espermatozoides .....	35
4.6. Cromosoma Y en anell i fertilitat masculina.....	37
<b>5. CONCLUSIONS</b> .....	39
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	40
<b>7. ARTICLES</b>	
7.1. Mitotic and meiotic behaviour of a naturally transmitted ring Y chromosome: Reproductive risk evaluation	
7.2. Sperm aneuploidy in fathers of Klinefelter's syndrome offspring assessed by multicolour fluorescent in situ hybridization using probes for chromosomes 6, 13, 18, 21, 22, X and Y	

# **1. INTRODUCCIÓ**



### 1.1. L'aneuploidia a l'espècie humana

L'aneuploidia és una anomalia cromosòmica numèrica que es caracteritza per la presència d'un nombre de cromosomes no múltiple del complement haploid. Les trisomies i la monosomia del cromosoma X són les aneuploidies més freqüents a l'espècie humana amb una incidència del 5% en embarassos clínicament reconeguts i del 35% en avortaments espontanis (Jacobs, 1992; Hassold i col, 1996; Hassold i Hunt, 2001). La distribució de l'aneuploidia varia considerablement en els diferents estadis del desenvolupament (Taula 1).

**Taula 1.** Freqüència i distribució d'aneuploidies en els diferents estadis del desenvolupament<sup>1</sup>

Anomalia cromosòmica	Avortaments espontanis (%)	Morts perinatales (%)	Nounats (%)	Gestacions clíniques (%)	Supervivència (%)
<i>Trisomia</i>					
2	1.1	-	-	0.16	0.0
3	0.3	-	-	0.04	0.0
4	0.8	-	-	0.12	0.0
5	0.1	-	-	0.02	0.0
6	0.3	-	-	0.04	0.0
7	0.9	-	-	0.14	0.0
8	0.8	-	-	0.12	0.0
9	0.7	0.2	-	0.10	0.0
10	0.5	-	-	0.07	0.0
11	0.1	-	-	0.07	0.0
12	0.2	-	-	0.02	0.0
13	1.1	0.3	0.005	0.18	2.8
14	1.0	-	-	0.14	0.0
15	1.7	-	-	0.26	0.0
16	7.5	-	-	1.13	0.0
17	0.1	-	-	0.02	0.0
18	1.1	1.1	0.010	0.18	5.4
20	0.6	-	-	0.09	0.0
21	2.3	1.3	0.130	0.45	23.8
22	2.7	0.2	-	0.40	0.0
47, XXY	0.2	0.2	0.050	0.08	53.0
47, XXX	0.1	0.2	0.050	0.05	94.4
47, XYY	-	-	0.050	0.04	100.0
<i>Monosomia</i>					
45, X	8.6	0.3	0.005	1.3	0.3

<sup>1</sup>Hassold and Jacobs, 1984; revisat per Hassold i col, 1996

### Origen de les trisomies

Les trisomies tenen el seu origen en processos de no disjunció a la meiosi, donant lloc a gàmetes aneuploides, o a la mitosi, produint individus mosaics. L'origen parental de les trisomies depèn del cromosoma afectat (revisat per Hassold i Hunt, 2001). Les trisomies autosòmiques són predominantment d'origen matern (43%-100% dels casos), mentre que les trisomies dels cromosomes sexuals són majoritàriament d'origen patern (MacDonald i col, 1994; Jacobs i col, 1997; Robinson i col, 1999; Thomas i Hassold, 2003; revisat per Hassold i Hunt, 2001) (Taula 2).

**Taula 2.** Origen parental de les trisomies en l'espècie humana<sup>1</sup>

Trisomia	Origen (%)		
	Patern	Matern	Post-zigòtic
2	28	67	6
7	-	43	57
15	15	85	-
16	-	100	-
18	-	89	11
21	8	88	3
22	3	97	-
XXY	51	41	8
XXX	8	74	18
XYY	100	-	-

<sup>1</sup>Hassold i col, 1996; Hassold i Hunt, 2001; revisat per Hall i col, 2006

El 51% dels casos de la síndrome de Klinefelter (47,XXY) (Thomas i Hassold, 2003) i el 100% dels homes 47,XYY (Robinson i Jacobs, 1999) tenen un origen patern. En canvi, en la trisomia 47,XXX, el 74% dels casos presenten un origen matern (MacDonald i col, 1994).

## 1.2. La síndrome de Klinefelter

La síndrome de Klinefelter (47,XXY), descrita per primera vegada al 1942 (Klinefelter i col, 1942), és l'anomalia somàtica més freqüent en individus infèrtils a l'espècie humana, amb una incidència del 0.1-0.2% en la població general i de fins al 3.1% en la població infèril. Els pacients amb cariotip 47,XXY solen ser azoospèrmics, amb l'excepció d'alguns individus mosaics 46,XY/47,XXY que presenten oligozoospèrmia (Lenz i col, 2005). Aquests individus s'inclouen en programes de reproducció assistida gràcies a l'avenç que ha suposat la introducció de la tècnica d'injecció intracitoplasmàtica de l'espermatozoide (ICSI) que permet la fecundació amb espermatozoides testiculars.

### **Fenotip**

El fenotip pot variar, però es caracteritza generalment per hipogonadisme, concentracions elevades de FSH, cames anormalment llargues, distribucions femenines del teixit adipós corporal incloent ginecomàstia, pèl púbic i facial disminuït o absent, penis petits i dificultats d'aprenentatge (Smyth i Bremner, 1998; Visootsak i Graham, 2006).

### **Citogenètica**

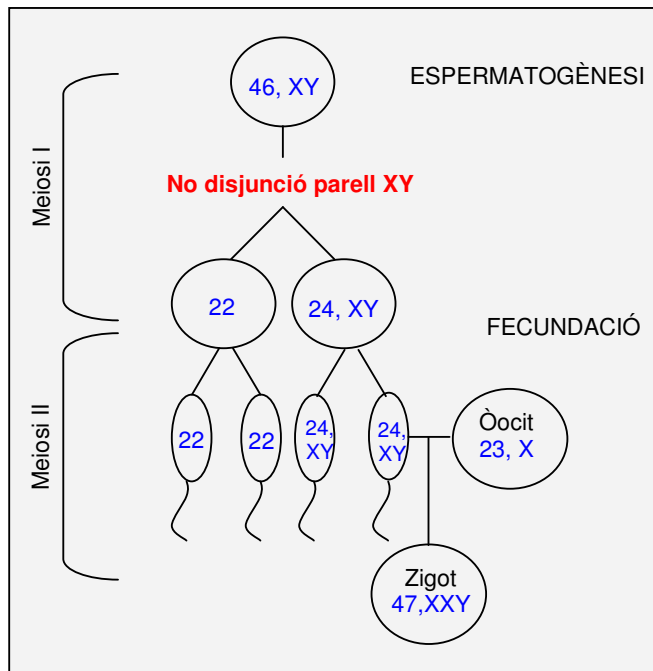
Aproximadament un 80-90% dels casos amb síndrome de Klinefelter presenta el cariotip 47,XXY. El 10% restant dels casos són mosaics 46,XY/47,XXY. Tot i això, la incidència real dels casos de mosaicisme està infraestimada degut a què el mosaicisme pot estar confinat a testicles i no detectar-se en el cariotip somàtic (Lanfranco i col, 2004).

D'altres variants de la síndrome de Klinefelter inclouen individus amb cariotip 48,XXXY; 48,XXYY; 49,XXXXY i 49, XXXYY (Linden i col, 1995; Visootsak i col, 2001; Visootsak i Graham, 2006).

### **Origen parental**

Els casos de síndrome de Klinefelter d'origen patern (50,9%) (Jacobs i col, 1988; Hassold i col, 1991; Lorda-Sánchez i col, 1992; revisat per Hall i col, 2006) són resultat d'una no disjunció del parell XY en la primera divisió meiótica (MI) durant l'espermatogènesi (Figura 1), a diferència dels casos d'origen matern que poden ser resultat d'errors en meiosi I (MI) o meiosi II (MII). Estudis recents han associat l'absència

de recombinació en la regió pseudoautosòmica 1 (PAR1) del parell XY amb errors en la segregació meiótica durant l'espermatogènesi (Hassold i col, 1991; revisat per Hall i col, 2006) (veure apartat 1.4).



**Figura 1.** Origen meiótic de la síndrome de Klinefelter d'origen patern

### **Efecte de l'edat paterna**

Els primers treballs realitzats per a determinar una possible associació entre edat paterna avançada i descendència amb la síndrome de Klinefelter d'origen patern van ser epidemiològics. Aquests estudis no van establir una relació entre edat paterna avançada i origen patern d'aquesta síndrome (Carothers i col, 1984; revisat per Slotter i col, 2004). En canvi, Lorda-Sánchez i col (1992), utilitzant la tècnica de Southern Blot en parens d'individus amb la síndrome de Klinefelter d'origen patern, van descriure una baixa freqüència de recombinació en el parell XY en parens d'edat avançada. No obstant, l'únic grup (Lowe i col, 2001 i Eskenazi i col, 2002) que ha analitzat la freqüència de disomia del parell XY en caps d'espermatozoides de parens amb descendència Klinefelter va

observar un efecte de l'edat en la disomia dels cromosomes sexuals, tant en casos de la síndrome d'origen patern com en els d'origen matern.

### **1.3. Aneuploïdia en l'espermatozoide utilitzant tècniques d'hibridació in situ fluorescent (FISH)**

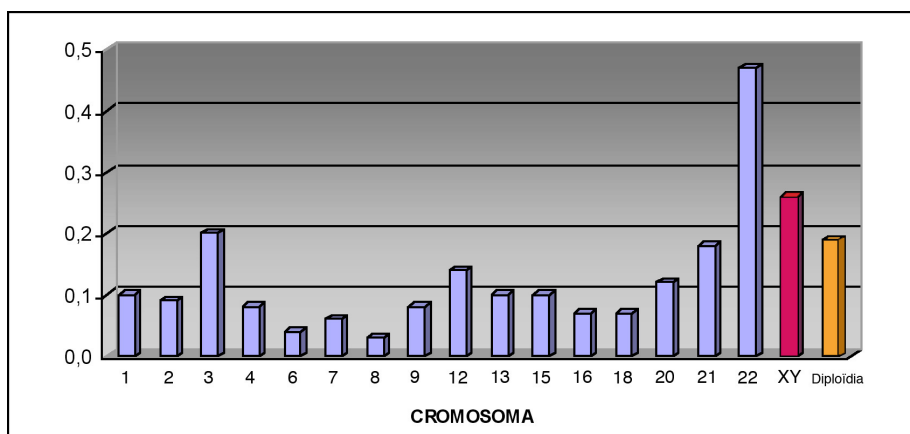
Per a entendre els mecanismes que originen les aneuploïdies i els factors que les indueixen és necessari l'estudi directe dels gàmetes ja que la gran majoria de les aneuploïdies tenen el seu origen durant la meiosi. L'aplicació de la tècnica de FISH (Williams i col, 1993) en caps descondensats d'espermatozoide, utilitzant dues o més sondes de DNA simultàniament, ha permès l'anàlisi d'anomalies numèriques i estructurals en un elevat nombre d'espermatozoides.

#### ***Estudis de FISH en espermatozoides d'individus de la població general***

Mitjançant la tècnica de FISH multicolor (analitzant un mínim de 10.000 espermatozoides) en individus control s'han analitzat les freqüències d'anomalies numèriques per a gairebé tots els cromosomes (revisat per Templado i col, 2005) (Figura 2). La freqüència mitjana de disomia per als cromosomes analitzats varia del 0.03% al 0.12%, excepte per als cromosomes 3, 21, 22, X i Y que presenten una major freqüència de disomia (revisat per Templado i col, 2005). Per al cromosoma 3 i 22 els estudis són escassos: només s'ha realitzat un estudi del cromosoma 3 (Downie i col, 1997) i dos estudis del cromosoma 22 (Martin and Rademaker, 1999; Soares i col, 2001a) amb resultats molt diferents (1.21% versus 0.06%), possiblement degut a la diferent sonda de DNA utilitzada en ambdós estudis. Pel que fa a l'elevada freqüència de disomia per al cromosoma 21 i per als cromosomes sexuals respecte de la resta de cromosomes, confirma les observacions descrites en estudis de cariotips d'espermatozoide (revisat per Templado i col, 1996).

Les diferències en les freqüències de disomia reportades pels diferents autors per a un mateix cromosoma podrien ser degudes a modificacions en el protocol de FISH, a la utilització de diferents sondes, a diferències en els criteris de recompte aplicats en cada

laboratori o bé poden reflectir diferències reals entre els individus (Egozcue i col 1997; revisat per Templado i col, 2005)



**Figura 2.** Freqüència mitjana de disomia per a cada cromosoma en individus de la població general determinades per FISH en caps d'espermatozoides descondensats. Només s'inclouen estudis de FISH multicolor que analitzen un mínim de 10.000 caps d'espermatozoides per individu, utilitzen criteris de comptatge estrictes i un nombre de sondes suficient per a diferenciar entre disomia i diploidia (Adaptat de Templado i col, 2005)

També s'ha analitzat l'efecte de l'edat d'individus de la població general utilitzant la tècnica de FISH multicolor (revisat per Buwe i col, 2005). No s'ha trobat cap correlació per als cromosomes 1 (Guttenbach i col, 2000), 3 (Guttenbach i col, 1994), 6 (Bosch i col, 2001), 7 (Guttenbach i col, 1994), 8 (Robbins i col, 1995), 10 (Guttenbach i col, 1994), 11 (Guttenbach i col, 1994), 12 (Martin i col, 1995), 13 (Shi i Martin, 2000), 14 (Rousseaux i col, 1998), 17 (Guttenbach i col, 2000), 18 (Lutjens i col, 2002) i 21 (Bosch i col, 2001). En canvi, s'ha descrit un increment de disomia 9 i de diploidia amb l'edat paterna (Rousseaux i col, 1998; Bosch i col, 2001; Bosch i col, 2003; revisat per Buwe i col, 2005). Pel que fa als cromosomes sexuals, alguns autors han descrit un increment de la freqüència de disomia XY amb l'edat paterna (Griffin i col, 1995; Guttenbach i col,

2000; Bosch i col, 2001) mentre que d'altres estudis no troben aquesta associació (Martin i col, 1995; Shi i Martin, 2000; Luetjens i col, 2002; revisat per Buwe i col, 2005).

### ***Estudis de FISH en espermatozoides d'individus amb descendència aneuploide d'origen patern***

Estudis realitzats en espermatozoides de pares amb un fill aneuploide d'origen patern, afectat de la síndrome de Turner (Martínez-Passarell i col, 1999, Tang i col, 2004) o de Down (Blanco i col, 1998), han descrit un increment de disomia del cromosoma implicat en l'aneuploïdia (cromosomes sexuals i cromosoma 21, respectivament). Posteriorment, Soares i col (2001a i 2001b) van ampliar els estudis de FISH a altres cromosomes (cromosomes 13, 21, 22 i XY) en aquests mateixos individus amb descendència aneuploide (Blanco i col, 1998; Martínez-Passarell i col, 1999), descrivint increments en la disomia de cromosomes no implicats en l'aneuploïdia estudiada. Aquests autors proposen l'existència d'una tendència generalitzada a la no disjunció meiótica en individus amb descendència aneuploide.

#### **1.4. Recombinació en el parell XY**

Els cromosomes sexuals i el cromosoma 21 són els parells cromosòmics que presenten una major freqüència de no disjunció en meiosi (MacDonald i col, 1994; Hassold i Hunt, 2001; Thomas i Hassold, 2003; revisat per Hall i col, 2006). Estudis de cariotip d'espermatozoides, mitjançant la tècnica de hámster-humà, ja indicaven que aquests eren els cromosomes més freqüentment implicats en aneuploïdies (Martin i col, 1991; Templado i col, 1996). La major susceptibilitat a la no disjunció durant l'espermatogènesi dels cromosomes sexuals i del cromosoma 21 s'explica pel fet que aquests cromosomes presenten un únic quiasma durant la primera divisió meiótica (Shi i Martin, 2000; Hassold i Hunt, 2001; Sun i col, 2006). Els cromosomes X i Y només presenten dues regions d'homologia denominades regió pseudoautosòmica 1 (PAR1) i 2 (PAR2), localitzades a la part distal del braç curt (PAR1) i del braç llarg (PAR2). Malgrat que la recombinació pot donar-se en ambdues regions, en el 98% dels casos es dona a la regió PAR1 (Li i Hamer, 1995; Blaschke i Rappold, 2006).

Diferents estudis han relacionat una baixa taxa de recombinació en el bivalent XY amb un increment de la freqüència de disomia en espermatozoides. Martin i col (1999), emprant la tècnica de reacció en cadena de la polimerasa (PCR), van observar una disminució de la freqüència de recombinació en espermatozoides disòmics XY en comparació amb espermatozoides normals. Altres autors han descrit, en un individu amb espermatogènesi normal, que només un 73% dels espermatoïcits presentaven un punt de recombinació en la regió PAR1 (Sun i col, 2004). Més recentment, estudiant espermatoïcits d'individus infèrtils, s'ha suggerit la possibilitat que la recombinació en el parell XY podria ser un indicador de la freqüència de recombinació de la resta dels bivalents (Codina-Pascual i col, 2005).

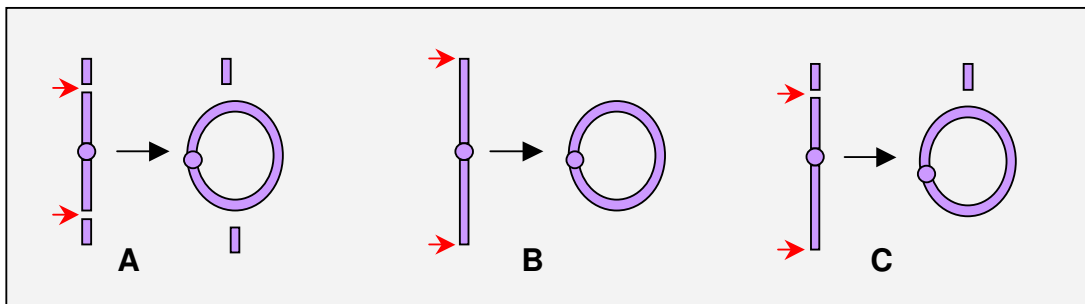
### **1.5. Cromosomes en anell**

Els cromosomes en anell tenen una incidència de 1 en 25.000 concepcions detectades (Jacobs, 1981) i s'han descrit anells per a tots els cromosomes humans (Kosztolányi, 1988; Schinzel, 2001), encara que els anells més freqüents són els dels cromosomes 13 i 18 (Wyandt, 1988).

Generalment, un cromosoma en anell és el resultat de dos trencaments, un a cada braç del mateix cromosoma, amb la posterior fusió dels extrems lliures resultants i pèrdua d'ambdós extrems cromosòmics (Miller and Therman, 2001). Malgrat això, s'han descrit altres mecanismes de formació d'un anell: la unió d'un extrem lliure producte d'un trencament amb la regió telomèrica oposada (Henegariu i col, 1997a); la fusió de seqüències subtelomèriques (Vermeesch i col, 2002) o la fusió telòmer-telòmer donant lloc a un anell sense pèrdua de material genètic (Henegariu i col, 1997a; Sigurdardottir i col, 1999) (Figura 3).

La majoria de casos descrits de cromosomes Y en anell s'han analitzat mitjançant tècniques citogenètiques clàssiques. Només alguns autors han analitzat aquest tipus de cromosomes en anell mitjançant tècniques moleculars (Kozma i col, 1988; Wegner i col, 1992; Pezzolo i col, 1993a; Henegariu i col, 1997a,b; Bofinger i col, 1999; Tzancheva i col, 1999; Blanco i col, 2003).





**Figura 3.** Possibles mecanismes de formació d'un cromosoma en anell descrits a l'espècie humana. Anell cromosòmic resultant de: (A) dos trencaments i unió dels extrems lliures, (B) la fusió de seqüències subtèlomèriques o fusió telòmer-telòmer sense pèrdua de material genètic i (C) un sol trencament i posterior unió de l'extrem lliure amb el telòmer oposat

### **Comportament mitòtic**

Els cromosomes en anell es caracteritzen per presentar una elevada inestabilitat durant el procés mitòtic. Normalment, en absència d'intercanvis de cromàtides germanes (SCE) en l'anell, aquest cromosoma té una segregació normal durant la divisió cel·lular, donant lloc a dues cèl·lules filles amb anell. La presència de 1 o 2 SCEs en el anell dona lloc a la formació d'anells intercalats o anells dicèntrics de mida doble a l'anell original (Miller and Therman, 2001). Generalment, els anells intercalats i dicèntrics, en divisions posteriors, poden passar a una de les cèl·lules filles (donant lloc a una segona línia cel·lular en què manca l'anell) o bé poden entrar en un cicle pont-trencament-fusió-trencament (*bridge-breakage-fusion-breakage*) produint fragments cromosòmics que acabarien perdent-se (Miller and Therman, 2001). És per això, que la majoria dels individus amb un cromosoma en anell presenten una segona línia cel·lular monosòmica que pot ser o no viable, depenent del cromosoma en anell.

### **Característiques fenotípiques**

Els individus amb un cromosoma en anell presenten una elevada variabilitat fenotípica depenent del cromosoma implicat en la reorganització, del fragment delecionat en la formació de l'anell i del percentatge de la línia monosòmica en els diferents teixits. A més, s'han descrit casos de coexistència de diferents tipus d'anells amb presència de

dicèntrics, tetracèntrics i, fins i tot, un cas d'anells octacèntrics (Pezzolo i col, 1993a; Henegariu i col, 1997b). Quan el mecanisme de formació de l'anell implica pèrdua de material cromosòmic, el fenotip de l'individu és similar al que presenten les delecions terminals del mateix cromosoma (McGinnis i col, 1992). En canvi, en els cromosomes en anell sense pèrdua de material cromosòmic, el fenotip de l'individu depèn de la inestabilitat de l'anell durant la mitosi (Coté i col, 1981). Pel que fa als anells del cromosoma Y, el fenotip d'aquests pacients varia considerablement i va des d'individus amb fenotip normal fins a pacients amb genitals externs ambigus o disgenèsia gonadal (revisat per Daniel, 1985; Hsu i col, 1994).

### **Comportament meiótic**

La majoria dels cromosomes en anell s'originen *de novo* i menys d'un 1% són heretats (revisat per Kostolányi, 1991). Els cromosomes en anell que s'hereten més freqüentment són els cromosomes 20, 21 i 22 (Palmer i col, 1977; Stoll i Roth, 1983; Hertz, 1987; Back i col, 1989; Kennerknecht i col, 1990). Només hi ha un cas descrit de transmissió d'un cromosoma Y en anell mitjançant reproducció assistida amb la tècnica d'ICSI (Bofinger i col, 1999).

Tot i l'interès que té l'anàlisi del comportament meiótic de cromosomes Y en anell per a conèixer el risc de descendència amb anomalies cromosòmiques en individus portadors, només hi ha dos estudis meiótics en dos individus infèrtils publicats (Chandley i Edmond, 1971; Blanco i col, 2003). El primer treball es va realitzar en metafases d'espermatoïcits mitjançant tècniques citogenètiques convencionals (Chandley i Edmond, 1971) i el segon es va portar a terme en caps d'espermatozoides i en cèl·lules meiótiques procedents d'una mostra de semen, utilitzant FISH multicolor (Blanco i col, 2003).

## 1.6. Hipòtesi

En espermatozoides de pares de fills o d'avortaments amb la síndrome de Klinefelter d'origen patern, la freqüència de disomia dels cromosomes sexuals i d'altres cromosomes no implicats en la trisomia podria estar incrementada respecte a la de pares d'individus amb la síndrome de Klinefelter d'origen matern. L'edat paterna podria ser un factor de risc d'anomalies cromosòmiques en l'espermatozoide.

## 1.7. Objectius

El principal objectiu d'aquest treball ha estat avaluar el risc de descendència aneuploide per als cromosomes sexuals i per als autosomes 6, 13, 18, 21 i 22 en pares d'individus amb la síndrome de Klinefelter d'origen patern, amb els següents objectius concrets:

1. Comparar les freqüències de disomia dels cromosomes 6, 13, 18, 21, 22, X i Y en els espermatozoides d'individus amb descendència Klinefelter d'origen matern i patern
2. Determinar si existeix o no un efecte de l'edat paterna en la freqüència d'anomalies numèriques en els espermatozoides

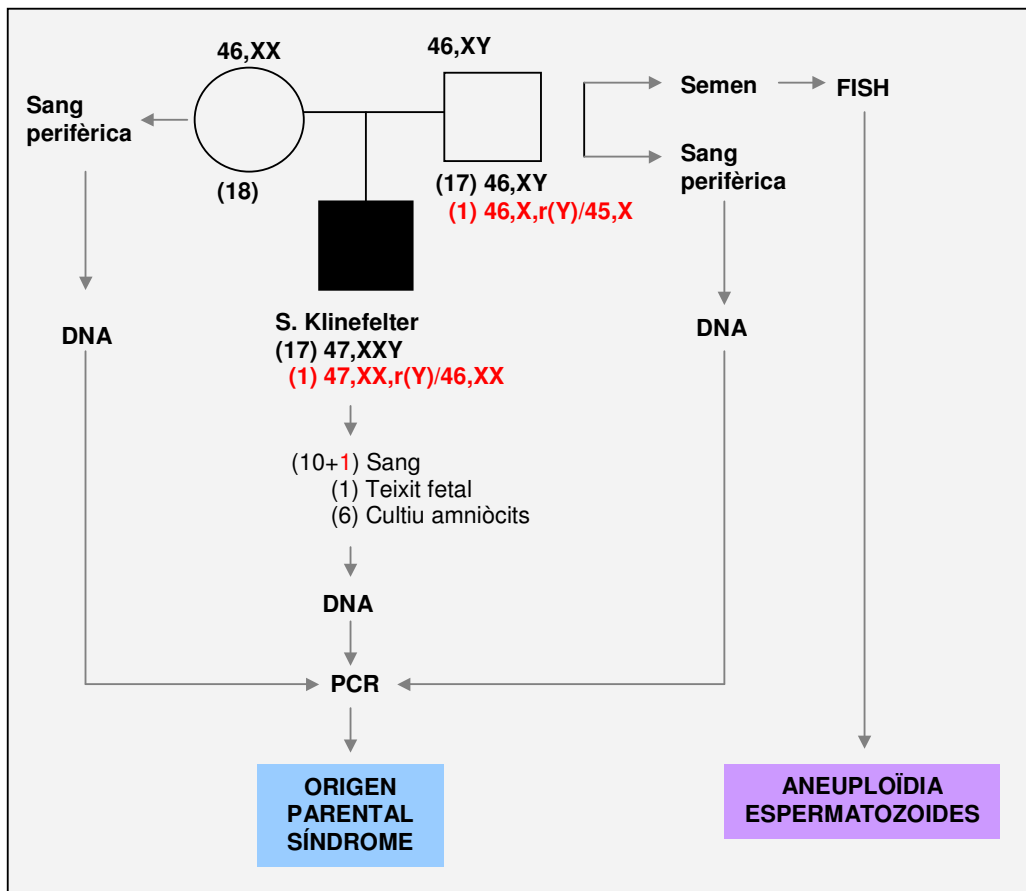
## **2. MATERIAL I MÈTODES**



## 2.1. Material biològic

### **Estudi de famílies amb un fill/avortament afectat de la síndrome de Klinefelter**

S'han estudiat 18 famílies amb un fill/avortament afectat de la síndrome de Klinefelter. En una de les famílies el pare presentava un cariotip 46,X,r(Y)/45,X i el seu fill 47,XX,r(Y)/46,XX (Figura 4).



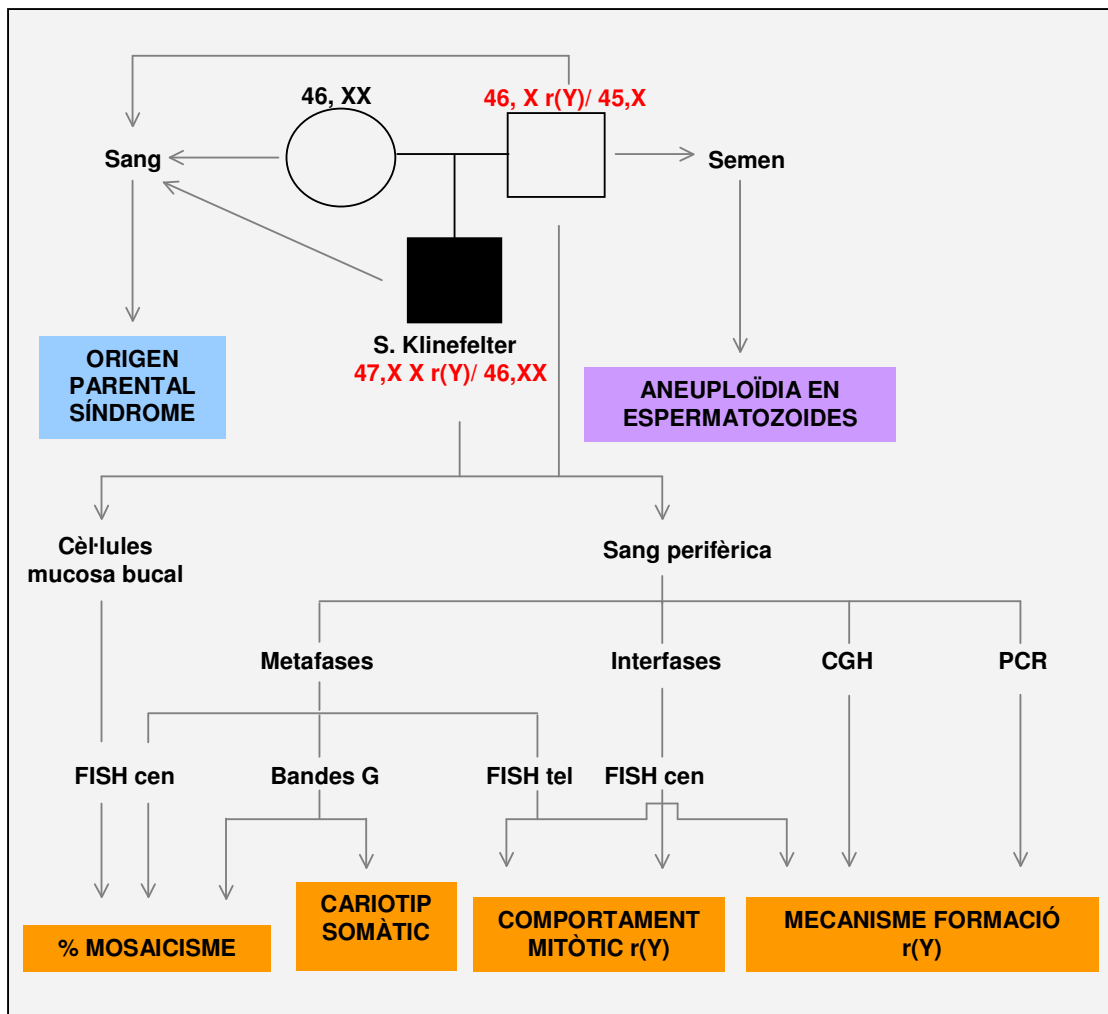
**Figura 4.** Material biològic i estudis realitzats a les 18 famílies estudiades amb un fill/avortament afectat de la síndrome de Klinefelter

El DNA necessari per a l'estudi de l'origen de la síndrome de Klinefelter va ser obtingut del següents tipus de mostres: sang perifèrica (10 casos), cultiu d'amniòcits (6 casos), sang del fetus obtinguda per punció cardíaca durant la interrupció legal de l'embaràs

posterior a l'amniocentesi (1 cas), teixit fetal (1 cas) i sang perifèrica en el cas dels progenitors (2x18 casos). Per a l'estudi de l'aneuploïdia en espermatozoides dels pares es va obtenir una mostra de semen en els 18 casos.

**Estudi familiar d'un anell r(Y)**

En el cas del pare i fill amb un cromosoma Y en anell es va ampliar l'estudi per a analitzar el percentatge de mosaïcisme i el comportament mitòtic i meiótic de l'anell, així com el seu mecanisme de formació (Figura 5).



**Figura 5.** Material biològic i estudis realitzats al pare i fill amb un cromosoma Y en anell.

Totes les mostres van ser recollides després d'obtenir el consentiment informat de les persones implicades. En el cas de menors d'edat, es va obtenir el consentiment d'un dels dos progenitors.

## 2.2. Tècnica de bandes G

El cariotip somàtic dels 3 membres de la família del r(Y) es va analitzar amb la tècnica de bandes G convencional amb tinció de Wright seguint el protocol descrit per Seabright i col (1972).

## 2.3. Tècnica d'hibridació in situ fluorescent (FISH)

La tècnica de FISH es va utilitzar per a determinar la freqüència d'aneuploïdia en espermatozoides dels pares amb descendència Klinefelter. En el cas de la família del r(Y) també es va utilitzar per a l'estudi del percentatge de mosaïcisme, del comportament mitòtic i del mecanisme de formació del r(Y) (Taula 3).

### Sondes utilitzades

Els tipus de sondes utilitzades (Vysis Inc.) en les tècniques de FISH es representen a la Taula 3.

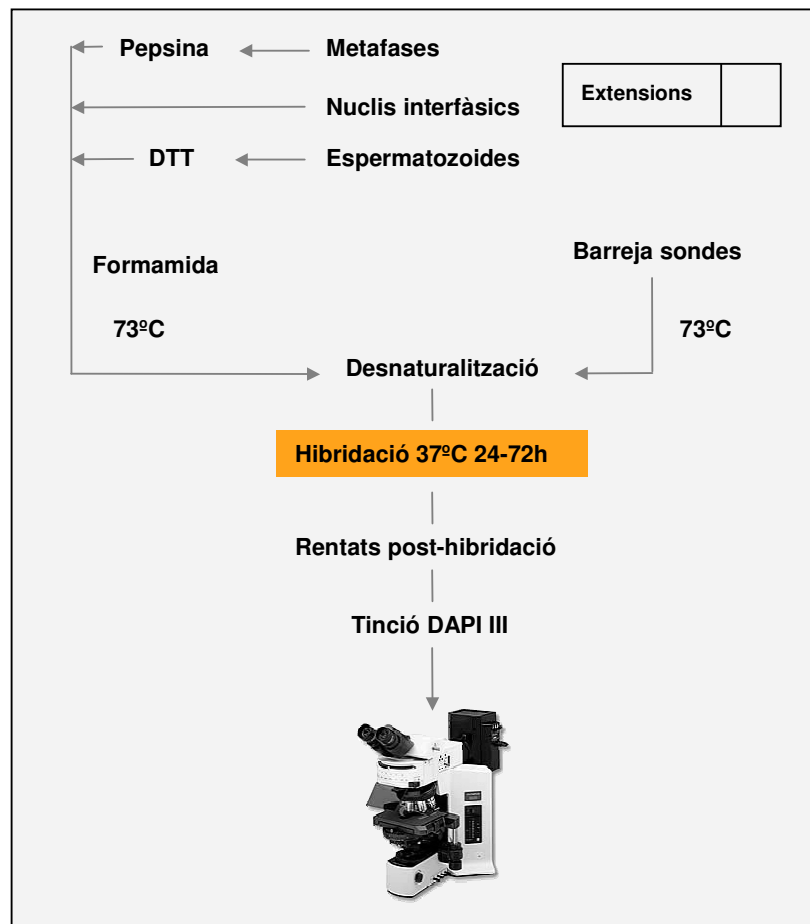
**Taula 3.** Sondes utilitzades en cada tipus cel·lular analitzat en el present treball

Tipus cel·lular i fase analitzada	Sondes	Tipus d'estudi
Limfòcits / Metafase	CEP6, CEPX, CEPY Tel Xp/Yp, Tel Xq/Yq	Mosaïcisme família r(Y) Mecanisme de formació r(Y)
Limfòcits / Interfase	CEP6, CEPX, CEPY	Mosaïcisme família r(Y)
Bucosa mucal / Interfase	CEP6, CEPX, CEPY	Mosaïcisme família r(Y)
Caps espermatozoides / Interfase	CEP6, LSI13, CEP18, LSI21, LSI22, CEPX, Y-SatIII	Aneuploïdia en espermatozoides



**Protocol de FISH**

El protocol de FISH emprat en aquest estudi per a tots els tipus de teixit i mostres utilitzades, és el recomanat per la casa comercial (Vysis Inc.) amb petites modificacions (Figura 6) .



**Figura 6.** Protocol de la tècnica de FISH multicolor

Els portaobjectes es van rentar en una solució de 2XSSC, es van deshidratar en una sèrie d'etanols i es van desnaturalitzar en una solució de Formamida al 70%, a 73°C durant 3-5 minuts. La barreja de sondes es va desnaturalitzar 5 minuts a 73°C. La hibridació es va deixar en una càmera humida a 37°C, entre 12-72 hores.

Per a la FISH amb sondes subtelomèriques per als cromosomes X i Y, aplicada a metafases de limfòcits, es va fer un tractament enzimàtic amb pepsina i una postfixació amb formaldehid a l'1% previs a la hibridació.

En el cas dels caps d'espermatozoides, abans de realitzar la hibridació, es van descondensar els caps en una solució 5mM i pH 7.4 de ditiotreitòl (DTT) a 37°C, entre 8 i 15 minuts, depenent de l'individu i de l'envelliment de la preparació. Es van realitzar dues rondes d'hibridacions en preparacions de caps d'espermatozoides diferents per a cada pare estudiat: una amb sondes per als cromosomes 6, 21, X i Y, i una altra amb sondes per als cromosomes 13, 18 i 22.

### ***Rentats post-hibridació***

Un cop passades les 24-72 hores d'hibridació, es van retirar els cubreobjectes i les preparacions es van rentar, primer, en una solució de 0.4XSSC a 75°C, durant 2 minuts i, després, en una solució 2XSSC/Tween 20 0.1%, a temperatura ambient, durant 1 minut. Els portaobjectes es van deixar assecar a temperatura ambient i, posteriorment, es van contratenyir amb 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI-III de Vysis). Es van conservar a -20°C fins a l'observació al microscopi de fluorescència.

### ***Observació i captura d'imatges***

Les mostres es van analitzar en un microscopi de fluorescència Olympus AX70 equipat amb un filtre triple per a FITC/Texas Red/DAPI i un joc de filtres específics per a DAPI, FITC, Aqua i Texas Red. Les imatges es van captar amb el sistema de processament d'imatges automàtic Cytovision Ultra (Applied Imaging, Sunderland, UK).

### ***Criteris de recompte***

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

- Només s'han analitzat preparacions amb un 99% d'eficiència d'hibridació i es van comptabilitzar els nuclis intactes, no solapats i amb una cua visible.
- Es van considerar dues còpies per un mateix cromosoma, quan eren de la mateixa mida i intensitat, i es trobaven separades, com a mínim, per una distància equivalent al diàmetre d'una d'elles.

- Les nul·lisomies es van comptabilitzar quan no es detectava senyal per a la sonda corresponent, però el nucli contenia un senyal per a cada un dels altres cromosomes analitzats.
- Es van anotar com a diploïdia els casos en què hi havia dues senyals per a cada un dels cromosomes estudiats.
- En la FISH amb sondes subtèlomèriques per als cromosomes X i Y, es va utilitzar com a control positiu d'hibridació els senyals per als subtèlomers dels braços p i q del cromosoma X.

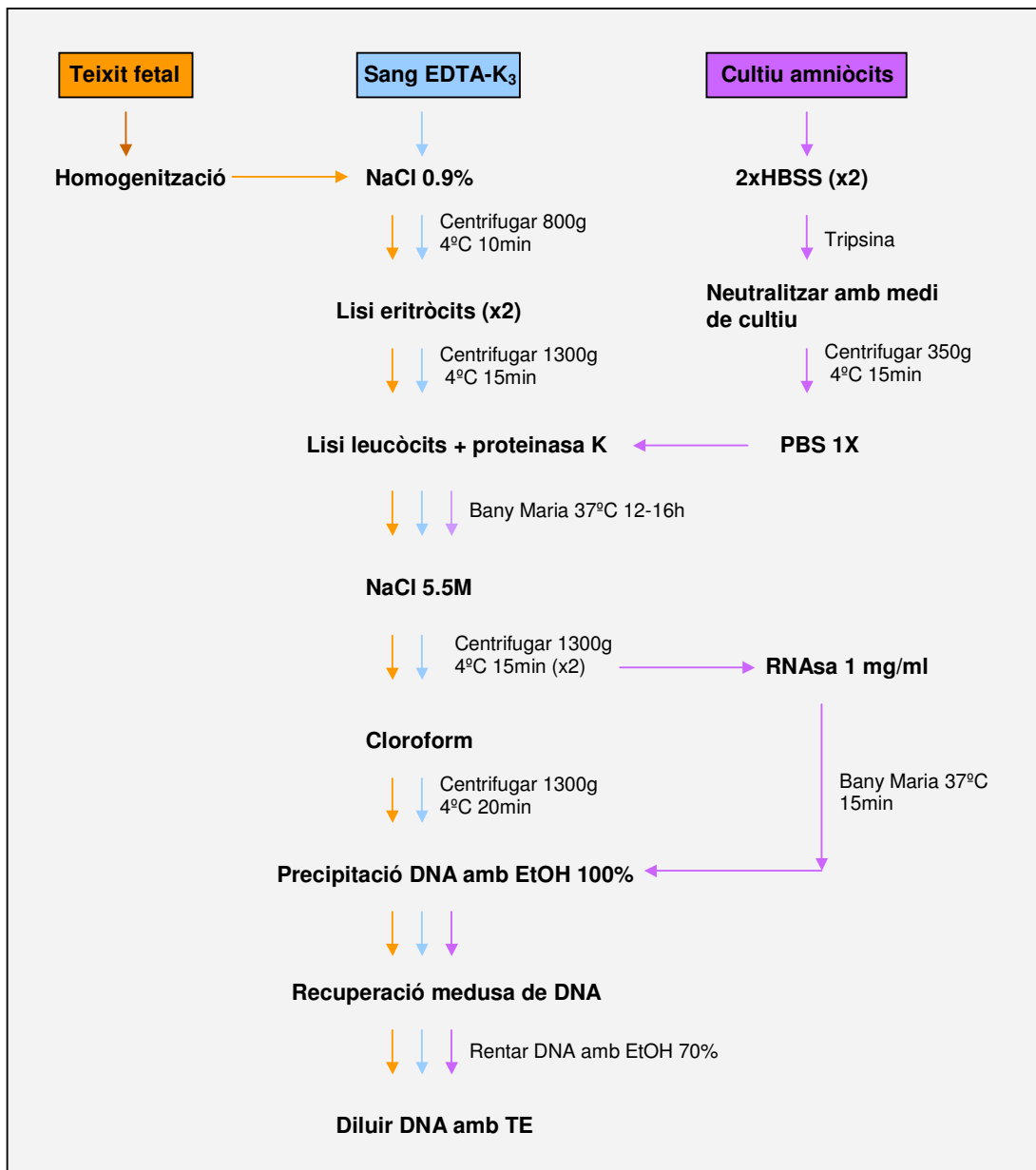
L'anàlisi de caps descondensats d'espermatozoides, mitjançant FISH, es va fer previ a la determinació de l'origen parental de la síndrome en cada un dels casos estudiats per a assegurar l'objectivitat del recompte.

#### **2.4. Tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR)**

L'origen parental de la síndrome de Klinefelter s'ha determinat mitjançant la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa a partir del DNA dels fills/avortaments i dels seus pares. A més, aquesta tècnica s'ha utilitzat per a amplificar un gen i dos marcadors del cromosoma Y en el pare i el seu fill amb un cromosoma Y en anell, per a verificar la seva presència.

##### **Obtenció del DNA**

El DNA necessari per a les diferents amplificacions es va obtenir de sang, de teixit fetal o de cultiu de líquid amniòtic (Figura 7). Per a l'obtenció de DNA de sang es va seguir el mètode d'extracció salina descrit per Miller i col (1988). Per a l'extracció de DNA de teixit fetal i de cultiu de líquid amniòtic es va utilitzar el mateix protocol amb alguna petita variació (Figura 7).



**Figura 7.** Protocol d'extracció de DNA a partir de teixit fetal, sang perifèrica i amniòcits

### **Condicions de la tècnica de PCR**

Les amplificacions es van realitzar en un volum final de 50µl amb les següents condicions: 1% de buffer (Ecogen), 250 µM de dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech

Inc.), 0.8 µl de cada primer (Research Genetics o Roche), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Ecogen), 0.5 IU d'Ecotaq Polimerasa (Ecogen) i 0.5-0.8 µg de DNA. La reacció es va dur a terme en un termociclador Perkin Elmer.

### **Polimorfismes del cromosoma X amplificats**

Per a la determinació de l'origen parental del cromosoma X addicional es van amplificar 10 polimorfismes del cromosoma X. Els polimorfismes amplificats i les condicions de la PCR per a cada un d'ells queden reflexades a les Taules 4 i 5 (<http://gdb.org>).

**Taula 4.** Característiques dels polimorfismes del cromosoma X amplificats per PCR per a la detecció de l'origen parental de la Síndrome de Klinefelter

Locus	Localització	Nº aHels	Heterozigositat (%)	Longitud (bp)
DXS1283E	Xp22.3	12	89	145-167
DYS II	Xp21.2	8	82	214-228
DMD49	Xp21.2	19	93	227-257
MAO	Xp11.3	7	82	172-184
DXS991	Xp11.2	9	81	266-290
AR	Xq11.2	11	89	195-225
DXS1196	Xq21.2	9	79	209-227
DXS101	Xq22	11	76	185-227
DXS1192	Xq26	7	84	123-135
DXS8377	Xq28	15	95	203-245

**Taula 5.** Condicions de la PCR per als polimorfismes del cromosoma X amplificats per PCR per a la detecció de l'origen parental de la Síndrome de Klinefelter

Locus	Desnaturalització	Hibridació	Extensió	Nº cicles	Extensió final
DXS1283E	94°C 60s	58°C 60s	72°C 60s	30	72°C 7min
DYS II	94°C 30s	55°C 30s	63°C 4 m	24	63°C 10min
DMD49	94°C 30s	62°C 30s	65°C 4 m	24	65°C 10min
MAO	95°C 45s	58°C 45s	72°C 2 m	30	72°C 10min
DXS991	94°C 60s	55°C 30s	72°C 30s	26	72°C 6min
AR	94°C 60s	58°C 2 m	72°C 2 m	30	72°C 10min
DXS1196	95°C 45s	63°C 45s	72°C 2 m	30	72°C 10min
DXS101	95°C 45s	60°C 30s	72°C 30s	26	72°C 10min
DXS1192	94°C 45s	54°C 45s	72°C 30s	26	72°C 7min
DXS8377	94°C 45s	55°C 45s	72°C 45s	26	72°C 10min

### **Gens del cromosoma Y amplificats**

Es van amplificar per PCR un gen no polimòrfic (SRY/sY14/Yp11.3) i dos marcadors (DYZ3/Sy78/Ycen i DYZ1/sY160/Yq12) del cromosoma Y per a estudiar la seva presència en el cromosoma en anell. Les condicions de la PCR per a cada un d'ells queden reflexades a la Taula 6.

**Taula 6.** Característiques i condicions de la PCR del gen SRY i dels marcadors del cromosoma Y amplificats

Locus	Localització	Longitud	Condicions de PCR				
			Desnaturalització	Hibridació	Extensió	Cicles	Extensió final
SRY	Yp11.3	360 pb	94°C 30s	55°C 30s	63°C 4 m	24	63°C 10 m
DYZ3	Ycen	170 pb	95°C 30s	55°C 30s	72°C 60s	30	72°C 10 m
DYZ1	Yq12	236 pb	95°C 45s	60°C 60s	72°C 2 m	30	72°C 10 m

El gen SRY i els marcadors DYZ3 i DYZ1 es van amplificar simultàniament amb un altre gen d'un cromosoma diferent, com a control intern d'amplificació. En el cas de l'SRY el control intern va ser el polimorfisme DYS-II del cromosoma X. En el cas del DYZ3 i DYZ1 el control intern va ser el gen IR5, localitzat al cromosoma 19. Com a control positiu es va amplificar el DNA d'un individu 46,XY i com a control negatiu el d'un individu 46,XX.

### **Anàlisi de les amplificacions**

Es va comprovar l'amplificació dels polimorfismes del cromosoma X per a la determinació de l'origen parental en gels d'agarosa al 2%. L'anàlisi de l'origen parental es va realitzar en gels verticals d'acrilamida:bisacrilamida (19:1) al 6%. Els gels es van deixar córrer de 8 a 14 hores a un voltatge de 7-14 mA. L'anàlisi de les amplificacions del gen i els marcadors del cromosoma Y en el pare i el fill de la família del r(Y) es va fer en gels d'agarosa al 2% durant 1 hora a 90V. Es van tenyir amb Bromur d'Etidi i es va fotografiar amb una càmera Polaroid.

## 2.5. Tècnica d'hibridació genòmica comparada (CGH)

La tècnica de CGH es va realitzar per a identificar la mida de la deleció terminal producte de la formació del cromosoma Y en anell en el pare i el fill amb un r(Y). El marcatge del DNA, el protocol d'hibridació i la lectura dels resultats es va fer seguint el protocol descrit per Hernando i col (2002) i seguint les instruccions de la casa comercial (Vysis Inc). El DNA control es va obtenir d'un individu amb cariotip 46,XY. El DNA problema (pare i fill amb l'anell) es va marcar amb spectrum Red-dUTP i el DNA control amb spectrum Green-dUTP. Es va barrejar els dos DNA marcats (control i problema) en proporció 1:1 i aquesta barreja es va hibridar amb metafases 46,XY, fixades prèviament en un portaobjectes. El resultat de la hibridació es va analitzar utilitzant un Cytovision Ultra Workstation (Applied Imaging, Sunderland, UK). El programa informàtic calcula la relació entre els dos colors de fluorescència (DNA problema vermell versus DNA control verd) en tota la longitud de cada cromosoma, de forma que una ràtio superior a 1.25 representa guanys cromosòmics i una inferior a 0.75 representa pèrdua cromosòmica.

## 2.6. Anàlisi estadístic de les dades

S'ha aplicat el test exacte de Fisher bilateral amb la correcció de Bonferroni per a establir si hi havia diferències en les freqüències de disomia o diploïdia entre individus, així com entre els grups de pares d'origen matern i patern. També es va utilitzar aquest test per a comparar els valors de diploïdia que es van obtenir en cada una de les dues hibridacions per a cada individu.

Es va realitzar una recta de regressió entre edat paterna i freqüències de disomia XY per a cada grup analitzat. Per a comparar les pendents de les rectes de regressió d'edat parental, entre el grup d'origen matern i el grup d'origen patern, es va aplicar l'anàlisi de covariància.

Es va utilitzar el test de  $\chi^2$  per a l'anàlisi de les diferències significatives entre les dues fases cel·lulars, el teixits estudiats i les tècniques emprades en l'anàlisi del comportament mitòtic del r(Y) en pare i fill. Quan el test de  $\chi^2$  no era aplicable, es va utilitzar el test de Fisher.

### **3. RESULTATS**



### 3.1. Origen parental de la síndrome de Klinefelter

Es va analitzar l'origen parental de la síndrome de Klinefelter en 18 famílies amb un fill/avortament amb la síndrome. En cada cas, hi havia un mínim d'un polimorfisme informatiu en Xp i un altre en Xq. El cromosoma X adicional era d'origen patern en 10 casos i d'origen matern en els 8 restants. El polimorfisme més informatiu va ser el DYS-II (informatiu en 15 dels 18 pacients) i el menys informatiu va ser el DXS991 (informatiu en 3 dels 18 casos).

### 3.2. FISH en espermatozoides de pares amb un fill/avortament amb la síndrome de Klinefelter

Es van analitzar un mínim 10.000 caps d'espermatozoides per individu i hibridació, amb un total de 384.555 espermatozoides procedents de 18 pares amb un fill/avortament afectat de la síndrome de Klinefelter, mitjançant la tècnica de FISH multicolor: 166.698 caps d'espermatozoides en 8 casos d'origen matern (grup matern o grup control) i 217.857 en els 10 casos d'origen patern (grup patern) (veure Figura 8).

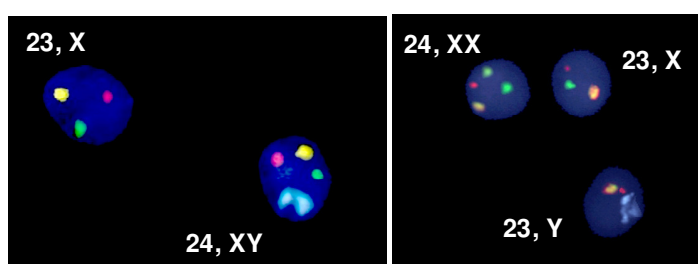


Figura 8. FISH multicolor en caps d'espermatozoides descendents amb senyals per als cromosomes 6 (groc), 21 (vermell), X (verd) i Y (blau)

No es van observar diferències interindividuais en les freqüències de disomia i diploïdia en els pares de nens amb la síndrome de Klinefelter d'origen matern. En canvi, en el

grup de pares d'origen patern es van trobar diferències interindividuais per a la disomia XY (Taula 7).

**Taula 7.** Anomalies numèriques en espermatozoides de pares de nens/avortaments amb la síndrome de Klinefelter

	Pares	Edat	Disomia (%)							Diploïdia (%)	
			6	13	18	21	22	XX	YY		XY
SK d'origen matern	C02	33	0.03	0.05	0.02	0.04	0.03	0.08	0.05	0.19	0.16
	C03	38	0.01	0.06	0.04	0.24	0.05	0.08	0.06	0.23	0.18
	C04	40	0.03	0.04	0.03	0.16	0.05	0.10	0.04	0.33	0.26
	C05	41	0.07	0.06	0.04	0.46	0.02	0.09	0.12	0.26	0.22
	C01	42	0.10	0.05	0.03	0.33	0.02	0.12	0.04	0.34	0.20
	C07	47	0.06	0.05	0.03	0.27	0.03	0.08	0.08	0.37	0.21
	C06	48	0.05	0.05	0.03	0.40	0.04	0.14	0.07	0.19	0.20
	C08	58	0.03	0.08	0.04	0.17	0.07	0.06	0.08	0.29	0.15
	Mitjana	43.4	0.05	0.05	0.03	0.27	0.04	0.09	0.07	0.27	0.17
SK d'origen patern	C09	34	0.07	0.07	0.04	0.16	0.03	0.07	0.08	0.24	0.11
	C10	37	0.05	0.08	0.06	0.10	0.04	0.08	0.07	0.34	0.12
	C11	44	0.04	0.05	0.04	0.16	0.05	0.07	0.06	0.19	0.10
	C12	44	0.03	0.06	0.04	0.08	0.07	0.04	0.05	0.44 <sup>b</sup>	0.11
	C13	45	0.03	0.06	0.08	0.16	0.07	0.04	0.02	0.16	0.08
	C14	53	0.04	0.05	0.05	0.10	0.02	0.04	0.07	0.45 <sup>a</sup>	0.09
	C15	55	0.07	0.15	0.15 <sup>a</sup>	0.06	0.04	0.11	0.07	0.87 <sup>a</sup>	0.40 <sup>b</sup>
	C16	58	0.08	0.08	0.05	0.16	0.04	0.04	0.04	0.45 <sup>a</sup>	0.10
	C17	59	0.04	0.12	0.08	0.22	0.10	0.07	0.04	1.47 <sup>a</sup>	0.19
Mitjana	47.7	0.05	0.08	0.07	0.13	0.05	0.06	0.06	0.51 <sup>a</sup>	0.16	
anell	C18 <sup>d</sup>	33	0.25 <sup>c</sup>	0.50 <sup>c</sup>	0.25 <sup>c</sup>	0.85 <sup>c</sup>	0.45 <sup>c</sup>	0.22 <sup>c</sup>	0.06	9.32 <sup>c</sup>	0.83 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Freqüència incrementada significativament ( $p < 0.05$ ) respecte del grup d'origen matern

<sup>b</sup> Freqüència que tendeix a la significància ( $p = 0.06$ ) respecte del grup d'origen matern

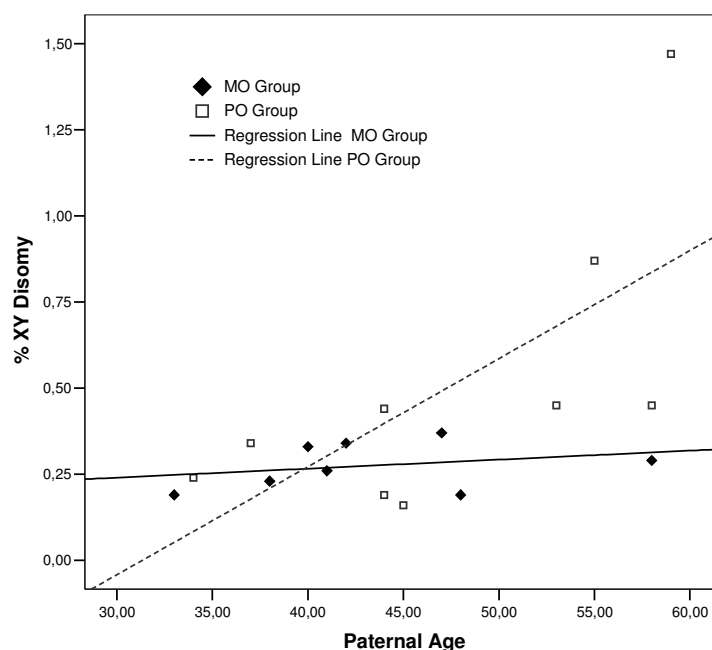
<sup>c</sup> Freqüència incrementada significativament ( $p < 0.001$ ) respecte del grup d'origen matern

<sup>d</sup> Individu amb cariotip 46,X,r(Y)/45,X

En 4 individus estudiats (C14, C15, C16 i C17) la freqüència de disomia XY era major respecte del grup control ( $p < 0.05$ ), mentre que en un individu (C12) aquesta freqüència

tendia a la significància ( $p=0.06$ ). En un dels casos (C15) es va observar un increment significatiu de disomia XY, així com de disomia 18 i de diploïdia, respecte del grup matern ( $p<0.05$ ). La relació entre espermatozoides 23,X i 23,Y va ser 1:1 en tots els casos.

L'individu amb un cromosoma en anell (C18) presentava un increment estadísticament significatiu ( $p<0.001$ ) de disomia per als cromosomes 6, 13, 18, 21, 22, XX, XY i de diploïdia, respecte de la mitjana del grup control. Aquest individu no va ser inclòs en l'estudi de sèries de parets Klinefelter degut a què la presència d'un cromosoma Y en anell en el seu cariotip podia ser el causant de les alteracions numèriques observades en els seus espermatozoides. En aquest individu, el percentatge d'espermatozoides 23,X (58.34%) era estadísticament superior ( $p<0.05$ ) al dels espermatozoides 23,Y (41.66%). Per a determinar si hi havia correlació entre l'edat paterna i la freqüència de disomia XY tant en el grup d'origen matern com el grup d'origen patern, es van analitzar les rectes de regressió per als dos grups (veure Figura 9).



**Figura 9.** Recta de regressió entre edat paterna i percentatge de disomia XY per als pares de fills/avortaments amb la síndrome de Klinefelter d'origen matern (MO group) i d'origen patern (PO group)

Tal i com es veu a la figura 9, en el grup d'origen matern la pendent de la recta de regressió entre edat paterna i percentatge de disomia XY en els pares amb descendència Klinefelter tendeix a zero ( $p=0.49$ ), mentre que en el grup d'origen patern la pendent és 0.031, diferent significativament de zero ( $p<0.05$ ). Això significa que la freqüència de disomia XY incrementa en el grup d'origen patern mentre que no s'observa un efecte de l'edat per a la disomia XY en el grup d'origen matern.

### 3.3. Anàlisi citogenètic i molecular en cèl·lules somàtiques en la família r(Y)

Es van analitzar un total de 2.628 cèl·lules amb les tècniques de bandes G o de FISH multicolor (veure Taula 3) en pare i fill. D'aquestes, es van estudiar 1.490 limfòcits en interfase o en metafase (analitzant un mínim de 100 metafases i de 500 interfases per individu) i 1.138 cèl·lules de la mucosa bucal en interfase per a determinar el percentatge de cada línia cel·lular en cada fase del cicle cel·lular i en cada teixit analitzat (Figura 10 i Taula 8).



**Figura 10.** (a) Cariotip parcial mostrant els cromosomes sexuals en pare i fill amb un cromosoma Y en anell (b) FISH multicolor en una cèl·lula 46,X,r(Y) de la mucosa bucal del pare amb senyals per als cromosomes 6 (groc), X (verd) i Y (vermell)

Amb la tècnica de bandes G es van detectar dues línies cel·lulars en cada individu, determinant que el cariotip del pare era 46,X,r(Y)[74]/45,X[30] i el del fill

47,XX,r(Y)[82]/46,XX[25]; ambdós casos amb un percentatge similar per a la línia cel·lular resultant de la pèrdua de l'anell.

Al comparar en limfòcits la freqüència de cada línia cel·lular segons la fase del cicle estudiada (veure Taula 8), es van trobar diferències estadísticament significatives (pare  $p < 0.005$  i fill  $p < 0.05$ ). En el fill també es van observar diferències significatives en el percentatge de cada línia cel·lular, dependent del teixit analitzat ( $p < 0.05$ ) i un increment en

**Taula 8.** Comportament mitòtic del r(Y) en el pare i el seu fill amb la síndrome de Klinefelter

Fase cel·lular	Tècnica	Pare			Fill		
		Nº cèl·lules	Línia 46,X,r(Y)	Línia 45,X	Nº cèl·lules	Línia 47,XX,r(Y)	Línia 46,XX
<i>Metafases</i>							
Limfòcits	Bandes G	110	67.3	27.3	110	74.6	22.7
Limfòcits	FISH	114	71.9	25.4 <sup>a</sup>	112	69.6	29.5 <sup>a</sup>
<i>Interfases</i>							
Limfòcits	FISH	520	86.9	12.3	524	78.4	20.0 <sup>b,c</sup>
Mucosa bucal	FISH	540	84.4	13.0	598	84.6	13.0

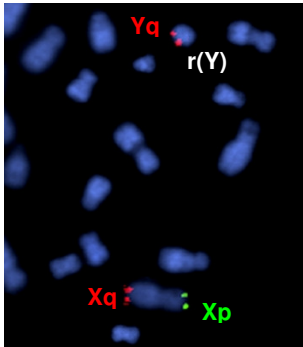
<sup>a</sup> Freqüència incrementada ( $p < 0.05$ ) en metafases respecte d'interfases en el mateix individu

<sup>b</sup> Freqüència incrementada ( $p < 0.05$ ) en limfòcits respecte de cèl·lules de la mucosa bucal en el fill

<sup>c</sup> Freqüència incrementada ( $p < 0.05$ ) en limfòcits del fill respecte del pare

la pèrdua de l'anell en limfòcits interfàsics respecte del pare ( $p < 0.05$ ). Per altra banda, es van detectar 8 metafases amb un anell dicèntric (5 en el pare i 3 en el fill) en limfòcits analitzats per FISH.

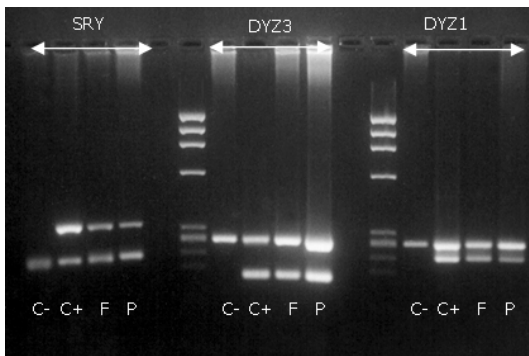
La tècnica de FISH amb sondes subtelomèriques específiques per als cromosomes sexuals va posar de manifest la presència del subtelòmer Yq i l'absència del subtelòmer Yp en el cromosoma en anell, tant en el pare com en el fill (Figura 11).



**Figura 11.** Metafase parcial d'un limfòcit procedent del pare amb un r(Y) amb marcatge de les regions subtelmèriques de Xp/Yp (verd) i Xq/Yq (vermell)

### 3.4. Anàlisi de delecions en el cromosoma Y en anell

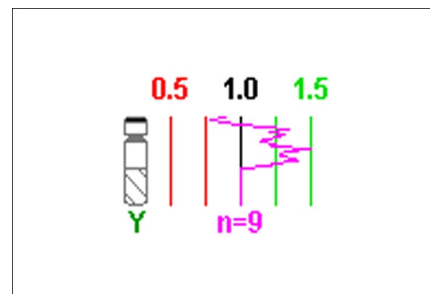
L'amplificació del gen SRY i dels marcadors DYZ3 i DYZ1 del cromosoma Y en el pare i en el fill, mitjançant PCR, indiquen que aquestes regions estan presents en el cromosoma Y en anell (Figura 12).



**Figura 12.** Amplificació del gen SRY i dels marcadors DYZ3 i DYZ1 del cromosoma Y en pare i fill en gel d'agarosa (C: control, F: fill i P: pare)

L'anàlisi del cromosoma en anell utilitzant la tècnica de CGH indica la presència de la regió entre Yp11.3 i Yq11.2 (Figura 13).

**Figura 13.** Perfil de la CGH del cromosoma Y en anell



## **4. DISCUSSIÓ**





En aquest treball s'han analitzat les freqüències de disomia per als cromosomes sexuals i per als autosomes 6, 13, 18, 21 i 22 en caps d'espermatozoides descondensats de pares amb descendència Klinefelter d'origen patern. El nostre objectiu era determinar si la freqüència de disomia per a aquests cromosomes es troba incrementada en el grup patern respecte del grup matern. Donat que un dels pares del grup d'origen patern i el seu fill amb la síndrome de Klinefelter presentaven un cromosoma Y en anell al seu cariotip somàtic, es va ampliar l'estudi en aquesta família per a conèixer el comportament mitòtic i meiótic del anell, així com el seu mecanisme de formació. Per al nostre coneixement, aquest és el primer cas descrit de transmissió natural d'un cromosoma Y en anell a la descendència.

#### **4.1. Origen patern de la síndrome de Klinefelter**

L'anàlisi per PCR de l'origen parental en les 18 famílies estudiades indiquen que en un 56% dels casos el cromosoma X addicional és d'origen patern; és a dir, producte de la fecundació d'un oòcit normal per un espermatozoide disòmic XY originat per una no disjunció en meiosi I durant l'espermatogènesi. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en altres sèries similars en les que el percentatge de casos 47,XXY d'origen patern oscil·la entre el 46 i el 50% (Jacobs i col, 1988; Hassold i col, 1991; Lorda-Sánchez i col, 1992; Thomas and Hassold, 2003).

#### **4.2. Increment de disomia XY en espermatozoides de pares amb descendència Klinefelter d'origen patern.**

El grup de pares d'origen patern presenta freqüències de disomia XY incrementades respecte del grup d'origen matern ( $p < 0.05$ ). Altres autors han descrit un increment similar en la freqüència d'espermatozoides disòmics per al cromosoma implicat en l'aneuploidia en pares amb descendència afectada de la síndrome de Down o de Turner d'origen patern (Blanco i col, 1998; Martínez-Pasarell i col, 1999; Tang i col, 2004). No obstant, un estudi similar en pares de nens amb la síndrome de Klinefelter no descriu un increment

de disomia XY en els pares del grup d'origen patern respecte dels d'origen matern (Eskenazi i col, 2002).

Els cromosomes sexuals X i Y són els més susceptibles a la no disjunció en la meiosi masculina degut a l'existència d'un únic quiasma a la regió pseudoautosòmica PAR1 (Hassold i col, 1991; Thomas i col, 2000; revisat per Thomas and Hassold, 2003; Martin i col, 2005). A més, en pares d'individus amb la síndrome de Klinefelter d'origen patern, s'ha observat una clara associació entre absència de recombinació i no disjunció del parell XY en meiosi (Hassold i col, 1991; Lorda-Sánchez i col, 1992; Thomas i col, 2000). Malgrat que la freqüència de disomia XY en els espermatozoides del grup de pares d'origen patern és significativament major que la freqüència observada en el grup d'origen matern, l'increment és baix (0.51% vs. 0.27%) i semblaria no tenir implicacions clíniques. No obstant, baixos increments en la freqüència d'aneuploïdia en espermatozoides s'han relacionat amb descendència aneuploide o avortaments de repetició (Moosani i col, 1999; Rubio i col, 1999; Tang i col, 2004). Moosani i col (1999) van descriure un individu infèril amb una freqüència de disomia XY clínicament baixa (1.39%) però molt superior a la del grup control (0.16) que va donar lloc a una gestació 47,XXY després d'un cicle de reproducció assistida. Més recentment, s'ha descrit un cas similar amb un avortament espontani amb cariotip 45,X d'origen patern després d'un cicle de reproducció assistida (ICSI) en una parella en la que el percentatge de disomia XY (18.6%) i de nul·lisomia dels cromosomes sexuals (19.6%) en els espermatozoides del pare era molt superior al de la població control (Tang i col, 2004). També s'ha descrit un efecte similar en parelles amb avortaments de repetició, on es va observar un increment de disomia dels cromosomes sexuals (mitjana 0.84%) respecte del grup control (0.37%) (Rubio i col, 1999). L'existència d'aquests casos suggereix la necessitat d'analitzar les freqüències de disomia en els espermatozoides d'individus que se sotmeten a un cicle de reproducció assistida (Aran i col, 1999).

Els nostres resultats indiquen que la susceptibilitat a la no disjunció meiótica en els pares amb descendència Klinefelter d'origen patern està restringida al parell cromosòmic XY, i per tant, aquests individus no semblen tenir incrementat el risc de tenir fills o avortaments afectats d'aneuploïdies per als autosomes analitzats (6, 13, 18, 21 i 22). Aquest estudi no sembla corroborar l'existència d'una tendència generalitzada a la no disjunció en pares amb descendència aneuploide, tal i com va descriure Soares i col (2001a,b) en casos amb la síndrome de Down o Turner d'origen patern (veure Taula 9). En les sèries de

pares analitzades fins al moment, el nombre d'individus estudiats és baix (veure Taula 9) degut, principalment, al baix percentatge d'origen patern d'algunes d'aquestes síndromes i a la no donació de mostra de semen d'alguns pares seleccionats. Una altra explicació per a

**Taula 9.** Alteracions cromosòmiques numèriques en espermatozoides de pares amb descendència aneuploide d'origen patern.

	nº casos	Disomia									Diploïdia
		4	6	13	18	21	22	XX	YY	XY	
Pares de Down <sup>a</sup>	2	-	-	*	-	*	*	-	-	*	*
Pares de Turner <sup>b</sup>	4	-	-	◇	-	◇	◇	-	-	*	-
Pares de Klinefelter <sup>c</sup>	9	NA	-	-	-	-	-	-	-	*	-

- \* Increment estadísticament significatiu respecte d'individus control (p<0.05)
- ◇ Increment que tendeix a la significància (p<0.09) respecte d'individus control
- <sup>a</sup> Blanco i col, 1998; Soares i col, 2001a
- <sup>b</sup> Martínez-Pasarell i col, 1999b; Soares i col, 2001b
- <sup>c</sup> Present treball (Arnedo i col, 2006)
- NA No analitzat
- Increment estadísticament no significatiu respecte d'individus control (p>0.05)

les diferències observades seria l'heterogeneïtat existent en la població general, descrita en la majoria d'estudis de FISH en caps d'espermatozoides (revisat per Templado i col, 2005). De fet, s'ha descrit, un alt percentatge (27%) de no recombinació en el bivalent sexual en un individu de la població general amb espermatogènesi normal (Sun i col, 2004). Per tant, els pares amb descendència Klinefelter d'origen patern podrien ser individus de la població general, similars a l'individu estudiat per Sun i col (2004), amb un baix risc de tenir un fill aneuploide. De totes maneres, no es pot descartar que aquests individus tinguin un major increment de disomia sexual que els individus de la població general i que aquest increment estigui infravalorat degut als estrictes criteris de recompte utilitzats en la tècnica de FISH multicolor. Aquesta darrera possibilitat estaria avalada per

l'existència d'individus amb un baix increment de disomia i amb descendència o avortaments aneuploides, esmentats anteriorment (Moosani i col, 1999; Rubio i col, 1999; Tang i col, 2004).

### **Efecte de l'edat paterna en la disomia XY**

Al comparar la freqüència de disomia XY amb l'edat dels pares d'origen patern i matern, només s'ha observat un increment de disomia XY, en relació a l'edat, en els pares del grup d'origen patern. En la única sèrie d'individus amb descendència Klinefelter estudiada fins al moment (Lowe i col, 2001; Eskenazi i col, 2002), es va descriure una major freqüència d'espermatozoides disòmics XY associat a l'edat paterna, però aquest increment afectava tant al grup de pares d'origen patern com al d'origen matern. Donat que la mitjana d'edats paternes en els dos estudis és similar (42.4 en el nostre estudi vs. 45.0), les diferències entre ambdós resultats podrien ser degudes a l'heterogeneïtat observada en la població general (revisat per Templado i col, 2005). No obstant, els nostres resultats coincideixen amb els estudis somàtics en pares amb descendència Klinefelter d'origen patern (Lorda-Sánchez i col, 1992) en els que s'ha observat una baixa taxa de recombinació associada a edat paterna avançada.

S'ha descrit un increment de disomia sexual amb l'edat en espermatozoides d'individus de la població general (Robbins i col, 1995; Griffin i col, 1995; Martin i col, 1995; Bosch i col, 2001; revisat per Templado i col, 2005; revisat per Buwe i col, 2005). Aquest increment no s'ha observat en els pares del grup d'origen matern del present treball probablement degut a què les edats estan entre els 33 i els 58 anys (mitjana 43.4), mentre que els estudis que troben un efecte de l'edat en la població general comencen a observar-lo en individus majors de 50 anys (Griffin i col, 1995).

L'increment de disomia XY amb l'edat podria estar relacionada amb les disfuncions que s'han descrit del centròmer del cromosoma X depenents de l'edat (Asada i col, 2000). Si en el grup de pares d'origen patern ja es detecta un increment de disomia XY significatiu en edats no tan avançades (34-59 anys), aquestes freqüències tendrien a incrementar amb els anys, ja que s'ha descrit un increment lineal de disomia XY i de diploïdia amb l'edat paterna en espermatozoides d'individus de la població general (Bosch i col, 2001). Tot i això, és necessari realitzar més estudis per a confirmar aquest efecte de l'edat en pares amb descendència Klinefelter d'origen patern ja que, fins al moment, només s'han

analitzat dues sèries diferents: la present i la esmentada anteriorment (Lowe i col, 2001; Eskenazi i col, 2002).

### 4.3. Comportament mitòtic del cromosoma Y en anell

El comportament mitòtic del cromosoma Y en anell és similar en el pare (46,X,r(Y)/45,X) i en el fill amb la síndrome de Klinefelter (47,XX,r(Y)/46,XX). Ambdós presenten una segona línia cel·lular producte de la pèrdua de l'anell, amb un percentatge que oscil·la entre el 12% i el 20% tant en el pare com en el fill. Aquests valors estan dins els percentatges descrits per altres autors en estudis similars (entre un 5% i un 85%) (Chandley and Edmond, 1971; Maeda i col, 1976; Taillemite i col, 1978; Steinbach i col, 1979; Kosztolányi i col, 1988; Micic i col, 1990; Wegner i col, 1992; Henegariu i col, 1997a; Bofinger i col, 1999; Tzancheva i col, 1999; Blanco i col, 2003). S'ha descrit que el fenotip i la fertilitat dels individus portadors d'un cromosoma Y en anell depèn, principalment, del percentatge de cèl·lules aneuploides (Wegner i col, 1992; Pezzolo i col, 1993a; Hsu i col, 1994; Henegariu i col, 1997a; Tzancheva i col, 1999). Això explicaria, en part, el fenotip normal i la fertilitat provada en el pare. Tant en el pare com en el fill s'observa una major pèrdua del r(Y) en limfòcits a l'estadi de metafase que a l'estadi d'interfase ( $p < 0.05$ ), probablement degut a la pèrdua artefactual de cromosomes durant l'obtenció de les extensions de metafases (Márquez i col, 1996).

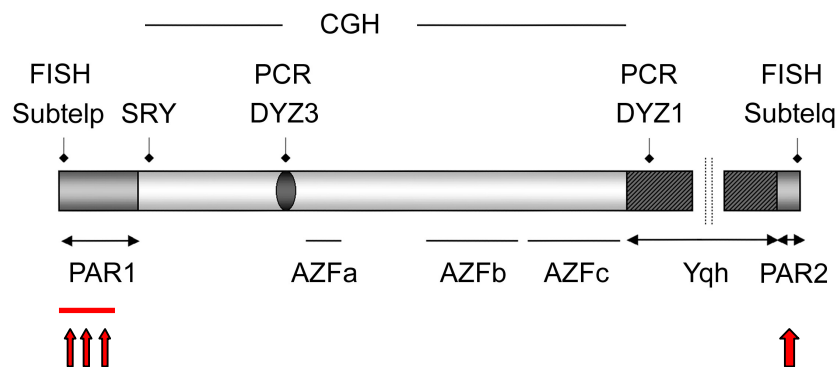
Malgrat la similitud en el comportament mitòtic de l'anell en ambdòs casos, hi ha dues petites diferències a remarcar. La primera és una major pèrdua del cromosoma r(Y) en limfòcits interfàsics en el fill ( $p < 0.05$ ) respecte del pare. Aquesta major pèrdua de l'anell en el fill podria explicar-se per una major inestabilitat mitòtica del r(Y), degut a la presència de dos cromosomes X en el seu cariotip (47,XX,r(Y)/46,XX). La segona diferència és que el percentatge de la línia 46,XX en el fill és diferent en els dos teixits estudiats (sang perifèrica i mucosa bucal), tal i com era d'esperar degut a la inestabilitat mitòtica de l'anell. Altres autors també han observat aquestes diferències en un individu amb un cromosoma Y en anell (Henegariu i col, 1997a).

La freqüència d'anells dicèntrics observada en pare i fill (0.89-4.5%), es troba en el rang més baix dels valors descrits en la bibliografia per al cromosoma Y (1.3-18%) (Chandley i

Edmond, 1971; Kosztolányi i col, 1988; Micic i col, 1990; Blanco i col, 2003). Aquest fet indicaria un menor nombre d'intercanvis de cromàtides germanes (SCEs) i una baixa inestabilitat del r(Y) en mitosi en els nostres casos.

#### 4.4. Mecanisme de formació del cromosoma Y en anell

Per a determinar el mecanisme de formació de l'anell i estudiar les regions delecionades en el r(Y) en pare i fill, es van realitzar estudis mitjançant les tècniques de PCR, FISH i CGH. Els resultats obtinguts han demostrat la presència en el cromosoma Y de les regions compreses entre Yp11.3 (per sobre del gen SRY) i el subtèlòmer Yq (ambdues incloses) (Figura 14).



**Figura 14.** Mapa del cromosoma Y amb la localització dels gens i els marcadors presents en el r(Y) estudiat en el present treball, així com les tècniques utilitzades per a la seva detecció. Les fletxes indiquen el punt de trencament al braç llarg i els possibles punts de trencament al braç curt que donarien lloc a la formació del r(Y).

El gen SHOX/PHOG, localitzat en la regió PAR1 del braç Yp (a Yp11.3, pròxim al gen SRY) està relacionat amb la diferenciació i maduració dels condrocits i, per tant, l'absència d'aquest gen donaria lloc a una talla baixa i un mal desenvolupament ossi

(revisat per Blaschke i Rappold, 2006). En el nostre cas, l'estatura del pare (169 cm) i del fill (72 cm; 12 mesos d'edat) era normal dins de la seva família, suggerint que el material genètic perdut durant la formació de l'anell no inclou el locus SHOX/PHOG. Per tant, el mecanisme de formació del r(Y) implicaria una pèrdua parcial de la regió PAR1, en comptes d'una pèrdua total.

La formació del cromosoma Y en anell, en el nostre cas, podria ser explicat per dos mecanismes diferents. El primer, seria el model més freqüentment descrit (Micic i col, 1990; Wegner i col, 1992; McGinnis i col, 1992; Pezzolo i col, 1993b; Conte i col, 1995; Sigurdardottir i col, 1999; Tzancheva i col, 1999) i implicaria una deleció terminal a cada braç del cromosoma i posterior fusió dels extrems lliures resultants. Un trencament estaria localitzat al final del braç Yq (entre la regió subtelomèrica i el telòmer) i l'altre estaria localitzat entre Yp11.3 i la regió subtelomèrica del braç Yp. El segon mecanisme possible, descrit posteriorment (Henegariu i col, 1997a), implicaria un únic trencament en el braç Yp (en la regió esmentada anteriorment) i la posterior fusió de l'extrem lliure amb la regió subtelomèrica o telomèrica del braç Yq.

#### **4.5. Segregació meiótica del cromosoma Y en anell en espermatozoides**

Per a determinar si la presència d'un cromosoma Y en anell altera la segregació meiótica d'altres cromosomes, es van analitzar les freqüències d'anomalies numèriques en espermatozoides del pare, mitjançant FISH multicolor. Aquest individu presentava un increment estadísticament significatiu en el percentatge de diploïdia i de disomia de tots els cromosomes analitzats (6, 13, 18, 21, 22, X i Y), respecte dels pares del grup d'origen matern (grup control), excepte per a la disomia YY. En l'únic estudi similar, realitzat en un individu amb un cromosoma Y en anell i cariotip 45,X/46,X,r(Y)/46,X,dic r(Y) també es va observar un increment en la freqüència de disomia XY i disomia 21 (Blanco i col, 2003). L'increment de disomia XY observada en el pare es podria explicar per la pèrdua parcial de la regió PAR1 durant el procés de formació del cromosoma Y en anell que dificultaria l'aparellament entre els cromosomes sexuals. Estudis citogenètics clàssics de la meiosi en tres individus amb un r(Y), ja han demostrat que un 80-100% dels espermatozoides presenten els cromosomes sexuals desaparellats (Chandley i Edmon, 1971; Micic i col,

1990; Blanco i col, 2003). La manca d'aparellament i, per tant, l'absència de recombinació entre els cromosomes X i Y explicaria, en aquest cas, l'alt percentatge de disomia XY (9.32% versus 0.27% en controls) ( $p < 0.005$ ) i l'origen patern de la síndrome de Klinefelter en el seu fill.

L'elevada freqüència de disomia observada per als autosomes analitzats i per a la disomia XX en espermatozoides del pare podria ser producte d'una tendència generalitzada a la no disjunció meiótica en aquest individu degut a la presència del r(Y) en el seu cariotip. Blanco i col (2003) també van observar un increment en les freqüències de diploïdia i de disomia per al cromosoma 21, a més de per a la disomia XY. La presència d'un cromosoma en anell podria donar lloc a errors en la segregació en altres cromosomes degut a "problemes mecànics" (Flatters i col, 1995) o a la presència d'un bivalent desaparellat (Chandley i Edmond, 1971; Roeder, 1997). En un treball publicat recentment (Codina-Pascual i col, 2005), mitjançant l'anàlisi de la sinapsi i de la recombinació meiótica en individus infèrtils, es relaciona l'aparellament i recombinació dels cromosomes sexuals amb la de la resta de cromosomes. Segons aquests autors, la recombinació del parell XY seria un bon indicador de la freqüència general de recombinació.

De tots els cromosomes analitzats, l'únic que no presenta un increment de disomia és el cromosoma Y. Aquesta absència de disomia YY podria ser conseqüència dels estrictes criteris de recompte i del tipus de sonda utilitzada (Y-SatIII, corresponent a la regió heterocromàtica del cromosoma Y) que infravaloraria la freqüència de disomia YY. Una altra possibilitat seria que el cromosoma Y en anell s'hagués perdut durant la meiosi. De fet, està descrit que la inestabilitat d'un cromosoma en anell pot ser major en cèl·lules meiótiques que en cèl·lules somàtiques (Siffroi i col, 2000). Per tant, i com era d'esperar, aquest individu presenta una desviació significativa de la ràtio sexual 1:1 (58.34 vs. 41.66). Tenint en compte que aquest individu presenta una segona línia cel·lular 45,X0 (12.3%) no pot descartar-se que les cèl·lules monosòmiques entrin en meiosi donant lloc a espermatozoides 23,X o 22,0, alterant la ràtio 1:1, disminuint el número d'espermatozoides 23,Y. Malgrat tot, alguns autors han descartat la possibilitat que les cèl·lules 45,X0 entrin en meiosi (Levy i col, 1986; Newberg i col, 1998; Blanco i col, 2003).



#### 4.6. Cromosoma Y en anell i fertilitat masculina

Fins al moment, tots els individus analitzats amb un  $r(Y)$  han estat pacients infèrtils (Chandley i Edmond, 1971; Maeda i col, 1976; Kozma i col, 1988; Micic i col, 1990; Tzancheva i col, 1999; Blanco i col, 2003). Les possibles causes d'infertilitat en pacients amb un cromosoma Y en anell en el seu cariotip són la deleció de gens del cromosoma Y, la presència d'una línia cel·lular 45,X o la no disjunció meiótica dels cromosomes sexuals (Miller and Therman, 2001). Segons el nostre coneixement, aquest és el primer cas descrit de transmissió d'un cromosoma Y en anell a la descendència. L'únic cas de transmissió d'un  $r(Y)$  (Bofinger i col, 1999), d'un pare amb cariotip 46,X, $r(Y)$ /45,X al seu fill, va ser mitjançant la tècnica d'ICSI degut a l'oligozoospermia severa present en el pare. Desafortunadament, en aquest article no es van analitzar les anomalies numèriques en espermatozoides del pare ni les regions delecionades durant el procés de formació del cromosoma en anell. Probablement, el pare del nostre treball també hauria estat derivat a un centre de reproducció assistida si s'hagués detectat la seva oligozoospermia.

La fertilitat i el fenotip masculí normal del pare s'explicaria per la presència dels gens SRY i SHOX (no demostrada, deduïda per l'alçada del pare) al braç curt del cromosoma Y en anell, per la integritat del braç llarg i per la baixa proporció de cèl·lules 45,X. Malgrat la integritat del braç  $Yq$ , que conté les regions AZF que controlen l'espermatogènesi (regions AZFa, AZFb i AZFc) (revisat per Foresta i col, 2001; Lahn i col, 2001), el pare presenta oligozoospermia moderada que podria ser deguda al bloqueig meiótic dels espermatòcits primaris X0 (Chandley i Edmond, 1971; Micic i col, 1990; Blanco i col, 2003). La correlació entre la manca d'aparellament en meiosi i el bloqueig de l'espermatogènesi ja s'havia descrit anteriorment (Miklos, 1974).

La freqüència total d'anomalies numèriques en espermatozoides del pare era 10 vegades major que l'observada en els individus control (12.7% versus 1.1%), tenint en compte només les anomalies numèriques dels cromosomes sexuals i dels cinc autosomes analitzats. És a dir, existeix la possibilitat que el risc a la descendència en el pare amb un cromosoma Y en anell fos encara major si s'analitzessin més cromosomes. Tot i així seran necessaris més estudis per a poder establir el risc existent en individus fèrtils portadors d'un cromosoma en anell.

## **5. CONCLUSIONS**



- Els pares amb descendència Klinefelter d'origen patern presenten un increment de disomia XY en els seus espermatozoides respecte a la població general.
- El increment de disomia XY observat en espermatozoides de pares amb descendència Klinefelter està associat a l'edat paterna avançada.
- No s'ha observat un increment de la no disjunció per a cap dels autosomes (cromosomes 6, 13, 18, 21 i 22) analitzats en aquests individus.
- Un cromosoma Y en anell amb pèrdua parcial de la regió PAR1 pot ser transmès de manera natural, presentant un comportament mitòtic similar en la descendència.
- La presència d'un cromosoma Y en anell incrementa el risc de descendència amb anomalies numèriques del parell sexual i d'altres cromosomes no implicats en la reorganització cromosòmica.
- L'augment d'aneuploidies en els espermatozoides de l'individu amb un cromosoma Y en anell seria degut a la manca d'aparellament del bivalent sexual i a un possible efecte intercromosòmic.

## **6. BIBLIOGRAFIA**

**A**

Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, Egozcue J and 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 (4),696-701.

Arnedo N, Nogués C, Bosch M and Templado C (2005) Mitotic and meiotic behaviour of a naturally transmitted ring Y chromosome: reproductive risk evaluation. *Hum Reprod* 20,462-468.

Arnedo N, Templado C, Sánchez-Blanque Y, Rajmil O and Nogués C (2006) Sperm aneuploidy in fathers of Klinefelter's syndrome offspring assessed by multicolour fluorescent *in situ* hybridization using probes for chromosomes 6, 13, 18, 21, 22, X and Y. *Hum Reprod* 21(2),524-528.

Asada H, Sueoka K, Hashiba T, Kuroshima M, Kobayashi N and Yoshimura Y (2000) The effects of age and abnormal sperm count on the nondisjunction of spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 17,51-59.

**B**

Back E, Voiculescu I, Brünger M and Wolff G (1989) Familial ring (20) chromosomal mosaicism. *Hum Genet* 83,148-154.

Blanco J, Gabau E, Gómez D, Baena N, Guitart M, Egozcue J and 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.

Blanco J, Farreras A, Egozcue J and Vidal F (2003) Meiotic behaviour of the sex chromosomes in a 45,X/46,X,r(Y)/46,X,dic r(Y) patient assessed by FISH. *Fertil Steril* 79,913-918.

Blaschke RJ and Rappold G (2006) The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Curr Opin Genet Dev* 16,233-239.

Bofinger MK, Needham DF, Saldana LR, Sosnowski JP and Blough RI (1999) 45,X/46,X,r(Y) karyotype transmitted by father to son after intracytoplasmic sperm injection for oligospermia. A case report. *J Reprod Med* 44,645-648.

Bosch M, Rajmil O, Martínez-Pasarell O, Egozcue J and Templado C (2001) Linear increase of diploidy in human sperm with age: a four-colour FISH study. *Eur J Hum Genet* 9,533-538.

Bosch M, Rajmil O, Egozcue J and Templado C (2003) Linear increase of structural and numerical chromosome 9 abnormalities in human sperm regarding age. *Eur J Hum Genet* 11,754-759.

Buwe A, Guttenbach M and Schmid S (2005) Effect of paternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 111,213-228.

## C

Carothers AD, Collyer S, De Mey R and Johnstone I (1984) An aetiological study of 290 XXY males, with special reference to the role of paternal age. *Hum Genet* 68,248-253.

Chandley AC and Edmon P (1971) Meiotic studies on a subfertile patient with a ring Y chromosome. *Cytogenetics* 10,295-304.

Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Campillo M, Garcia F, Egozcue S, Abad C, Egozcue J and Benet J (2005) Synapsis and meiotic recombination analyses:MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum Reprod* 20(8),2133-2139.

Conte RA, Luke S and Verma RS (1995) Characterization of a ring chromosome 21 by FISH-technique. *Clin Genet* 48,188-191.

Coté GB, Katsantoni A and Deligeorgis D (1981) The cytogenetic and clinical implications of a ring chromosome 2. *Ann Genet* 24,231-235.

## D

Daniel A (1985) Y chromosome and rings. In Sandberg AA (ed.) *The Y Chromosome. Part B: Clinical Aspects of Y Chromosome Abnormalities*. Alan R Liss, New York, pp. 105-135.

Downie SE, Flaherty SP, Swann NJ and Matthews CD (1997) Estimation of aneuploidy for chromosomes 3, 7, 16, X and Y in spermatozoa from 10 normospermic men using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 3(9),815-819.

## E

Egozcue J, Blanco J and Vidal F (1997) Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 3(5),441-452.

Eskenazi B, Wyrobek AJ, Kidd SA, Lowe X, Moore II D, Weisiger K and Aylstock M (2002) Sperm aneuploidy in fathers of children with paternally and maternally inherited Klinefelter syndrome. *Hum Reprod* 17,576-583.

## F

Flatters M, Maxfield R and Dawson D (1995) The effects of a ring chromosome on the meiotic segregation of other chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 249,309-316.

Foresta C, Moro E and Ferlin A (2001) Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *End Rev* 22,226-239.

## G

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

Guttenbach M, Schakowski R and Schmid M (1994) Incidence of chromosome 3, 7, 10, 11, 17 and X disomy in mature human sperm nuclei as determined by nonradioactive in situ hybridization. *Hum Genet* 93(1),7-12.

Guttenbach M, Kohn FM, Engel W and Schmid M (2000) Meiotic nondisjunction of chromosomes 1, 17, 18, X and Y in men more than 80 years of age. *Biol Reprod* 63(6),1727-1729.

## H

Hall H, Hunt P and Hassold T (2006) Meiosis and sex chromosome aneuploidy: how meiotic errors cause aneuploidy; how aneuploidy causes meiotic errors. *Curr Opin Genet Dev* 16,323-329.



Hassold T and Jacobs P (1984) Trisomy in man. *Annu Rev Genet* 18,69-97.

Hassold T, Sherman SL, Pettay D, Page DC and Jacobs P (1991) XY-chromosome nondisjunction in man is associated with diminished recombination in the pseudoautosomal region. *Am J Hum Genet* 49,253-260.

Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J and Zaragoza M (1996) Human aneuploidy: Incidence, origin and etiology. *Env Mol Mut* 28,167-175.

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

Henegariu O, Kernek S, Keating MA and Palmer CG (1997a) PCR and FISH analysis of a ring Y chromosome. *Am J Med Genet* 69,171-176.

Henegariu O, Pescovitz OH, Vance GH, Verbrugge J and Heerema NA (1997b) A case with mosaic di-, tetra-, and octacentric ring Y chromosomes. *Am J Med Genet* 71,426-429.

Hernando C, Carrera M, Ribas I, Parear N, Baraibar R, Egozcue J and Fuster C (2002) Prenatal and postnatal characterization of Y chromosome structural anomalies by molecular cytogenetic analysis. *Prenat Diagn* 22,802-805.

Hertz JM (1987) Familial transmission of a ring chromosome 21. *Clin Genet* 32, 35-39.

Hsu LYF (1994) Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am J Med Genet* 53,108-140.

## J

Jacobs PA (1981) Mutation rates of structural chromosome rearrangements in man. *Am J Hum Genet* 33,44-54.

Jacobs PA, Hassold TJ, Whittington E, Butler G, Collyer S, Keston M and Lee M (1988) Klinefelter's syndrome: an analysis of the origin of the additional sex chromosome using molecular probes. *Ann Hum Genet* 52,93-109.

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

Jacobs PA, Dalton P, James R, Moose K, Power M, Robinson D and Skuse D (1997) Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. *Ann Hum Genet* 61,471-483.

## K

Kennerknecht I, Barbi G and Vogel W (1990) Maternal transmission of ring chromosome 21. *Hum Genet* 86,99-101.

Klinefelter HF, Reifenstein EC and Albright F (1942) Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without Leydigism, increased excretion of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol* 2,615-627.

Kosztolányi G (1988) "Does ring syndrome" exist? An analysis of 207 case reports on patients with a ring autosome. *Hum Genet* 75, 174-179.

Kosztolányi G, Méhes K and Hook EB (1991) Inherited ring chromosomes: an analysis of published cases. *Hum Genet* 87,320-324.

Kozma R, Fear C and Adinolfi M (1998) Fluorescence in situ hybridization and Y ring chromosome. *Hum Genet* 80,95-96.

## L

Lahn BT, Pearson NM and Jegalian K (2001) The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat Rev* 2,207-216.

Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M and Nieschlag E (2004) Klinefelter's syndrome. *Lancet* 364,273-283.

Lenz P, Luetjens CM, Kamischke A, Kuhnert B, Kennerknecht I and Nieschlag E (2005) Mosaic status in lymphocytes of infertile men with or without Klinefelter syndrome. *Hum Reprod* 20(5),1248-1255.

Levy ER and Burgoyne PS (1986) The fate of X0 germ cells in the testes of X0/XY and X0/XY/XYY mouse mosaics: evidence for a spermatogenesis gene on the mouse Y chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 42,208-213.

Li L and Hamer DH (1995) Recombination and allelic association in the Xq/Yq homology region. *Hum Mol Genet* 4(11),2013-2016.

Linden MG, Bender BG and Robinson A (1995) Sex chromosome tetrasomy and pentasomy. *Pediatrics* 96,672-682.

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

Lowe X, Eskenazi B, Nelson DO, Kidd S, Alme A and Wyrobek AJ (2001) Frequency of XY sperm increases with age in fathers of boys with Klinefelter syndrome. *Am J Hum Genet* 69,1046-1054.

Luetjens CM, Rolf C, Gassner P, Werny JE and Nieschlag E (2002) Sperm aneuploidy rates in younger and older men. *Hum Reprod* 17(7),1826-1832.

## M

MacDonald M, Hassold T, Harvey J, Wang LH, Morton NE and 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.

Maeda T, Ohno M, Ishibashi A, Samejima M and Sasaki K (1976) Ring Y chromosome: 45,X/46,X,r(Y) chromosome mosaicism in a phenotypically normal male with azoospermia. *Hum Genet* 34,99-102.

Márquez C, Egozcue J, Martorell RM, Moreno V and Templado C (1996) Colcemid increases the frequency of chromosome abnormalities in human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 72,164-170.

Martin RH, Ko E and Rademaker A (1991) Distribution of aneuploidy in human gametes: comparison between human sperm and oocytes. *Am J Med Genet* 39(3),321-331.

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

Martin RH and Rademaker A (1999) Nondisjunction in human sperm: comparison of frequencies in acrocentric chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 86,43-45.

Martin RH (2005) Mechanisms of nondisjunction in human spermatogenesis. *Cytogenet Genome Res* 111,245-249.

Martínez-Pasarell O, Nogués C, Bosch M, Egozcue J and Templado C (1999) Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patient. *Hum Genet* 104,345-349.

McGinnis MJ, Kazazian HH Jr, Stetten G, Petersen MB, Boman H, Engel E, Greenberg F, Hertz JM, Johnson A, Laca Z et al (1992) Mechanisms of ring chromosome formation in 11 cases of human ring chromosome 21. *Am J Hum Genet* 50,15-28.

Micic M, Micic S, Bábic M and Diklic V (1990) Phenotype of two males with abnormal Y chromosomes. *Clin Genet* 37,321-326.

Miklos GLG (1974) Sex-chromosome pairing and male fertility. *Cytogenet Cell Genet* 13,558-577.

Miller SA, Dykes DD and Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 16,1215.

Miller OJ and Therman E (2001) *Human Chromosomes*, 4<sup>th</sup> edn. Springer-Verlag, New York, USA.

Moosani N, Chernos J, Lowry RB and Martin RH (1999) A 47,XXY fetus resulting from ICSI in a man with an elevated frequency of 24,XY spermatozoa. *Hum Reprod* 14(4), 1137-1139.

## N

Newberg MT, Francisco RG, Pang MG, Brugo S, Doncel GF, Acosta AA, Hoegerman SF and Kearns WG (1998) Cytogenetics of somatic cells and sperm from a 46,XY/45,X mosaic male with moderate oligoasthenoteratozoospermia. *Fertil Steril* 69,146-148.

## P

Palmer CG, Hoedes ME, Reed T and Kojetin J (1977) Four new cases of ring 21 and 22 including familial transmission of ring 21. *J Med Genet* 14,54-60.

Pezzolo A, Perroni L, Gimelli G, Arslanian A, Porta S, Gandullia P and Gandullia E (1993a) Identification of ring Y chromosome: cytogenetic analysis, Southern blot and fluorescent in situ hybridization. *Ann Genet* 36,121-125.

Pezzolo A, Gimelli G, Cohen A, Lavaggetto A, Romano C, Fogu G and Zuffardi O (1993b) Presence of subtelomeric sequences at the fusion points of ring chromosomes indicates that the ring syndrome is caused by ring instability. *Hum Genet* 92,23-27.

## R

Rappold GA (1993) The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum Genet* 92, 315-324.

Robinson WP, Bernasconi F, Lau A and McFadden DE (1999) Frequency of meiotic trisomy depends on involved chromosome and mode of ascertainment. *Am J Med Genet* 84(1),34-42.

Robinson DO and Jacobs PA (1999) The origin of the extra Y chromosome in males with a 47,XXY karyotype. *Hum Mol Genet* 8(12),2205-2209.

Robbins WA, Baulch JE, Moore D 2<sup>nd</sup>, Weier HU, Blakey D and Wyrobek AJ (1995) Three-probe fluorescence in situ hybridisation 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.

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

Rousseaux S, Hazzouri M, Pelletier R, Monteil M, Usson Y and 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.

Rubio C, Simon C, Blanco J, Vidal F, Minguez Y, Egozcue J, Crespo J, Remohi J and Pellicer A (1999) Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriages. *J Assist Reprod Genet* 16(5),253-258.

## S

Schinzl A (2001) Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man, 2<sup>nd</sup> edn. Walter de Gruyter, Berlin, Germany.

Seabright M (1972) Human chromosome banding. *Lancet* 1(7757),967.

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

Siffroi JP, Le Bourhis C, Krausz C, Barbaux S, Quintana-Murci L, Kanafani S, Rouba H, Bujan L, Bourrouillou G, Seifer I, Boucher D, Fellous M, McElreavey K and Dadoune JP (2000) Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. *Hum Reprod* 15(12),2559-2562.

Sigurdardottir S, Goodman BK, Rutberg J, Thomas GH, Jabs EW and Geraghty MT (1999) Clinical cytogenetic and fluorescence in situ hybridization findings in two cases of "complete ring" syndrome. *Am J Med Genet* 87,389-390.

Sloter E, Nath J, Eskenazi B and Wyrobeck AJ (2004) Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents. *Fertil Steril* 81(4),925-943.

Smyth CM and Bremner WJ (1998) Klinefelter syndrome. *Arch Intern Med* 158(12),1309-1314.

Soares SR, Templado C, Blanco J, Egozcue J and Vidal F (2001a) Numerical chromosome abnormalities in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 of paternal origin: generalised tendency to meiotic non-disjunction. *Hum Genet* 108,134-139.

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

Steinbach P, Fabry H and Scholz W (1979) Unstable ring Y chromosome in an aspermic male. *Hum Genet* 47,227-231.

Stoll C and Roth MP (1983) Segregation of a 22 ring chromosome in three generations. *Hum Genet* 63,294-296.

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

Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Turek P, Ko E, Rademaker A and Martin RH (2006) Analysis of non-crossover bivalents in pachytene cells from 10 normal male. *Hum Reprod* 21(9),2335-2339.

## T

Taillemite JL, Van der Akker J, Portnoi MF, le Porrier N, Marmor D, Bouillie J and Roux Ch (1978) A case of ring Y chromosome. *Hum Genet* 42,89-91.

Tang SS, Gao H, Robinson WP, Ho Yuen B and Ma S (2004) An association between sex chromosomal aneuploidy in sperm and an abortus with 45,X of paternal origin: possible transmission of chromosomal abnormalities through ICSI. *Hum Reprod* 19,147-151.

Templado C, Marquez C, Munne S, Colls P, Martorell MR, Cieply K, Benet J, Van Kirk V, Navarro J and Estop AM (1996) An analysis of human sperm chromosome aneuploidy. *Cytogenet Cell Genet* 74(3),194-200.

Templado C, Bosch M and Benet J (2005) Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenetic and Genoma Research* 111, 199-205.

Thomas NS, Collins AR, Hassold TJ and Jacobs PA (2000) A reinvestigation of non-disjunction resulting in 47,XXY males of paternal origin. *Eur J Hum Genet* 8,805-808.

Thomas NS and Hassold TJ (2003) Aberrant recombination and the origin of Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Update* 9,309-317.

Tzancheva M, Kaneva R, Kumanov P, Williams G and Tyler-Smith C (1999) Two male patients with ring Y: definition of an interval in Yq contributing to Turner syndrome. *J Med Genet* 36,549-553.

## V

Vermeesch JR, Baten E, Fryns J-P and Devriendt K (2002) Ring syndrome caused by ring chromosome 7 without loss of subtelomeric sequences. *Clin Genet* 62, 415-417.

Visootsak J, Aylstock M and Graham JM Jr (2001) Klinefelter syndrome and its variants: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr* 40(12),639-651.

Visootsak J and Graham Jr JM (2006) Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies. *Orp J Rare Dis* doi 10.1186/1750-1172-1-42.

## W

Wegner RD, Scherer G, Pohlschmidt M, l'Allemand D and Gal A (1992) Ring Y chromosome: cytogenetic and molecular characterization. *Clin Genet* 42,71-75.

WHO Health Organization (1992) *Who Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*, 3<sup>rd</sup> edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Williams BJ, Ballenger CA, Malter HE, Bishop F, Tucker M, Zwingman TA and Hassold TJ (1993) Non-disjunction in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two and three probes. *Hum Mol Genet* 2(11),1929-1936.

Wyandt HE (1988) The cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements. Chapter 22: Ring chromosomes: identification, familial transmission, causes of phenotypic effects and in vitro mosaicism. Editor Art Daniel. New York, Alan R Liss. ISBN 0-8451-2410-2.



## **7. ARTICLES**

**7.1. Mitotic and meiotic behaviour of a naturally transmitted ring Y chromosome: Reproductive risk evaluation.**

# Mitotic and meiotic behaviour of a naturally transmitted ring Y chromosome: reproductive risk evaluation

Núria Arnedo, Carme Nogués, Mercè Bosch and Cristina Templado<sup>1</sup>

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: cristina.templado@uab.es

**BACKGROUND:** The mitotic and meiotic behaviour of a transmitted ring Y [r(Y)] chromosome from a father to his Klinefelter syndrome (KS) son, and the mechanism of ring formation are analysed herein. To our knowledge, this is the first reported case of natural transmission of an r(Y). **METHODS and RESULTS:** Amplification of X chromosome polymorphisms by PCR showed that the KS was of paternal origin. G-banding and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) studies revealed a similar percentage of mosaicism in father and son by mitotic loss of r(Y). SRY gene and Y marker amplification by PCR, FISH with subtelomeric probes for Xp/Yp and Xq/Yq, and comparative genomic hybridization (CGH) analyses indicated the intactness of the Y chromosome from SRY to subtelomere Yq. FISH analysis of sperm from the father showed significantly higher frequencies ( $P < 0.005$ ) for diploidy and for 6, 13, 18, 21, 22, XX, XY disomies than those observed in control donors. **CONCLUSIONS:** An r(Y) with low material loss can be naturally transmitted, showing similar mitotic behaviour in the offspring. The presence of an r(Y) chromosome in germinal cells increased the risk of fathering offspring with numerical abnormalities, even for chromosomes not involved in the arrangement.

*Key words:* aneuploidy/inherited ring/Klinefelter syndrome/ring Y chromosome/sperm

## Introduction

The frequency of ring chromosomes in clinically detected conceptions is 1/25 000 (Jacobs, 1981) and has been reported for all human chromosomes (Schinzel, 2001). The majority of ring chromosomes seem to be the result of two terminal breaks in both chromosome arms followed by fusion of the broken ends leading to the loss of genetic material (Miller and Therman, 2001). However, other mechanisms of ring formation have been described: the union of a broken chromosome end with the opposite telomere region (Henegariu *et al.*, 1997a); subtelomeric sequence fusion (Vermeesch *et al.*, 2002) or telomere–telomere fusion with no loss of genetic material (Henegariu *et al.*, 1997a; Sigurdardottir *et al.*, 1999).

Generally, the patients with a ring chromosome have a second monosomic cell line because of the instability of the ring chromosome during mitosis produced by the occurrence of sister chromatid exchanges (SCE). These SCE could result in dicentric ring formation that undergo bridge–breakage–fusion–bridge cycles that finally will be lost. The result is a monosomic cell which may or may not be viable (Miller and Therman, 2001).

Up to now, many cases with a ring Y chromosome have been published, but only some of them have analysed the ring chromosome by molecular techniques (Kozma *et al.*, 1988; Wegner *et al.*, 1992; Pezzolo *et al.*, 1993a; Henegariu

*et al.*, 1997a,b; Bofinger *et al.*, 1999; Tzancheva *et al.*, 1999; Blanco *et al.*, 2003). Most patients present a mosaic 46,X,r(Y)/45,X karyotype, with phenotypes ranging from Turner syndrome to male external genitalia with hypogonadism or azoospermia (reviewed by Daniel, 1985; Hsu *et al.*, 1994). This phenotype variability depends on the percentage of the monosomic cell line in the different tissues and on the regions deleted during the ring Y formation. Moreover, the coexistence of different derivatives of the original ring could make these phenotypes more variable (Pezzolo *et al.*, 1993a; Henegariu *et al.*, 1997b).

Most ring chromosomes arise *de novo* and  $\leq 1\%$  of all ring chromosomes are inherited (revised by Kosztolányi *et al.*, 1991). Ring chromosomes most frequently transmitted are chromosomes 20, 21 and 22 (Palmer *et al.*, 1977; Stoll and Roth, 1983; Hertz, 1987; Back *et al.*, 1989; Kennerknecht *et al.*, 1990). There is only one case reported in the literature of a ring Y chromosome transmitted by ICSI (Bofinger *et al.*, 1999).

Despite meiotic behaviour studies of Y ring chromosomes allowing for both the elucidation of the infertility bases and the risk of fathering aneuploid offspring, only two cases have been published in infertile patients. One of them was carried out in spermatocyte metaphases from testicular biopsies using conventional cytogenetic techniques (Chandley and Edmond, 1971). The second one analysed sperm nuclei

and meiotic cells from one semen sample by the multicolour fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique (Blanco *et al.*, 2003).

The case of a naturally inherited ring Y [r(Y)] chromosome from a father with karyotype 46,X,r(Y)/45,X to his Klinefelter syndrome (KS) son with karyotype 47,XX,r(Y)/46,XX is reported in this work for the first time.

The aims of the present study were to investigate: (i) the mitotic behaviour of the ring Y chromosome in both father and son; (ii) the mechanism of formation of the r(Y); and (iii) the meiotic behaviour of the ring Y chromosome in sperm from the father and his reproductive risk.

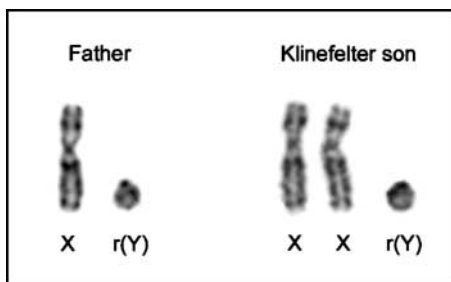
## Materials and methods

### Clinical report

A couple was referred to our laboratory because of an abnormal karyotype obtained by amniocentesis at 16 weeks of gestation following an altered second trimester maternal serum screening with a Down's syndrome risk estimation of 1:95 [alpha-fetoprotein: 0.67 multiples of the median (MoM); free  $\beta$ -hCG: 2.68 MoM]. Cytogenetic analysis of cultured amniotic fluid cells after G-banding revealed a 47,XX,r(Y)/46,XX karyotype in the fetus (Figure 1). It was the first pregnancy with no previous miscarriages. The mother, a 36-year old woman, presented a normal karyotype. The father, a healthy man aged 33 years, 169 cm tall and a normal male phenotype, had a mosaic 46,X,r(Y)/45,X karyotype (Figure 1). Semen analysis of the father showed oligozoospermia ( $4.5 \times 10^6$  sperm/ml) (World Health Organization, 1992). The child was born after 39.4 weeks of uncomplicated gestation and presented a normal physical examination with normal external genitalia. His birthweight was 3300 g and length at birth 49.5 cm. At 3 years of age the patient was 96 cm tall and weighed 14 500 g. On clinical examination, internal genitalia and development progress were normal. The intelligence of both father and son was apparently normal (IQ not analysed). All donors gave informed consent prior to the study, which was approved by our institutional Ethics Committee.

### Lymphocytes and buccal mucosa preparations

Metaphases obtained from peripheral blood lymphocytes were analysed by G-banding and multicolour FISH. Interphase lymphocytes from peripheral blood and endothelial cells from buccal mucosa were also obtained. Metaphase and interphase cells were treated with 0.075 mol/l KCl and nuclei were fixed in Carnoy solution (3 methanol:1 acetic acid). All slides were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until G-banding or FISH were performed. Prior to hybridization, buccal mucosa cell preparations were treated with 60% acetic acid.



**Figure 1.** G-banded partial karyotypes showing the sex chromosomes of the father and his Klinefelter son.

### Sperm preparations

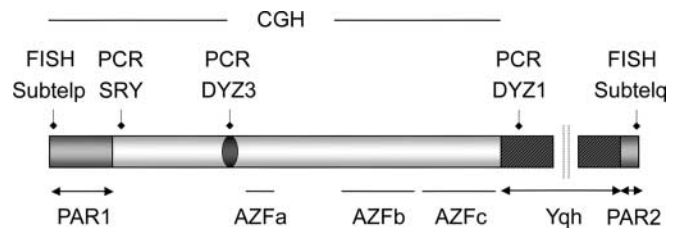
Semen samples from the father and from eight healthy donors were obtained. Samples were collected and fixed as described (Bosch *et al.*, 2001). Briefly, samples were washed three times in 0.075 mol/l KCl, fixed in methanol:acetic acid (3:1) and smeared onto clean slides. Slides obtained were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until FISH was performed.

### FISH analyses

FISH analyses were performed as previously described by Bosch *et al.* (2001). Slides were washed in a standard  $2\times\text{SSC}$  solution, dehydrated in an ethanol series and denatured for 3–5 min in a 70% formamide solution at  $73^\circ\text{C}$ . Probes were denatured at  $73^\circ\text{C}$  for 5 min and slides were hybridized in a dark chamber for 12–72 h at  $37^\circ\text{C}$ . DAPI-III counterstain (Vysis Inc.) and antifade were applied to the slides prior to observation. Sperm nuclei decondensation was carried out by slide incubation in a solution of 5 mmol/l dithiothreitol at  $37^\circ\text{C}$  for 8–15 min before denaturation. For subtelomeric probes, slides were treated with pepsin and postfixed with 1% formaldehyde solution prior to hybridization.

### Probes

Centromeric probes for chromosomes 6 (1:1 mix CEP6-Spectrum green and CEP6-Spectrum orange; Vysis Inc.), X (CEPX-Spectrum green; Vysis Inc.), Y (CEPY-Spectrum orange; Vysis Inc. and CEPY-Spectrum green; Oncor Inc.) and 18 (CEP18-Spectrum aqua; Vysis Inc.), locus-specific probes for chromosomes 21 (LSI21-Spectrum orange, loci q22.14–q22.3; Vysis Inc.), 13 (LSI13-Spectrum orange, locus RB-1; Vysis Inc.) and 22 (LSI22-Spectrum green, locus bcr; Vysis Inc.), a satellite III DNA probe for the Y chromosome (Y satIII-Spectrum aqua; Vysis Inc.) and, finally, TelVysion telomeric probes Xp/Yp (Spectrum green) and Xq/Yq (Spectrum orange) (Vysis Inc.) were used for the FISH analyses (Figure 2). Probes used in multicolour FISH in the different cell phases and tissues are shown in Table I.



**Figure 2.** Chromosomal location of gene, regions, probes, and markers on the Y chromosome and the techniques for their detection used in the present study.

**Table I.** Probes used in multicolour FISH analyses

Cell and phase types	Probes	Type of study
Metaphase lymphocytes	6, X, Y	Mosaicism and dic r(Y) detection
Interphase lymphocytes	Tel Xp/Yp, Tel Xq/Yq	r(Y) subtelomere detection
Interphase buccal mucosa	6, X, Y	Mosaicism detection
Sperm nuclei	6, 13, 18, 21, 22, X, Y	Numerical abnormality detection

**Data collection and scoring criteria**

All slides scored had a hybridization efficiency of  $\geq 99\%$ . Two signals of the same colour were scored as two copies of the chromosome when they were comparable in brightness and size, and separated from each other by a distance greater than the diameter of each signal. Nullisomy was considered when one of the signals was missing, and the nucleus contained one signal for the other chromosomes. All slides were scored by the same person, and ambiguous signals were examined, at least, by a second observer. For subtelomeric probes, cells were scored only when Xp and Xq hybridization signals were present. In sperm analysis, only intact and non-overlapped sperm nuclei, identified as decondensed sperm by the presence of a tail, were evaluated. We considered as diploid those sperm with two signals for each of the chromosomes studied. Scoring of sperm nuclei was blind and slide identification was unavailable to the scorer until data collection was completed. Slides were analysed on an Olympus AX70 epifluorescence microscope equipped with a triple-band pass filter for FITC/Texas Red/DAPI and a single-band pass filter for FITC, Texas Red, Aqua and DAPI. The images were analysed with a Cytovision system (Applied Imaging, UK).

**CGH analysis**

DNA was extracted from peripheral blood samples of the father according to standard procedures. Comparative genomic hybridization (CGH) was carried out to identify the size of terminal deletions in the ring Y chromosome. DNA labelling, hybridization and detection were performed as described by Hernando *et al.* (2002). The red-labelled paternal DNA and the green-labelled control DNA were hybridized on normal female metaphases. Slides were analysed using a Cytovision Ultra Workstation (Applied Imaging). Fluorescent ratio values of CGH  $>1.25$  and  $<0.75$  were considered to represent chromosomal gain and loss respectively.

**DNA analysis**

To establish the parental origin of the extra X chromosome in the KS patient, eight microsatellite DNA markers along the X chromosome length were analysed: DXS1283E, DysII, DMD49, DXS991, AR, DXS101, DXS1192, DXS8377 (details about these markers can be downloaded at <http://www.gdb.org>). DNA from lymphocytes of the family (mother, father and son) was obtained using a standard salt procedure. Amplified products were separated on a 6% acrylamide:bisacrylamide (19:1) gel. PCR amplification was carried out to ascertain the presence of the sex-determining region Y (SRY) gene

(sY14/Yp11.3), DYZ3 (sY78/Ycen) and DYZ1 (sY160/Yq12) chromosome Y markers (Figure 2). Internal controls were simultaneously amplified with SRY (DysII located in chromosome X) and DYZ3 and DYZ1 (IR5 located in chromosome 19). DNA amplifications were performed in a final reaction volume of 50  $\mu$ l containing 1% of standard PCR buffer (Ecogen), 250  $\mu$ mol/l of each dNTP (Amersham Pharmacia Biotech Inc), 0.8  $\mu$ mol/l of each primer (Research Genetics), 1.5 mmol/l of  $MgCl_2$  (Ecogen), 0.5 IU of Eco-taq Polymerase (Ecogen) and 0.5–0.8  $\mu$ g of DNA in a Perkin Elmer thermal cycler for 24–30 cycles. DNA amplifications for the Y chromosome were accomplished as explained with the addition of 0.8 mmol/l of the second primer.

**Statistical analysis**

To investigate whether there were statistically significant differences between the cell-cycle phase studied, tissue analysed and technique used, a  $\chi^2$ -test was performed. When the  $\chi^2$ -test was not applicable, Fisher's test was used. A likelihood ratio  $\chi^2$ -test was used for the analysis of the homogeneity in sperm analysis of the control group. To compare the results from the control group and the KS father, Student's *t*-test was performed. When this test was not applicable due to the heterogeneity of the group,  $\chi^2$ -test was applied.

**Results****Parental origin of the Klinefelter syndrome**

Six of the eight X chromosome polymorphisms amplified by PCR were informative (DXS1283E, DysII, DMD49, AR, DXS101 and DXS8377) and showed that the supernumerary X chromosome present in the KS patient was of paternal origin.

**Cytogenetic and FISH analysis in somatic cells**

A total of 2628 cells were analysed using G-banding and multicolour FISH in father and son: 1490 metaphase and interphase lymphocytes (a minimum of 100 metaphases and 500 interphase nuclei scored per individual) and 1138 interphase buccal mucosa cells (Table II). G-banding and FISH analyses were used to determine the proportion of mosaicism in metaphase lymphocytes. Multicolour FISH was also used to compare the percentages of each cell line in the different cell-cycle phases and tissues studied in father and son (Figure 3).

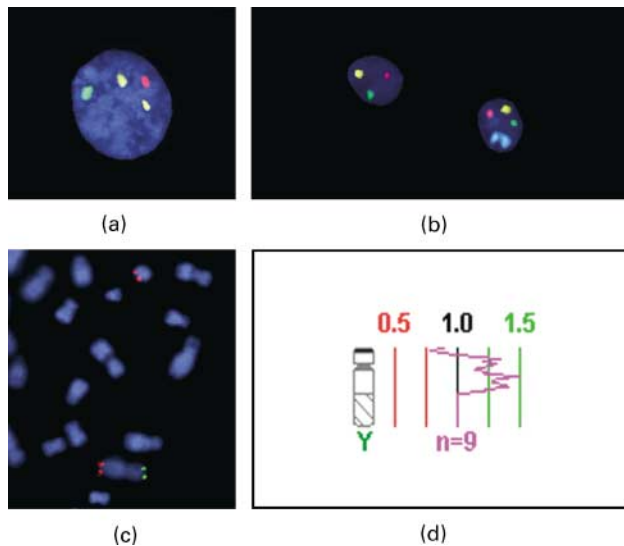
**Table II.** Mitotic behaviour of the ring in Klinefelter syndrome (KS) father and KS patient in different cell cycle phases and tissues using both G-banding and multicolour fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Tissue phases	Technique used	Father			Klinefelter son		
		No. of cells analysed	46,X,r(Y)	45,X	No. of cells analysed	47,XX,r(Y)	46,XX
<b>Metaphases</b>							
Lymphocytes	G-banding	110	67.3	27.3	110	74.6	22.7
Lymphocytes	FISH	114	71.9	25.4 <sup>a</sup>	112	69.6	29.5 <sup>a</sup>
<b>Interphases</b>							
Lymphocytes	FISH	520	86.9	12.3	524	78.4	20.0 <sup>b,c</sup>
Buccal mucosa	FISH	540	84.4	13.0	598	84.6	13.0

<sup>a</sup>Increased frequency in aneuploid cell line in metaphase lymphocytes compared with interphase lymphocytes in the same individual ( $P < 0.05$ ).

<sup>b</sup>Increased frequency in interphase lymphocytes compared with interphase buccal mucosa cells in the proband ( $P < 0.05$ ).

<sup>c</sup>Increased frequency in interphase lymphocytes in the proband compared with interphase lymphocytes in the father ( $P < 0.05$ ).



**Figure 3.** (a) Normal buccal mucosa cell of the father with signals for 6 (yellow), X (green) and Y (red) chromosomes. (b) Two sperm nuclei from the father with signals for 6 (yellow), 21 (red), X (green) and Y (blue) chromosomes. On the right, a disomic XY sperm. (c) A partial lymphocyte metaphase of the father with signals for subtelerome regions for Xp/Yp (green) and Xq/Yq (red). The X chromosome presents both subtelerome regions, whereas the r(Y) chromosome only presents a signal for the Yq subtelerome region. (d) Profile of the ring Y chromosome after CGH (DNA was hybridized on normal female metaphases) showing the Y chromosome material present in the r(Y) from the father.

Using G-banding, we found two different cell lines per individual: 46,X,r(Y)[74]/45,X[30] in the father and 47,XX,r(Y)[82]/46,XX[25] in the son. The percentages obtained for the two cell lines were similar when comparing father versus son. There were significant differences in each individual for the frequency of each cell line depending on the cell phase studied (father,  $P < 0.005$ ; son,  $P < 0.05$ ). Differences depending on the tissue analysed were also detected in the son ( $P < 0.05$ ) (see Table II). A significant increase in the loss of the ring Y chromosome in interphase lymphocytes was observed in the son ( $P < 0.05$ ).

In interphase cells analysed by FISH, it was not possible to distinguish between a dicentric r(Y) or two r(Y). In metaphase lymphocytes analysed by G-banding and FISH, a dicentric r(Y) in the father (five cells and three cells respectively) and in the son (three cells and one cell respectively) was found. We also detected two r(Y) in one metaphase lymphocyte (1/110 cells) analysed by G-banding in the father.

FISH with specific subteleromic probes for sex chromosomes demonstrated the presence of the Yq subtelerome and the absence of the Yp subtelerome in the r(Y) in both father and son (see Figure 3).

#### Molecular analysis by PCR

Positive amplification of gene SRY and markers DYZ3 and DYZ1 by PCR proved their presence on the r(Y) in both father and son.

#### CGH analysis

CGH was performed on normal female metaphases to identify the deleted Yp region on the ring Y chromosome. The CGH profile showed the presence of the regions from Yp11.3 to Yq11.2 (Figure 3).

#### FISH in sperm

A total of 187 126 sperm nuclei were analysed, with a minimum of 10 000 sperm nuclei scored for each hybridization and individual. The results obtained are shown in Table III. A significant increase ( $P < 0.005$ ) of disomy for chromosomes 6, 13, 18, 21, 22, XX, XY and for diploidy were found in the father, compared with control donors (Figure 3). The overall incidence of aneuploidy for all chromosomes studied was statistically higher ( $P < 0.005$ ) in sperm from the father (12.37%) than in the control donors' mean, (1.07%). The X-bearing sperm (58.34%) showed a statistically significant increase ( $P < 0.05$ ) versus Y-bearing sperm (41.66%).

#### Discussion

Mitotic and meiotic behaviour of a transmitted ring Y chromosome and the mechanism involved in its formation has been analysed by cytogenetics and molecular techniques. To our knowledge, this is the first reported case of a naturally transmitted ring Y chromosome.

#### Mitotic behaviour of the ring Y chromosome

The mitotic behaviour of the r(Y) in both father and son was similar, showing two cell lines in all the tissues analysed as a consequence of the loss of r(Y) chromosome. The only difference observed between them was a significant increase in r(Y) loss in interphase lymphocytes ( $P < 0.05$ ) in the son. These results could be explained by a higher mitotic instability of the ring in the son due to the presence of two X chromosomes in his karyotype [47,XX,r(Y)/46,XX]. According to several authors, the percentage of the aneuploid cell line would be determinant for a patient carrying a ring chromosome to assess his fertility and phenotype (Wegner *et al.*, 1992; Pezzolo *et al.*, 1993a; Hsu *et al.*, 1994; Henegariu *et al.*, 1997a; Tzancheva *et al.*, 1999). The frequencies of the cell line without the r(Y) in father and son in interphase cells ranged from 12 to 20%, corresponding to the lower percentages obtained by other authors in similar studies (ranging from 5 to 85%) (Chandley and Edmond, 1971; Maeda *et al.*, 1976; Taillemite *et al.*, 1978; Steinbach *et al.*, 1979; Kosztolányi, 1988; Micic *et al.*, 1990; Wegner *et al.*, 1992; Hsu, 1994; Henegariu *et al.*, 1997a; Bofinger *et al.*, 1999; Tzancheva *et al.*, 1999; Blanco *et al.*, 2003).

Both individuals presented an increased loss of the ring Y chromosome in metaphase lymphocytes ( $P < 0.05$ ) versus interphase cells. It has been previously described that colcemid treatment during slide preparation could contribute to artefactual loss of chromosomes due to the absence of the mitotic spindle fibres (Márquez *et al.*, 1996). The different percentages of the 46,XX cell line observed in the son, depending on the tissue studied ( $P < 0.05$ ), have already been described by Henegariu *et al.* (1997a).

**Table III.** Numerical abnormalities in sperm from the father and the control donors analysed using multicolour FISH

Control donors	Age (years)	Disomy (%)								Diploidy (%)
		6	13	18	21	22	XX	YY	XY	
C1	42	0.10	0.05	0.03	0.33	0.03	0.12	0.04	0.34	0.20
C2	33	0.03	0.05	0.02	0.04	0.03	0.08	0.05	0.19	0.16
C3	38	0.01	0.06	0.04	0.24	0.05	0.08	0.06	0.23	0.18
C4	40	0.03	0.04	0.03	0.16	0.05	0.10	0.04	0.33	0.26
C5	41	0.07	0.06	0.04	0.46	0.02	0.09	0.12	0.26	0.22
C6	48	0.05	0.05	0.03	0.40	0.04	0.14	0.07	0.19	0.20
C7	47	0.06	0.05	0.03	0.27	0.03	0.08	0.08	0.37	0.24
C8	58	0.03	0.08	0.04	0.17	0.07	0.06	0.08	0.29	0.15
Control mean	43.4	0.05	0.05	0.03	0.27	0.04	0.09	0.07	0.27	0.20
KS father	33	0.25 <sup>a</sup>	0.50 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.85 <sup>b</sup>	0.45 <sup>a</sup>	0.22 <sup>a</sup>	0.06	9.32 <sup>a</sup>	0.83 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Increased frequency compared with the control mean ( $P < 0.0001$ ).

<sup>b</sup>Increased frequency compared with the control mean ( $P < 0.005$ ).

KS = Klinefelter syndrome.

The percentage of dicentric r(Y) found in both father and son (0.89–4.5%) is within the range described by other authors for this chromosome (1.3–18%) (Chandley and Edmond, 1971; Kosztolányi *et al.*, 1988; Micic *et al.*, 1990; Blanco *et al.*, 2003). The low frequency of dicentric r(Y) present in both cases seems to reflect the small number of SCE which occurred in the ring and, thus, its low instability during mitosis.

#### Mechanism of ring Y chromosome formation

To establish the mechanism of ring formation in father and son, cytogenetic and molecular analyses have been performed. PCR, FISH and CGH results have demonstrated that r(Y) was present from Yp11.3 (above SRY gene) to the Yq subtelomere (see Figure 2). These results are consistent with the loss of part, if not all, of the PAR1 region (starting at Yp11.32).

There are two possible mechanisms of formation for the r(Y) studied. The first one is in agreement with the generally accepted model of ring formation requiring two terminal deletions in both chromosome arms (Micic *et al.*, 1990; Wegner *et al.*, 1992; McGinnis *et al.*, 1992; Pezzolo *et al.*, 1993b; Conte *et al.*, 1995; Sigurdardottir *et al.*, 1999; Tzancheva *et al.*, 1999). The two breakpoints were localized: one on the Yp arm (between Yp11.3 and the subtelomere region) and a second one on the Yq arm (between the subtelomeric region and the telomere). The second possible mechanism, which has been previously described by other authors (Conte *et al.*, 1997; Henegariu *et al.*, 1997a), implies a breakpoint on the Yp arm and fusion with the opposite telomere region.

The normal stature of the father (169 cm) suggests that the genetic material loss implicated in ring Y formation may not have included the SHOX/PHOG locus localized in the PAR1 region of Yp (Yp11.3). These data seem to reflect a partial loss of the PAR1 region instead of a total loss on the r(Y).

#### Meiotic chromosome segregation in sperm

To assess the possible association between the Y ring presence and abnormal meiotic chromosome segregation, the frequencies of numerical chromosome abnormalities in sperm from the father with those observed in eight control donors,

using multicolour FISH, were compared. The father showed a statistically significant increase in the percentage of diploidy, disomy for all autosomes analysed (6, 13, 18, 21, 22), and for XX and XY disomy. Only one similar study has been carried out in an infertile man with a 45,X/46,X,r(Y)/46,X,dicr(Y) karyotype in few sperm because the patient had severe oligozoospermia (Blanco *et al.*, 2003). The authors also observed an increased incidence for diploidy and for 21 and XY disomies, but not for 13 and 18 disomies, probably due to the low number of sperm analysed (<50 sperm).

The high percentage of XY disomy found in the father (9.32 versus 0.27% in controls) ( $P < 0.005$ ) could be the result of the partial lack of PAR1 in the ring and it could explain the paternal origin of the extra X chromosome present in the KS son. Diminished recombination in this region is associated with meiotic non-disjunction of the XY pair during meiosis I (Hassold *et al.*, 1991). In fact, meiotic studies in three patients with a ring chromosome demonstrated unpaired sex chromosomes from 80 to 100% in spermatocyte I cells (Chandley and Edmond, 1971; Micic *et al.*, 1990; Blanco *et al.*, 2003). Recently, an increased frequency of XY sperm ( $P < 0.02$ ) has also been found in fathers of paternal KS cases compared with that observed in fathers of maternal KS cases. The authors explain this increase, in part, because of paternal age (Eskenazi *et al.*, 2002).

The statistically significant increase in X-bearing versus Y-bearing sperm observed in the father by us, and in an infertile man with a r(Y) by other authors (Blanco *et al.*, 2003), could be explained by the loss of r(Y) during meiosis.

The increased disomy observed for all autosomes analysed and XX disomy in sperm from the father could be the product of a generalized susceptibility to non-disjunction in this individual due to the presence of r(Y). An interchromosomal effect has been described due to the presence of a ring chromosome in *Saccharomyces cerevisiae* (Flatters *et al.*, 1995) and in humans (Chandley and Edmond, 1971; Roeder, 1997; Blanco *et al.*, 2003). The presence of a ring chromosome may produce segregation errors of other chromosomes due to mechanical problems (Flatters *et al.*, 1995) or to the presence of one impaired bivalent (Chandley and Edmond,

1971; Roeder, 1997). More recently, studies in fathers of Turner and Down's syndrome children of paternal origin (Soares *et al.*, 2001a,b) have described an increased frequency of aneuploid sperm not restricted to the chromosome pair implicated in the aneuploid child. The authors suggested the possibility of a generalized susceptibility to non-disjunction due to disruption of the synaptic process.

### Ring Y chromosomes and fertility

Sex determination and spermatogenesis are the most important functions of the Y chromosome, and normal male development in humans depends on its presence. All men with a ring Y chromosome studied so far have been infertile patients (Chandley and Edmond, 1971; Maeda *et al.*, 1976; Kozma *et al.*, 1988; Micic *et al.*, 1990; Tzancheva *et al.*, 1999; Blanco *et al.*, 2003). Infertility is the main effect of an r(Y) chromosome due to the loss of Y genes directly implicated in spermatogenesis, the presence of a 45,X cell line or the lack of sex chromosome pairing during meiosis.

The presence of the SRY gene and the intactness of the Yq arm were already expected in the father and son because of their male phenotype. The presence of Y genes implicated in spermatogenesis (regions AZFa, AZFb and AZFc) (reviewed by Foresta *et al.*, 2001; Lahn *et al.*, 2001) and the low proportion of 45,X cells in the father could explain his normal male phenotype. Despite intactness of the Yq arm, the father presented a moderate oligozoospermia which could be explained by an arrest of XO spermatocytes I during meiosis (Chandley and Edmond, 1971; Micic *et al.*, 1990; Blanco *et al.*, 2003). Previously, a correlation between the absence of pairing and spermatogenesis arrest was hypothesized by Miklos (1974). More recently, male individuals lacking XY pairing are known to be sterile because a reduced recombination frequency leads to incorrect segregation (Hassold *et al.*, 1991; Rappold *et al.*, 1993). In our case, the father would probably have been referred to ICSI if his moderate oligozoospermia had been detected previously. Only one case of a ring Y chromosome transmission has been reported (Bofinger *et al.*, 1999) from a father with a 46,X,r(Y)/45,X karyotype to his son achieved by ICSI because of severe oligozoospermia. Unfortunately, in this report the numerical abnormalities in sperm from the father or the regions deleted due to the formation of the ring were not analysed.

The overall frequency of numerical chromosome abnormalities in the KS father was >10-fold higher than those observed in control individuals (12.7% versus 1.1%), including numerical abnormalities for other chromosome pairs not involved in the rearrangement. This generalized predisposition to meiotic non-disjunction could be even higher if more chromosomes were analysed.

In conclusion, an r(Y) with low material loss on the Yp arm can be naturally transmitted, and its mitotic behaviour seems to be similar in the offspring. The intactness of the Yq arm, the low percentage of r(Y) loss, and the presence of the SRY gene are all in agreement with the male phenotype shown by father and son. The increased incidence of sperm with numerical chromosomal abnormalities found in the

father could be explained mainly by the partial loss of the PAR1 region and by an interchromosomal effect because of the presence of the ring in germinal cells. The presence of a ring Y chromosome in germinal cells increased the risk of fathering offspring with numerical abnormalities even for chromosomes not involved in the arrangement. These findings may also be associated with an increased production of clinically undetected pregnancy losses that could explain some cases of idiopathic infertility.

### Acknowledgements

The authors wish to thank Mónica Santos for her helpful assistance in the CGH analyses and interpretation. Financial support was given by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project BFI2002-01193) and the Generalitat de Catalunya (2001SGR-00201), Spain. Núria Arnedo was the recipient of a grant from the Universitat Autònoma de Barcelona during 2001.

### References

- Back E, Voiculescu I, Brünger M and Wolff G (1989) Familial ring (20) chromosomal mosaicism. *Hum Genet* 83,148–154.
- Blanco J, Farreras A, Egozcue J and Vidal F (2003) Meiotic behaviour of the sex chromosomes in a 45,X/46,X,r(Y)/46,X,dic r(Y) patient assessed by FISH. *Fertil Steril* 79,913–918.
- Bofinger MK, Needham DF, Saldana LR, Sosnowski JP and Blough RI (1999) 45,X/46,X,r(Y) karyotype transmitted by father to son after intracytoplasmic sperm injection for oligospermia. A case report. *J Reprod Med* 44,645–648.
- Bosch M, Rajmil O, Martínez-Pasarell O, Egozcue J and Templado C (2001) Linear increase of diploidy in human sperm with age: a four-colour FISH study. *Eur J Hum Genet* 9,533–538.
- Chandley AC and Edmond P (1971) Meiotic studies on a subfertile patient with a ring Y chromosome. *Cytogenetics* 10,295–304.
- Conte RA, Luke S and Verma RS (1995) Characterization of a ring chromosome 21 by FISH-technique. *Clin Genet* 48,188–191.
- Conte RA, Kleyman SM, Chaula K and Verma RS (1997) Delineation of a ring chromosome 16 by the FISH-technique: a case report with review. *Clin Genet* 51,196–199.
- Daniel A (1985) Y chromosome and rings. In Sandberg AA (ed.) *The Y Chromosome. Part B: Clinical Aspects of Y Chromosome Abnormalities*. Alan R Liss, New York, pp. 105–135.
- Eskenazi B, Wyrobek AJ, Kidd SA, Lowe X, Moore D, II, Weisiger K and Aylstock M (2002) Sperm aneuploidy in fathers of children with paternally and maternally inherited Klinefelter syndrome. *Hum Reprod* 17,576–583.
- Flatters M, Maxfield R and Dawson D (1995) The effects of a ring chromosome on the meiotic segregation of other chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 249,309–316.
- Foresta C, Moro E and Ferlin A (2001) Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *End Rev* 22,226–239.
- Hassold TJ, Sherman LS, Pettay D, Page DC and Jacobs PA (1991) XY chromosome nondisjunction in man is associated with diminished recombination in the pseudoautosomal region. *Am J Hum Genet* 49,253–260.
- Henegariu O, Kernek S, Keating MA and Palmer CG (1997a) PCR and FISH analysis of a ring Y chromosome. *Am J Med Genet* 69,171–176.
- Henegariu O, Pescovitz OH, Vance GH, Verbrugge J and Heerema NA (1997b) A case with mosaic di-, tetra- and octacentric ring Y chromosomes. *Am J Med Genet* 71,426–429.
- Hernando C, Carrera M, Ribas I, Parear N, Baraibar R, Egozcue J and Fuster C (2002) Prenatal and postnatal characterization of Y chromosome structural anomalies by molecular cytogenetic analysis. *Prenat Diagn* 22, 802–805.
- Hertz JM (1987) Familial transmission of a ring chromosome 21. *Clin Genet* 32,35–39.
- Hsu LYF (1994) Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am J Med Genet* 53,108–140.
- Jacobs PA (1981) Mutation rates of structural chromosome rearrangements in man. *Am J Hum Genet* 33,44–54.



- Kennerknecht I, Barbi G and Vogel W (1990) Maternal transmission of ring chromosome 21. *Hum Genet* 86,99–101.
- Kosztolányi G (1988) “Does ring syndrome” exist? An analysis of 207 case reports on patients with a ring autosome. *Hum Genet* 75,174–179.
- Kosztolányi G, Méhes K and Hook EB (1991) Inherited ring chromosomes: an analysis of published cases. *Hum Genet* 87,320–324.
- Kozma R, Fear C and Adinolfi M (1998) Fluorescence in situ hybridization and Y ring chromosome. *Hum Genet* 80,95–96.
- Lahn BT, Pearson NM and Jegalian K (2001) The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat Rev* 2,207–216.
- Maeda T, Ohno M, Ishibashi A, Samejima M and Sasaki K (1976) Ring Y chromosome: 45,X/46,X,r(Y) chromosome mosaicism in a phenotypically normal male with azoospermia. *Hum Genet* 34,99–102.
- Márquez C, Egozcue J, Martorell RM, Moreno V and Templado C (1996) Colcemid increases the frequency of chromosome abnormalities in human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 72,164–170.
- McGinnis MJ, Kazazian HH Jr, Stetten G, Petersen MB, Boman H, Engel E, Greenberg F, Hertz JM, Johnson A, Laca Z *et al.* (1992) Mechanisms of ring chromosome formation in 11 cases of human ring chromosome 21. *Am J Hum Genet* 50,15–28.
- Micic M, Micic S, Bábic M and Diklic V (1990) Phenotype of two males with abnormal Y chromosomes. *Clin Genet* 37,321–326.
- Miklos GLG (1974) Sex-chromosome pairing and male fertility. *Cytogenet Cell Genet* 13,558–577.
- Miller OJ and Therman E (2001) *Human Chromosomes*, 4th edn. Springer-Verlag, New York, USA.
- Palmer CG, Hoedes ME, Reed T and Kojetin J (1977) Four new cases of ring 21 and 22 including familial transmission of ring 21. *J Med Genet* 14,54–60.
- Pezzolo A, Perroni L, Gimelli G, Arslanian A, Porta S, Gandullia P and Gandullia E (1993a) Identification of ring Y chromosome: cytogenetic analysis, Southern blot and fluorescent in situ hybridization. *Ann Genet* 36,121–125.
- Pezzolo A, Gimelli G, Cohen A, Lavaggetto A, Romano C, Fogu G and Zuffardi O (1993b) Presence of subtelomeric sequences at the fusion points of ring chromosomes indicates that the ring syndrome is caused by ring instability. *Hum Genet* 92,23–27.
- Rappold GA (1993) The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum Genet* 92,315–324.
- Roeder GS (1997) Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev* 11,2600–2621.
- Schinzel A (2001) *Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man*, 2nd edn. Walter de Gruyter, Berlin, Germany.
- Sigurdardottir S, Goodman BK, Rutberg J, Thomas GH, Jabs EW and Geraghty MT (1999) Clinical cytogenetic and fluorescence in situ hybridization findings in two cases of “complete ring” syndrome. *Am J Med Genet* 87,389–390.
- Soares SR, Templado C, Blanco J, Egozcue J and Vidal F (2001a) Numerical chromosome abnormalities in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 of paternal origin: generalised tendency to meiotic non-disjunction. *Hum Genet* 108,134–139.
- Soares SR, Vidal F, Bosch M, Martínez-Passarell O, Nogués C, Egozcue J and Templado C (2001b) Acrocentric chromosome disomy is increased in spermatozoa from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 108, 499–503.
- Steinbach P, Fabry H and Scholz W (1979) Unstable ring Y chromosome in an aspermic male. *Hum Genet* 47,227–231.
- Stoll C and Roth MP (1983) Segregation of a 22 ring chromosome in three generations. *Hum Genet* 63,294–296.
- Taillemite JL, Van der Akker J, Portnoi MF, le Porrier N, Marmor D, Bouillie J and Roux Ch (1978) A case of ring Y chromosome. *Hum Genet* 42,89–91.
- Tzancheva M, Kaneva R, Kumanov P, Williams G and Tyler-Smith C (1999) Two male patients with ring Y: definition of an interval in Yq contributing to Turner syndrome. *J Med Genet* 36,549–553.
- Vermeesch JR, Baten E, Fryns J-P and Devriendt K (2002) Ring syndrome caused by ring chromosome 7 without loss of subtelomeric sequences. *Clin Genet* 62,415–417.
- Wegner RD, Scherer G, Pohlschmidt M, l’Allemand D and Gal A (1992) Ring Y chromosome: cytogenetic and molecular characterization. *Clin Genet* 42,71–75.
- Who Health Organization (1992) *Who Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen–Cervical Mucus Interaction*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

*Submitted on July 5, 2004; accepted on October 14, 2004*

**7.2. Sperm aneuploidy in fathers of Klinefelter's syndrome offspring  
assessed by multicolour fluorescent in situ hybridization using probes for  
chromosomes 6, 13, 18, 21, 22, x and Y.**

# Sperm aneuploidy in fathers of Klinefelter's syndrome offspring assessed by multicolour fluorescent *in situ* hybridization using probes for chromosomes 6, 13, 18, 21, 22, X and Y

Núria Arnedo<sup>1</sup>, Cristina Templado<sup>1</sup>, Yolanda Sánchez-Blanque<sup>1</sup>, Osvaldo Rajmil<sup>2</sup>  
and Carme Nogué<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra and <sup>2</sup>Servei d'Andrologia, Fundació Puigvert, 08025 Barcelona, Spain

<sup>3</sup>To whom correspondence should be addressed at: Unitat de Biologia Cel·lular, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. E-mail: carme.nogues@uab.es

**BACKGROUND:** It is still unclear if a recurrence risk would exist in fathers of an aneuploid offspring of paternal origin. We have studied disomy frequencies in spermatozoa from fathers having Klinefelter syndrome (KS) offspring or miscarriages. The effect of paternal age on sperm disomy percentages is also analysed. **METHODS:** Parental origin of 17 KS patients was carried out by amplification of X chromosome polymorphisms. Spermatozoa from their fathers were studied by multicolour fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) using probes for chromosomes 6, 13, 18, 21, 22, X and Y. **RESULTS:** In 53% of KS cases studied the additional X chromosome was of paternal origin. The paternally transmitted KS group of fathers showed significantly higher frequencies for XY disomy sperm as compared to fathers of the maternal-origin group. A correlation between paternal age and XY disomy frequencies was only found in the paternally derived cases. In contrast, similar disomy frequencies for all autosomes analysed were found in both groups of fathers. **CONCLUSIONS:** XY disomy frequencies increase with advancing paternal age only in fathers with paternally inherited KS offspring.

*Key words:* FISH analysis/Klinefelter syndrome/parental origin/paternal age/sperm aneuploidy

## Introduction

Trisomies are the most frequent chromosomal abnormalities in human newborns (0.3%) (Hassold *et al.*, 1996), and Klinefelter's syndrome (KS) is the most common sex-chromosome trisomy in humans (0.05% in newborns) (Thomas and Hassold, 2003). Most KS cases (98%) appear as a result of non-disjunction during meiosis and ~50% of them are paternally derived by an error during meiosis I (reviewed by Hassold and Hunt, 2001; Thomas and Hassold, 2003).

Fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) studies in sperm have shown an increase in the production of disomic sperm in fathers of aneuploid children of paternal origin. Increased frequencies of XY disomy and 21 disomy have been reported in Turner's syndrome fathers (Martínez-Pasarell *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2004) and in Down's syndrome fathers (Blanco *et al.*, 1998) respectively. However, in similar studies on KS fathers, no differences in XY disomy frequencies between paternally and maternally inherited KS children have been found (Eskenazi *et al.*, 2002).

Recently, Soares *et al.* (2001a,b) described a generalized tendency to meiotic non-disjunction in fathers with Down's or

Turner's syndrome children of paternal origin. These authors have enlarged their FISH studies to other chromosomes (4, 13, 18, 21, 22, X and Y) in addition to the chromosomes related to the aneuploid offspring and they have found increased disomy frequencies for chromosomes 13, 21, 22 and XY in both Down's and Turner's syndrome fathers.

The association between paternal age and fathering aneuploid offspring is still unclear. Lorda-Sanchez *et al.* (1992), using southern blots of restriction fragment-length polymorphisms (RFLP), reported that fathering a KS offspring might be associated with advanced paternal age. However, these results have not been confirmed by other authors (Thomas *et al.*, 2000; Thomas and Hassold, 2003). In fathers with a KS son, an association has also been found between higher XY disomy frequencies in sperm and advanced paternal age, but for both paternally and maternally KS-transmitted cases (Eskenazi *et al.*, 2002).

The objective of the present research is to determine whether: (i) fathers with KS offspring of paternal origin present an increase in disomy for chromosomes 6, 13, 18, 21,

22, X and Y; and (ii) an association between paternal age and increased disomy frequencies in sperm can be established.

## Materials and methods

### Subjects

The study was carried out in 17 families with a 47,XXY fetus or offspring (aged 0–33 years). Chromosome analysis was performed in amniocentesis cells (seven cases) when an altered triple screen or advanced maternal age was identified, and in blood samples (10 cases) when an abnormal male secondary sexual development or male infertility was detected. All 17 fathers analysed were healthy, normozoospermic and aged 33–59 years, and none of them had been exposed to known mutagens or radiation. FISH analysis results in sperm from individuals C01, C02, C03, C04, C05, C06, C07 and C08 have been previously published (Arnedo *et al.*, 2005). All samples were collected after obtaining informed consent from each subject or their parents, in the case of a child. The study was approved by our institutional Ethics Committee.

### PCR analysis

DNA from Klinefelter patients and their parents was extracted from peripheral blood samples using a standard salt procedure (Miller *et al.*, 1988). When a 47,XXY karyotype was detected during pregnancy, DNA was extracted using the same protocol from fetal tissue or amniotic cell cultures. Ten polymorphic microsatellite markers along the X chromosome were amplified by PCR to determine the parental origin of the extra X chromosome present in the KS patients: DXS1283E, DYSII, DMD49, MAO, DXS991, AR, DXS1196, DXS101, DXS1192 and DXS8377 (details about these markers can be downloaded at <http://www.gdb.org>).

For each PCR reaction, 0.4–1 µg of DNA were amplified in a final reaction volume of 50 µl containing 1% of standard PCR buffer (Ecogen), 250 µmol/l of each dNTP (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub> (Ecogen), 0.8 µmol/l of each primer (Research Genetics) and 0.5 IU Taq polymerase (Ecogen). DNA was amplified in a Perkin Elmer thermal cycle. Specific PCR conditions for each primer are summarized in Table I. Samples were loaded onto a 6% acrylamide:bisacrylamide (19:1) gel. Electrophoresis was performed at 8–14 mA for 7–12 h. The gel was then stained with ethidium bromide.

### Sperm preparation

Semen samples were washed in KCl 0.075 mol/l, fixed in methanol:acetic acid (3:1) and smeared onto clean slides.

### Probes

DNA centromeric probes for chromosomes 6 (1:1 mix of CEP6-Spectrum green and CEP6-Spectrum orange; Vysis Inc.), 18 (CEP18-Spectrum aqua; Vysis Inc.) and X (CEPX-Spectrum green; Vysis Inc.); locus-specific probes for chromosomes 13 (LSI13-Spectrum orange, locus RB-1; Vysis Inc.), 21 (LSI21-Spectrum orange, loci q22.14-q22.3; Vysis Inc.) and 22 (LSI22-Spectrum green, locus bcr; Vysis Inc.) and a DNA satellite probe for the Y chromosome (Y satIII-Spectrum aqua; Vysis Inc.) were used for the FISH analysis.

### Hybridization procedure

Details of sperm preparation and the hybridization procedure have been described elsewhere (Arnedo *et al.*, 2005). Briefly, sperm nuclei were decondensed by slide incubation in a solution of 5 mmol/l dithiothreitol and 1% Triton X-100 for 8–15 min, and denatured in 70% formamide at 73°C. Probes were denatured at 73°C for 5 min. Slides were hybridized in a dark chamber for 12–72 h at 37°C. Post-hybridization washes were performed according to the manufacturer's instructions (Vysis Inc.). DAPI-III counterstain (Vysis Inc.) and antifade were applied to slides prior to observation. Probes for chromosomes 6, 21, X and Y were hybridized simultaneously on one slide and probes for chromosomes 13, 18 and 22 were hybridized on another slide. Autosomes 13, 18 and 21 were chosen because they are involved in the most common autosomal trisomies among newborns (Hassold *et al.*, 1996) and chromosome 22 because only few studies have been published with a wide range of disomy frequencies (from 0.06 to 1.21%) (Martin and Rademaker, 1999; Soares *et al.*, 2001a,b). Chromosome 6 provided an internal control.

### Data collection and scoring criteria

A minimum of 10 000 sperm for each hybridization and donor was scored. Only slides with a hybridization efficiency of ≥99% were accepted for analysis. Parental origin of the syndrome was performed by PCR only when sperm FISH analysis was finished; thus, sperm nuclei scoring was blind. The scoring criteria applied have been described previously (Arnedo *et al.*, 2005). Briefly, chromosome disomy was considered when two signals of the same colour, comparable in brightness and size and separated from each other by a distance longer than the diameter of each one, were present. Slides were analysed under an Olympus AX70 epifluorescence microscope (Olympus Optical Co; Hamburg, Germany) equipped with a fluorescein isothiocyanate (FITC)/Texas Red/4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) triple-band pass filter, and a single-band pass filter for FITC, Texas Red and DAPI. Images were analysed with a Cytovision system (Applied Imaging; Sunderland, UK).

**Table I.** Specific PCR conditions for each primer analysed

Locus name	PCR conditions				
	Denaturation	Annealing	Extension	Cycles	Final extension
DXS1283E	94°C, 60 s	58°C, 60 s	72°C, 60 s	30	72°C, 7 min
DYS II	94°C, 30 s	55°C, 30 s	63°C, 4 min	24	63°C, 10 min
DMD49	94°C, 30 s	62°C, 30 s	65°C, 4 min	24	65°C, 10 min
MAO	95°C, 45 s	58°C, 45 s	72°C, 2 min	30	72°C, 10 min
DXS991	94°C, 60 s	55°C, 30 s	72°C, 30 s	26	72°C, 6 min
AR	94°C, 60 s	58°C, 2 min	72°C, 2 min	30	72°C, 10 min
DXS1196	95°C, 45 s	63°C, 45 s	72°C, 2 min	30	72°C, 10 min
DXS101	95°C, 45 s	60°C, 30 s	72°C, 30 s	26	72°C, 10 min
DXS1192	94°C, 45 s	54°C, 45 s	72°C, 30 s	26	72°C, 7 min
DXS8377	94°C, 45 s	55°C, 45 s	72°C, 45 s	26	72°C, 10 min

**Statistical analysis**

To determine if there were any significant differences in disomy and diploidy between individuals and between paternal and maternal groups, a two-tailed Fisher's exact test was used. The Bonferroni correction was applied to *post hoc* multiple comparisons. Linear regression analysis was performed between paternal age and XY disomy percentage for each parental-origin group. Covariance analysis with interaction was used to compare the ages' slopes between the paternal origin (PO) and maternal origin (MO) father groups.

**Results**

The parental origin of the additional X chromosome in KS offspring or miscarriages was paternal in nine cases (53%) and maternal in eight cases (47%). All families were informative for at least one polymorphism in Xp and one in Xq. The most informative polymorphism was DYS-II (13 of 17 patients) and the least informative was DXS991 (two of 17 patients).

A total of 356 535 decondensed sperm nuclei was analysed by three- and four-colour FISH: 189 837 from the PO group of fathers and 166 698 from the MO group of fathers (Table II). Disomy frequencies for chromosomes 6, 13, 18, 21, 22, X and Y from fathers of the PO group (mean age 47.7 years) were compared with those from fathers of the MO group (mean age 43.4 years). Diploidy frequencies obtained from both FISH analyses were not statistically different. The ratio of X-bearing sperm versus Y-bearing sperm was 1:1 in both groups, as expected. Disomy frequencies for any chromosome studied and for diploidy were similar among individuals in fathers of the MO group. In contrast, the PO group presented inter-individual differences only for XY disomy. The PO group of fathers showed significantly increased ( $P < 0.05$ ) mean frequencies for XY disomic sperm (0.51%), as compared to MO

fathers' mean frequencies (0.27%). No significant differences were found between PO and MO groups, neither for autosomal disomy frequencies (6, 13, 18, 21 and 22) nor for diploidy (see Table II), except for individual C15, who presented increased frequencies for disomy XY, disomy 18 and diploidy.

In order to determine whether there was a correlation between paternal age and XY disomy frequencies, in both groups, a covariance analysis with interaction was applied. In maternally derived cases the slope of the linear regression analysis was 0.003, close to 0 ( $P = 0.489$ ), whereas in paternally derived cases the slope was 0.031, significantly different from 0 ( $P = 0.044$ ) (Figure 1). The differences between the two slopes approach significance ( $P = 0.087$ ).

**Discussion**

FISH studies in sperm from fathers of 47,XXY offspring were carried out to analyse disomy frequencies for sex chromosomes and for autosomes 6, 13, 18, 21 and 22 in paternally and maternally transmitted KS cases.

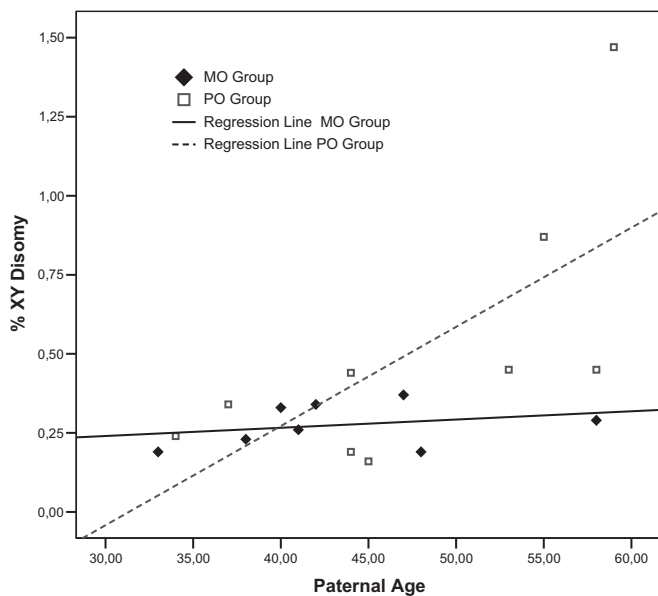
Our results on parental-origin analysis of the syndrome indicated that 53% of the cases studied were of paternal origin. According to the literature, 50% of 47,XXY males are derived from paternal non-disjunction (Hassold *et al.*, 1991; Thomas and Hassold, 2003).

In the present study, an age effect in XY disomy frequencies was found in fathers with KS offspring of paternal origin, but not in fathers with KS offspring of maternal origin. Other authors (Eskenazi *et al.*, 2002) studying sperm aneuploidy in fathers of boys with Klinefelter's syndrome did not find significantly higher frequencies of disomy for chromosomes X, Y or 21 in the paternal group. Even if the frequency of XY disomy

**Table II.** Numerical chromosomal abnormalities in sperm from fathers of Klinefelter syndrome offspring of maternal and paternal origin

Father	Age	% disomy								% diploidy
		6	13	18	21	22	XX	YY	XY	
Maternal origin										
C02	33	0.03	0.05	0.02	0.14	0.03	0.08	0.05	0.19	0.11
C03	38	0.01	0.06	0.04	0.24	0.05	0.08	0.06	0.23	0.13
C04	40	0.03	0.04	0.03	0.16	0.05	0.10	0.04	0.33	0.22
C05	41	0.07	0.06	0.04	0.46	0.02	0.09	0.12	0.26	0.19
C01	42	0.10	0.05	0.03	0.33	0.03	0.12	0.04	0.34	0.16
C07	47	0.06	0.05	0.03	0.27	0.03	0.08	0.08	0.37	0.21
C06	48	0.05	0.05	0.03	0.40	0.04	0.14	0.07	0.19	0.19
C08	58	0.03	0.08	0.04	0.17	0.07	0.06	0.08	0.29	0.12
Mean	43.4	0.05	0.05	0.03	0.27	0.04	0.09	0.07	0.27	0.17
Paternal origin										
C09	34	0.07	0.07	0.04	0.16	0.03	0.07	0.08	0.24	0.11
C10	37	0.05	0.08	0.06	0.10	0.04	0.08	0.07	0.34	0.12
C11	44	0.04	0.05	0.04	0.16	0.05	0.07	0.06	0.19	0.10
C12	44	0.03	0.06	0.04	0.08	0.07	0.04	0.05	0.44 <sup>b</sup>	0.11
C13	45	0.03	0.06	0.08	0.16	0.07	0.04	0.02	0.16	0.08
C14	53	0.04	0.05	0.05	0.10	0.02	0.04	0.07	0.45 <sup>a</sup>	0.09
C15	55	0.07	0.15	0.15 <sup>a</sup>	0.06	0.04	0.11	0.07	0.87 <sup>a</sup>	0.40 <sup>a</sup>
C16	58	0.08	0.08	0.05	0.16	0.04	0.04	0.04	0.45 <sup>a</sup>	0.10
C17	59	0.04	0.12	0.08	0.22	0.10	0.07	0.04	1.47 <sup>a</sup>	0.19
Mean	47.7	0.05	0.08	0.07	0.13	0.05	0.06	0.06	0.51 <sup>a</sup>	0.16

<sup>a</sup>Frequency increased significantly ( $P < 0.05$ ) when compared with maternal-origin group.<sup>b</sup>Frequency close to significance ( $P = 0.06$ ) when compared with maternal-origin group.



**Figure 1.** Linear regression analysis between paternal age and XY disomy percentage for maternal (MO) and paternal origin (PO) fathers groups.

in PO fathers (0.51%) reported in the present work is clinically low, it is, on average, almost twice the percentage of the MO donors (0.28%). It is well known that the sex bivalent is the most prone to non-disjunction during male meiosis because of the existence of a single chiasma located in the pseudo-autosomal region (PAR1) (reviewed by Thomas and Hassold, 2003). Several studies have related the lack of recombination in the PAR1 region to an increase in the susceptibility of the XY bivalent to non-disjunction and aneuploid sperm (Shi *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2004). A significant reduction in recombination for the XY chromosome pair has been detected in paternally derived KS cases (Hassold *et al.*, 1991; Lorda-Sanchez, 1992; Thomas *et al.*, 2000), and also in maternally transmitted 47,XXY cases (reviewed by Thomas and Hassold, 2003).

Increased disomy frequencies for the chromosome pair implicated in the aneuploid offspring have also been detected in fathers of Down's and Turner's syndromes offspring (Blanco *et al.*, 1998; Martinez-Pasarell *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2004). Moreover, in these fathers, a generalized tendency to meiotic non-disjunction for chromosomes 13, 21, 22 and XY has been described, but not for chromosome 18 (Soares *et al.*, 2001a,b). Our results did not show an increase in disomy for any of the autosomes analysed, except for individual C15, indicating that the susceptibility to meiotic non-disjunction, in fathers with a 47,XXY offspring, is limited to the XY chromosome pair. There are several reasons that could explain this discrepancy: the difference in the sample size used in both studies and, as mentioned by the same authors (Soares *et al.*, 2001b), the inter-individual variations in the degree of susceptibility to meiotic errors.

When a linear regression analysis between paternal age and XY disomy frequencies was considered, only the PO fathers group presented an age-effect increase in the rate of XY disomy. Lowe *et al.* (2001) found an association between paternal age

and increased frequencies of 24,XY sperm in fathers with KS sons, but this increase was observed in both paternally and maternally derived cases. One year later, Eskenazi *et al.* (2002), apparently using the same data and dividing fathers according to parental origin, attributed the XY disomy increase to paternal age but not to maternal origin. The difference between their results and ours could be attributed to the paternal-age mean (42.4 versus 47.7, respectively) and to the inter-individual differences described in the general population for sperm disomy frequencies (reviewed by Templado *et al.*, 2005). Some studies carried out in sperm samples from healthy men, using FISH, have demonstrated a donor age-effect specifically for the sex chromosomes (Robbins *et al.*, 1995; Griffin *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1995; Kinakin *et al.*, 1997; reviewed by Bosch *et al.*, 2001 and Templado *et al.*, 2005). A correlation between increased paternal age and reduced recombination in the XY bivalent has been reported by Lorda-Sanchez *et al.* (1992) but not in other studies (Thomas and Hassold, 2003). In women, an association has also been described between increased age and reduced recombination but only for some specific chromosomes (reviewed by Thomas and Hassold, 2003). Furthermore, some authors have described, in idiopathic infertile patients, the possibility that an age-related dysfunction in the X-chromosome centromere may explain the increase of XY disomy in sperm as age increases (Asada *et al.*, 2000). Even though very little is known about the influence of genetic factors in baseline levels of sperm aneuploidy and how ageing may result in stable increases over time, it is possible that meiotic dysfunctions could increase over time and could be only statistically perceptible some years later.

In conclusion, XY disomy frequencies increase with advancing paternal age in fathers with paternally inherited KS offspring, whereas this age-related increase is not observed in fathers with maternally inherited KS offspring. However, in order to further reinforce this conclusion, the number of cases studied should be increased. This susceptibility to non-disjunction has not been detected in the autosomes analysed (6, 13, 18, 21 and 22). Nevertheless, more studies would be necessary to demonstrate the association between paternal age and increase in disomy and to establish the risk of fathering an aneuploid child in fathers of KS offspring.

### Acknowledgements

Financial support was given by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project BFI2002-01193) and the Generalitat de Catalunya (2001SGR-00201 and 2001SGR-00202), Spain. Núria Arnedo was the recipient of a grant from the Universitat Autònoma de Barcelona during 2001. The English of this manuscript was corrected by Chuck Simons.

### References

- Arnedo N, Nogués C, Bosch M and Templado C (2005) Mitotic and meiotic behaviour of a naturally transmitted ring Y chromosome: reproductive risk evaluation. *Hum Reprod* 20,462–468.
- Asada H, Sueoka K, Hashiba T, Kuroshima M, Kobayashi N and Yoshimura Y (2000) The effects of age and abnormal sperm count on the nondisjunction of spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 17,51–59
- Blanco J, Gabau E, Gómez D, Baena N, Guitart M, Egozcue J and 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.

- Bosch M, Rajmil O, Martínez-Pasarell O, Egozcue J and Templado C (2001) Linear increase of diploidy in human sperm with age: a four-colour FISH study. *Eur J Hum Genet* 9,533–538.
- Eskenazi B, Wyrobek AJ, Kidd SA, Lowe X, Moore II D, Weisiger K and Aylstock M (2002) Sperm aneuploidy in fathers of children with paternally and maternally inherited Klinefelter syndrome. *Hum Reprod* 17,576–583.
- Griffin DK, Abruzzo MA, Millie EA, Sheean LA, Feingold E, Sherman SL and Hassold TJ (1995) Non-disjunction in human sperm: evidence for an effect of increasing paternal age. *Hum Mol Genet* 4,2227–2232.
- Hassold TJ and Hunt PA (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Rev Genet* 2,280–291.
- Hassold TJ, Sherman SL, Pettay D, Page DC and Jacobs PA (1991) XY-chromosome nondisjunction in man is associated with diminished recombination in the pseudoautosomal region. *Am J Hum Genet* 49,253–260.
- Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J and Zaragoza M (1996) Human aneuploidy: incidence, origin and etiology. *Environ Mol Mut* 28,167–175.
- Kinakin B, Rademaker A and Martin RH (1997) Paternal age effect of YY aneuploidy in human sperm, as assessed by fluorescence in situ hybridisation. *Cytogenet Cell Genet* 78,116–119.
- Lorda-Sanchez I, Binkert F, Maechler M, Robinson WP and Schinzel AA (1992) Reduced recombination and paternal age effect in Klinefelter syndrome. *Hum Genet* 89,524–530.
- Lowe X, Eskenazi B, Nelson DO, Kidd S, Alme A and Wyrobek AJ (2001) Frequency of XY sperm increases with age in fathers of boys with Klinefelter syndrome. *Am J Hum Genet* 69,1046–1054.
- Martin RH and Rademaker A (1999) Nondisjunction in human sperm: comparison of frequencies in acrocentric chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 86,43–45.
- Martin RH, Spriggs E, Ko E and Rademaker AW (1995) The relationship between paternal age, sex ratios, and aneuploidy frequencies in human sperm, as assessed by multicolour FISH. *Am J Hum Genet* 57,1395–1399.
- Martínez-Pasarell O, Nogués C, Bosch M, Egozcue J and Templado C (1999) Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patient. *Hum Genet* 104,345–349.
- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 16,1215.
- Robbins WA, Baulch JE, Moore D 2nd, Weier HU, Blakey D and Wyrobek AJ (1995) Three-probe fluorescence in situ hybridisation 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.
- Shi Q, Spriggs E, Field LL, Ko E, Barclay L and Martin RH (2001) Single sperm typing demonstrates that reduced recombination is associated with the production of aneuploid 24, XY human sperm. *Am J Med Genet* 99,34–38.
- Soares SR, Templado C, Blanco J, Egozcue J and Vidal F (2001a) Numerical chromosome abnormalities in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 of paternal origin: generalised tendency to meiotic non-disjunction. *Hum Genet* 108,134–139.
- Soares SR, Vidal F, Bosch M, Martínez-Pasarell O, Nogués C, Egozcue J and Templado C (2001b) Acrocentric chromosome disomy is increased in spermatozoa from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 108,499–503.
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker A, Navarro J, Benet J and Martin RH (2004) Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am J Hum Genet* 74,521–531.
- Tang SS, Gao H, Robinson WP, Ho Yuen B and Ma S (2004) An association between sex chromosomal aneuploidy in sperm and an abortus with 45, X of paternal origin: possible transmission of chromosomal abnormalities through ICSI. *Hum Reprod* 19,147–151.
- Templado C, Bosch M and Benet J (2005) Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genoma Res*, 111: (DOI:10.1159/000086890).
- Thomas NS and Hassold TJ (2003) Aberrant recombination and the origin of Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Update* 9,309–317.
- Thomas NS, Collins AR, Hassold TJ and Jacobs PA (2000) A reinvestigation of non-disjunction resulting in 47, XXY males of paternal origin. *Eur J Hum Genet* 8,805–808.

*Submitted on June 10, 2005; resubmitted on August 31, 2005; accepted on September 1, 2005*