







VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA

---

VALOR DE LOS ESTUDIOS CROMOSÓMICOS EN  
ESPERMATOZOIDES MEDIANTE LA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN *IN*  
*SITU* FLUORESCENTE (FISH) EN PAREJAS ESTÉRILES

---

Memoria realizada por D<sup>a</sup> Lorena Rodrigo Vivó para optar al  
Grado de Doctor por la Universitat de València

Dirigida por: Dr. Manuel Gil-Salom, Prof. Carlos Simón Vallés  
y Dra. Carmen Rubio Lluesa

VALENCIA, 2013

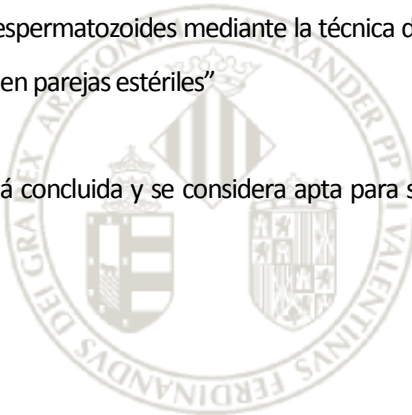


Dr. Manuel Gil-Salom, Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la  
Facultad de Medicina de Valencia

CERTIFICO:

Que D<sup>a</sup> Lorena Rodrigo Vivó ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Valor de los estudios cromosómicos en espermatozoides mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en parejas estériles”

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa públicas.



Valencia, 18 de julio de 2013

Fdo: Dr. Manuel Gil-Salom

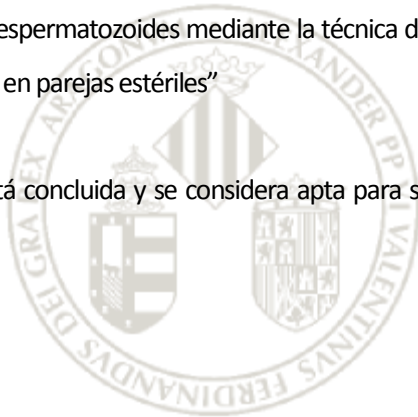


Prof. Carlos Simón Vallés, Catedrático de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia y Director Científico del Instituto Valenciano de Infertilidad y de Iviomics

CERTIFICO:

Que D<sup>ª</sup> Lorena Rodrigo Vivó ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Valor de los estudios cromosómicos en espermatozoides mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en parejas estériles”

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa públicas.



Valencia, 18 de julio de 2013

Fdo: Prof. Carlos Simón Vallés



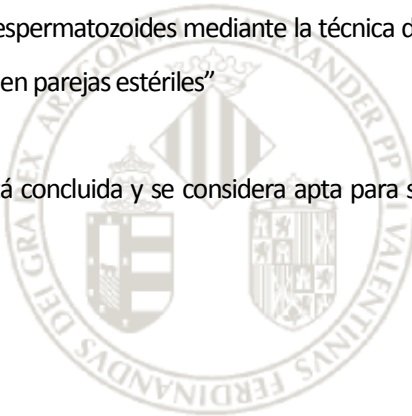


Dra. Carmen Rubio Lluesa, Directora de la Unidad de Diagnóstico Genético Preimplantacional Cromosómico de Iviomics

CERTIFICO:

Que D<sup>a</sup> Lorena Rodrigo Vivó ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Valor de los estudios cromosómicos en espermatozoides mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en parejas estériles”

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa públicas.



Valencia, 18 de junio de 2013

Fdo: Dra. Carmen Rubio Lluesa



El presente trabajo de tesis doctoral se ha realizado en las instalaciones del Instituto Valenciano de Infertilidad y en las instalaciones de Iviomics, con la financiación parcial del Instituto de la Mediana y Pequeña Industria Valenciana (IMPIVA: proyecto N° IMIDTZ/2008/106, IMIDTZ/2008/25, IMIDTF/2009/135) e IZASA S.A., Compañía CH-Werfen, España.





*A Toni, Marc i Irene*

*Als meus pares*

*Caminante, son tus huellas  
el camino y nada más;  
caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar.*

*Al andar se hace camino,  
y al volver la vista atrás  
se ve la senda que nunca  
se ha de volver a pisar.*

*Caminante no hay camino  
sino estelas en la mar.*

Antonio Machado



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. GAMETOGÉNESIS MASCULINA	3
1.1.1. Fases de la espermatogénesis	4
1.1.2. Alteraciones meióticas y puntos de control de la meiosis	8
1.1.3. Mecanismos implicados en la segregación anómala de los cromosomas durante la meiosis	10
1.1.4. Regulación hormonal de la espermatogénesis	13
1.1.5. Apoptosis y control de la espermatogénesis	15
1.2. ETIOLOGÍA DE LA INFERTILIDAD MASCULINA	16
1.2.1. Anomalías cromosómicas <i>de novo</i>	17
1.2.2. Varones portadores de anomalías cromosómicas	18
1.2.3. Defectos génicos	19
1.3. ESTUDIOS DE MEIOSIS EN VARONES INFÉRTILES	20
1.4. ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN ESPERMATOZOIDES MEDIANTE FISH	23
1.4.1. Varones con cariotipo alterado	25
1.4.2. Varones con cariotipo normal	26
1.5. DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL EN LA INFERTILIDAD MASCULINA	28
1.5.1. DGP en factor masculino severo	29
1.6. HIPÓTESIS DE TRABAJO	30
<b>2. OBJETIVOS</b>	33
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	37
3.1. MUESTRAS ANALIZADAS	39
3.1.1. Grupos de estudio	39
3.1.2. Grupos control	40
3.2. MÉTODOS	42
3.2.1. Obtención de espermatozoides	42
3.2.2. Análisis cromosómico de espermatozoides	43
3.2.2.1. Fijación de las muestras	43
3.2.2.2. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	44
3.2.2.3. Evaluación de las señales de hibridación	47
3.2.3. Análisis cromosómico de embriones	49
3.2.3.1. Biopsia y procesado de blastómeros previo al análisis	49
3.2.3.2. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	52
3.2.3.3. Evaluación de las señales de hibridación	56
<b>4. RESULTADOS</b>	59
4.1. INCIDENCIA DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS EN ESPERMATOZOIDES DE EYACULADO DE VARONES INFÉRTILES	61

4.1.1.	Relación de los parámetros seminales con el resultado del FISH	61
4.1.2.	Relación de los parámetros seminales con las diferentes anomalías observadas en el FISH	66
4.1.3.	Relación de la edad del varón con las diferentes anomalías observadas en el FISH	70
4.1.4.	Relación de la indicación con el resultado del FISH	72
4.2.	<b>INCIDENCIA DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS EN ESPERMATOZOIDES DE TESTÍCULO DE VARONES INFÉRTILES CON AZOOSPERMIA</b>	77
4.2.1.	FISH de espermatozoides procedentes de eyaculado y testículo de varones fértiles: control de eyaculado y control de testículo	77
4.2.2.	FISH de espermatozoides procedentes de biopsias de testículo de varones infértiles con azoospermia obstructiva y azoospermia secretora	79
4.3.	<b>RESULTADOS CLÍNICOS EN PAREJAS CON INFERTILIDAD MASCULINA Y CON PRESENCIA DE ESPERMATOZOIDES EN EYACULADO</b>	83
4.3.1.	Resultados en función del resultado del estudio de FISH en espermatozoides	83
4.3.2.	Estudios de asociación de las alteraciones cromosómicas en los espermatozoides con los resultados clínicos	87
	4.3.2.1. <i>Asociación con los resultados clínicos de FIV/ICSI convencional</i>	88
	4.3.2.2. <i>Asociación con los resultados clínicos de DGP</i>	92
4.3.3.	Relación de los resultados clínicos con los cuartiles de las diferentes anomalías observadas en los espermatozoides	96
4.4.	<b>RESULTADOS CLÍNICOS EN VARONES INFÉRTILES CON AZOOSPERMIA</b>	100
4.4.1.	ICSI en varones con azoospermia obstructiva y azoospermia secretora	100
4.4.2.	FISH en espermatozoides e ICSI en varones con azoospermia secretora	101
4.5.	<b>RELACIÓN ENTRE LAS ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS ESPERMÁTICAS Y LAS ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EMBRIONARIAS</b>	103
4.5.1.	Estudio de correlación entre la incidencia de alteraciones cromosómicas espermáticas y el porcentaje de embriones anormales	103
4.5.2.	Evaluación del efecto de los diferentes tipos de anomalías cromosómicas en los espermatozoides sobre la constitución cromosómica en embriones preimplantatorios	105
4.5.3.	Análisis de la incidencia de embriones con anomalías cromosómicas potencialmente viables, en función del patrón de anomalía cromosómica observado en espermatozoides	111
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	113
5.1.	<b>ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS EN LOS ESPERMATOZOIDES</b>	115
5.1.1.	Incidencia basal en varones normozoospermicos	115
5.1.2.	Influencia de los parámetros seminales en el resultado del FISH en parejas infértiles	118
5.1.3.	Influencia de otros factores en el resultado del FISH en espermatozoides de eyaculado	121
5.1.4.	Incidencia en espermatozoides de testículo de varones azoospermicos	124
5.2.	<b>IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LOS RESULTADOS DEL FISH EN ESPERMATOZOIDES</b>	125
5.2.1.	<u>Cómo</u> afecta el resultado de FISH anormal vs. FISH normal al éxito reproductivo tras FIV/ICSI	126
5.2.2.	<u>Cuánto</u> influye el nivel de anomalías observadas en espermatozoides	128
5.2.3.	<u>Opciones reproductivas</u> en varones con FISH anormal	129



5.2.4. Riesgo genético de los diferentes tipos de anomalías observadas en espermatozoides	133
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>137</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>141</b>
<b>8. APÉNDICE DOCUMENTAL</b>	<b>159</b>
<b>9. SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS</b>	<b>163</b>
<b>10. AGRADECIMIENTOS</b>	<b>167</b>



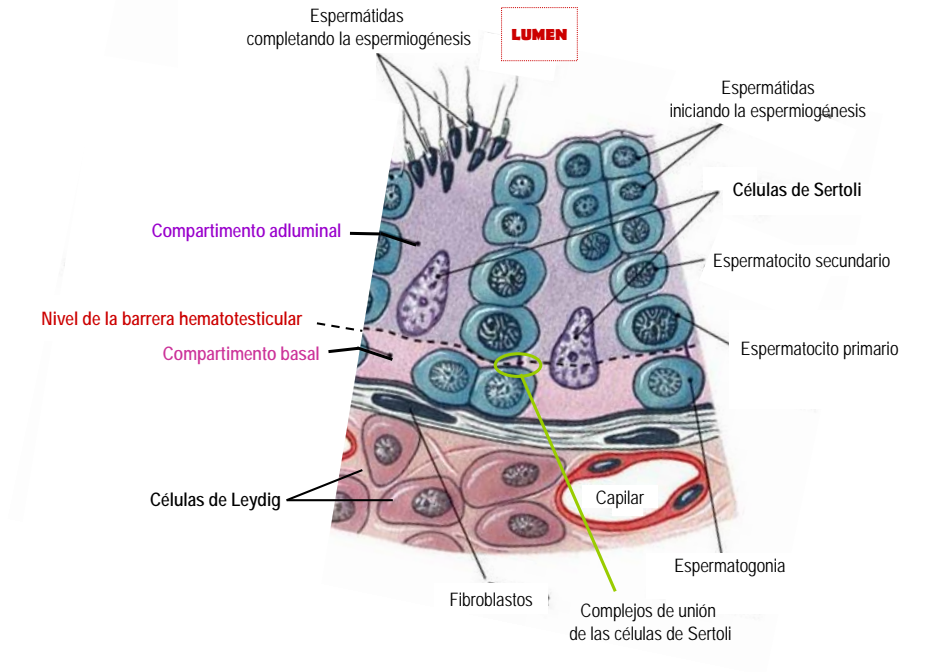
# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1. GAMETOGÉNESIS MASCULINA

La gametogénesis masculina o **espermatogénesis** tiene lugar en el interior de los túbulos seminíferos de los testículos humanos. Se inicia en la lámina basal de los túbulos seminíferos, a partir de células germinales diploides (46 cromosomas). Estas células sufren un complejo proceso de división y diferenciación que culmina en la formación de gametos masculinos haploides (23 cromosomas) y en su liberación a la luz de los túbulos seminíferos.

Las **células de Sertoli** constituyen el soporte estructural del epitelio germinal (Figura I-1). Son células grandes que se extienden desde la lámina basal hasta la luz del túbulo seminífero, que sujetan y nutren a los diferentes tipos celulares de la línea germinal. Las células de Sertoli adyacentes se unen estrechamente entre sí por complejos de unión, formando la **barrera hematotesticular**, que divide al túbulo seminífero en dos compartimentos, un **compartimento basal** que contiene las células germinales premeióticas, y un **compartimento adluminal** con las células germinales posmeióticas. Los complejos de unión de la barrera hematotesticular sufren procesos de disolución y reaparición sincronizados, que permiten la migración de las células germinales desde el compartimento basal hasta el adluminal. En el tejido intersticial situado entre los túbulos seminíferos se encuentran las **células de Leydig** (esenciales para la regulación de la espermatogénesis), macrófagos y linfocitos, tejido conjuntivo, vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. Así pues, la barrera hematotesticular aísla a las células germinales del compartimento adluminal del sistema inmunológico sanguíneo, generando un microambiente único para el desarrollo de la espermatogénesis.



**Figura I-1.** Distribución de las células implicadas en la espermatogénesis en una sección transversal de un túbulo seminífero humano.  
 (a partir de: [http://163.178.103.176/Fisiologia/fendocrino/ejercicios/ejercicio2/endo\\_ejercicio2\\_5.html](http://163.178.103.176/Fisiologia/fendocrino/ejercicios/ejercicio2/endo_ejercicio2_5.html))

### 1.1.1. Fases de la espermatogénesis

La espermatogénesis consta de tres fases: proliferativa, meiosis y espermiogénesis.

- **Fase proliferativa**

Las células germinales inmaduras o **espermátogonias** se encuentran en el compartimento basal de los túbulos seminíferos, donde se dividen continuamente por mitosis generando una progenie con capacidad de dividirse indefinidamente (*células madre espermátogonias*) y otra progenie (*espermátogonia en maduración*) que dejan de proliferar cuando se alcanza la madurez sexual y se diferencian a **espermátocitos primarios (I)**, que son células diploides con 23 parejas de cromosomas homólogos con dos cromátidas hermanas cada uno ( $2n, 2c$ ).

- **Meiosis**

Seguidamente, los espermatocitos primarios atraviesan la barrera hematotesticular y se localizan en el compartimento adluminal del túbulo seminífero, donde sufren dos divisiones meióticas sucesivas, la meiosis I, y la meiosis II.

### Meiosis I

La primera división meiótica o meiosis I, es una **división reduccional** que consta de cuatro fases: *profase I*, *metafase I*, *anafase I* y *telofase I* (Nussbaum et al., 2005; Alberts et al., 1994).

Previo a la profase I, los espermatocitos primarios replican su ADN, duplicando el número de cromátidas hermanas por cromosoma ( $2n$ ,  $4c$ ), y entran en **profase I**, proceso que consta de cinco etapas muy bien caracterizadas (Burgoyne et al., 2009; Handel and Schimenti, 2010) (Figura I-2):

- **Leptotene:** los cromosomas comienzan a condensarse y los telómeros se unen y agrupan en una envoltura nuclear para facilitar el alineamiento y aproximación de los cromosomas homólogos. Cada par de cromátidas hermanas comienza a ensamblar un único complejo proteico llamado **elemento axial** con la ayuda de **cohesinas** y de proteínas específicas del complejo sinaptonémico. Las cromátidas hermanas están programadas genéticamente para que se produzcan **roturas de la doble cadena de ADN** que proporcionan el sustrato para la posterior recombinación. La maquinaria de **reparación por recombinación homóloga** reconoce las roturas y se co-localiza con estructuras electrodensas llamadas **nódulos de recombinación** a lo largo de los elementos axiales en desarrollo.
- **Cigotene:** Los cromosomas homólogos comienzan a emparejarse a lo largo de toda su longitud mediante el proceso llamado **sinapsis**, gracias a una estructura proteica dispuesta longitudinalmente a lo largo de cada cromosoma, llamada **complejo**

**sinaptonémico.** Este complejo proteico está compuesto por un grupo triple de bandas en paralelo: dos **elementos laterales** adheridos cada uno a un cromosoma homólogo (lo que anteriormente eran los elementos axiales) y un elemento central paralelo unido por **filamentos transversales**.

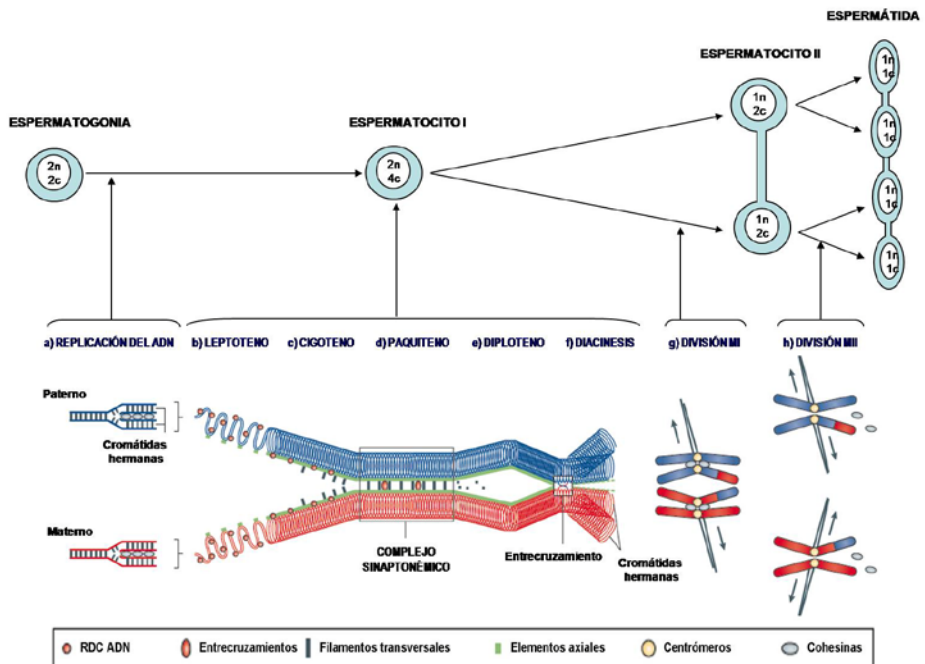
- **Paquitene:** los cromosomas completan la sinapsis, formando una estructura con una unión estrecha de cada par de cromosomas homólogos denominada **bivalente**. Las roturas de doble cadena son reparadas utilizando el ADN de la cromátida hermana como molde, excepto en algunos puntos calientes donde se produce **entrecruzamiento o recombinación** entre los cromosomas homólogos.
- **Diplotene:** desaparece el complejo sinaptonémico y los componentes de cada bivalente empiezan a separarse uno del otro, permaneciendo los cromosomas homólogos unidos únicamente por los **quiasmas** o puntos de recombinación.
- **Diacinesis:** los cromosomas alcanzan su máxima condensación. Los elementos longitudinales se sueltan y las cohesinas que unen las cromátidas hermanas se eliminan, excepto en los centrómeros.

La meiosis I continúa con la **metafase I**, formándose un huso meiótico en cuyo plano ecuatorial se alinean los cromosomas homólogos apareados, con sus centrómeros orientados hacia polos diferentes. En **anafase I**, los dos miembros de cada bivalente se separan y sus centrómeros con sus dos cromátidas hermanas se dirigen hacia polos opuestos de la célula, proceso denominado **disyunción**. En la **telofase I**, cada conjunto de cromosomas homólogos se encuentran agrupados en polos opuestos de la célula, momento en el cual se produce la **división MI**. El espermatocito primario se divide en dos **espermatoцитos secundarios (II)** haploides, con 23 cromosomas cada uno con dos cromátidas hermanas (1n, 2c).



**Meiosis II**

Los espermaticitos secundarios sufren una segunda división meiótica o meiosis II. Se trata de una **división ecuacional**, similar a una mitosis excepto en que no se produce replicación del ADN. Se divide también en cuatro fases: *profase II*, *metafase II*, *anafase II* y *telofase II*. Así, en la **división III**, las cohesinas existentes entre las cromátidas hermanas son eliminadas y cada espermaticito secundario se divide en dos **espermátidas** haploides, con 23 cromosomas con una cromátida hermana cada una ( $1n, 1c$ ).



**Figura I-2.** Esquema de la profase I de la meiosis masculina. 'n' representa ploidía (número de cromosomas del mismo par); 'c' representa número de cromátidas hermanas por cromosoma; RDC=rotura de doble cadena ADN.

(a partir de Burgoyne et al., 2009)

- **Espermiogénesis**

Las espermatidas sufren una diferenciación morfológica a **espermatozoides maduros** mediante un proceso denominado **espermiogénesis**, caracterizada por: a) la elevada condensación del núcleo asociada a modificaciones químicas en el ADN y en las proteínas nucleares, produciéndose una sustitución de histonas por protaminas; b) la formación del acrosoma a partir del aparato de Golgi; c) el desarrollo del flagelo a partir de los centriolos; d) y la eliminación de la mayor parte del citoplasma (Gil-Salom et al., 2002).

En la espermatogénesis, la citocinesis que acompaña a ambas divisiones meióticas es incompleta, de manera que las células hijas quedan en el interior de **sincitios** comunicadas por puentes citoplasmáticos. Al final de la espermiogénesis, los espermatozoides se liberan a la luz del túbulo seminífero y los sincitios se convierten en **cuerpos residuales**.

### **1.1.2. Alteraciones meióticas y puntos de control de la meiosis**

Los errores meióticos ligados a los procesos de sinapsis, recombinación y reparación del ADN, interfieren en el proceso normal de la meiosis pudiendo dar lugar a una segregación anómala de los cromosomas homólogos (meiosis I) o las cromátidas hermanas (meiosis II) y generar espermatozoides portadores de alteraciones cromosómicas numéricas (aneuploides o diploides). A lo largo de la meiosis existen **puntos de control** o **“checkpoints”** que regulan las diferentes etapas de la meiosis y eliminan “parcialmente” las células germinales defectuosas para asegurar la formación de espermatozoides con dotación cromosómica correcta. Por ello, la espermatogénesis puede detenerse en cualquier estadio madurativo de la línea germinal afectando a todas las líneas celulares germinales (bloqueo completo), o sólo a algunas (bloqueo parcial).

- **Errores de sinapsis y de reparación de ADN**

La **asinapsis** o error total de sinapsis es un fenómeno poco frecuente que consiste en la ausencia total de apareamiento o en un apareamiento muy incompleto de los cromosomas homólogos en profase I. La **desinapsis** o error parcial de sinapsis es más frecuente, y consiste en un apareamiento alterado de los cromosomas homólogos en profase I. Los errores de sinapsis pueden afectar a un único bivalente, a varios o a la mayoría de ellos, y se pueden producir en todas las células meióticas en división o coexistir con líneas celulares normales (Egozcue et al., 2005). Si existen regiones cromosómicas con errores de sinapsis, la maquinaria de reparación de las roturas de doble cadena en el ADN por recombinación homóloga no puede tener acceso al cromosoma homólogo y no actúa. Como consecuencia, si continúa la meiosis se produce una entrada prematura a metafase I y anafase I, dando lugar a una separación precoz de bivalentes.

El **punto de control en paquitene** (“Pachytene Checkpoint”) controla los procesos de reparación de las roturas de doble cadena de ADN y la sinapsis de la meiosis I, de manera que si al final de paquitene I estos dos procesos no han finalizado correctamente, detiene la división meiótica (Roeder and Bailis, 2000).

- **Errores de recombinación**

Los quiasmas son necesarios para mantener la estabilidad de las bivalentes y su alineación correcta en el plano ecuatorial del huso meiótico (revisado en Hassold and Hunt, 2001). Tienen una distribución cromosoma-dependiente marcada epigenéticamente, siendo menor en las regiones pericentroméricas en las células germinales masculinas (revisado en Handel and Schimenti, 2010). Una alineación correcta permite a los cinetócoros de cada cromosoma homólogo capturar microtúbulos de polos opuestos, generando una tensión que estabiliza el huso meiótico (Nicklas, 1997). Un número reducido de quiasmas o una distribución anómala pueden

afectar a la alineación correcta de los cromosomas, exponiendo a ambos cinetócoros a los microtúbulos de un mismo polo.

El **punto de control de la anafase I** (“Spindle assembly checkpoint” (SAC)) controla la unión cinetócoro/microtúbulo e inhibe la disolución de cohesinas entre los cromosomas homólogos, asegurando que la división I no ocurra hasta que los bivalentes estén correctamente alineados en el huso meiótico (revisado en Handel and Schimenti, 2010; Malmanche et al., 2006; Nicklas, 2007).

### **1.1.3. Mecanismos implicados en la segregación anómala de los cromosomas durante la meiosis**

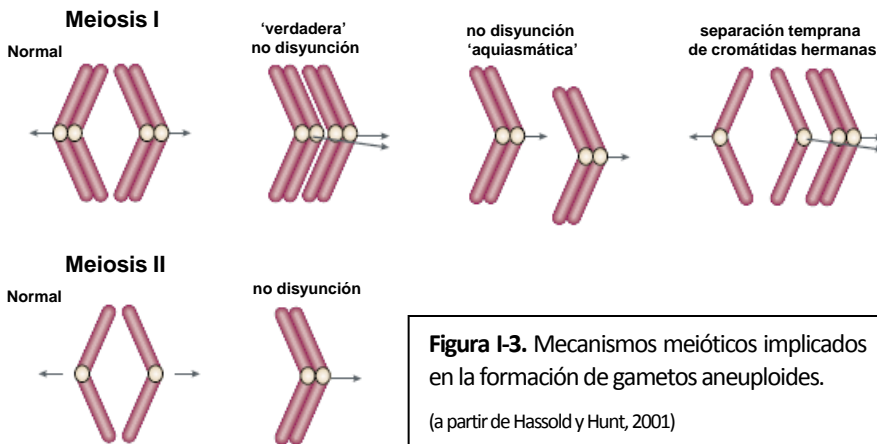
- **Mecanismos de no disyunción meiótica**

El fallo en la resolución de los quiasmas o puntos de recombinación entre los cromosomas homólogos en anafase I daría lugar a una **‘verdadera’ no disyunción** de los cromosomas homólogos en la meiosis I, y ambos cromosomas migrarían juntos a un mismo polo del huso meiótico. Así mismo, una resolución prematura de quiasmas en meiosis I, un número reducido o la ausencia total de quiasmas entre un par de cromosomas homólogos pueden producir una **no disyunción ‘aquiasmática’**, de manera que ambos cromosomas, sin haber recombinado, migran de forma independiente en la meiosis I pero lo hacen hacia un mismo polo del huso meiótico en lugar de hacia polos opuestos (Figura I-3).

Los errores de la meiosis II se consideran mayoritariamente debidos a fallos en la separación o **no disyunción** de las cromátidas hermanas (Hassold and Hunt, 2001) (Figura I-3). Se ha postulado que en algunos cromosomas, el origen de los errores en la meiosis II deriva de errores en la meiosis I, debido a un excesivo número de quiasmas y una posición inadecuada de éstos en el cromosoma (demasiado pericentromérica) (Lamb et al., 1996).

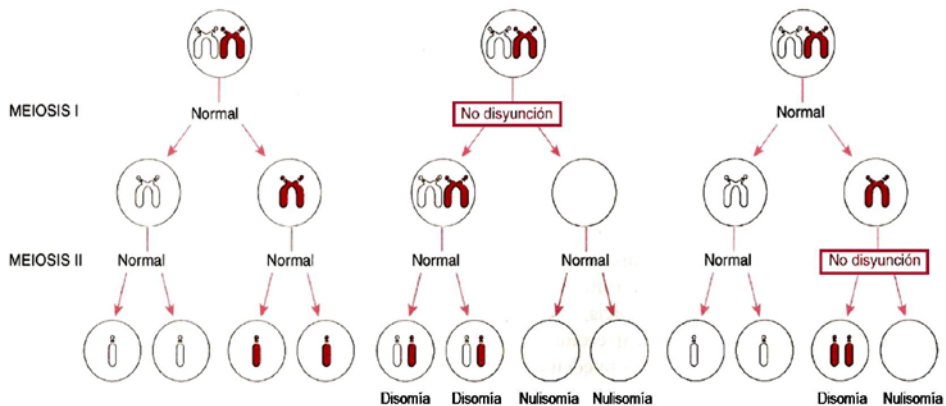
- **Separación precoz de cromátidas hermanas**

La separación prematura de las cromátidas hermanas en la meiosis I puede dar lugar a la segregación de un cromosoma completo y una cromátida hermana de su homólogo a un mismo polo del huso meiótico (Hassold and Hunt, 2001; Uroz et al., 2008) (Figura I-3).



En un proceso de meiosis normal, el huso meiótico que se forma en metafase presenta dos polos, a partir de los cuales se originan una serie de microtúbulos que capturan a los cromosomas homólogos (meiosis I) o a las cromátidas hermanas (meiosis II). Cada par de cromosomas homólogos apareados o de cromátidas hermanas presenta dos sitios de unión al huso meiótico, los **cinetócoros**, localizados en el centrómero. Los dos cinetócoros de cada par son capturados por los microtúbulos de polos opuestos, de manera que en anafase, cada cromosoma homólogo o cromátida hermana migra a polos opuestos de la célula, y tras la telofase permanecerán en células hijas diferentes.

Cuando tienen lugar errores de meiosis tanto por mecanismos de no disyunción como por separación precoz de cromátidas hermanas, podría producirse una unión de los cinetócoros de los cromosomas homólogos (meiosis I) o de las cromátidas hermanas (meiosis II) con los microtúbulos de un mismo polo del huso meiótico (unión monopolar) (Nickas, 1997), lo que haría que migrasen juntos al mismo polo en lugar de a polos opuestos. Si esto ocurriese, al final de la meiosis se obtendrían dos **gametos aneuploides**, uno con doble dotación cromosómica o **disómico** procedente de la célula que adquiere el polo del huso al que se han unido los dos cromosomas o cromátidas, y otro sin dotación cromosómica o **nulisómico** procedente de la célula que adquiere el polo del huso que no ha sufrido unión cromosómica (Figura I-4).



**Figura I-4.** Formación de gametos aneuploides por fenómenos de **no disyunción**.

(a partir de Nussbaum et al., 2005)

Las anomalías sinápticas con disminución de apareamiento y separación precoz de cromosomas homólogos pueden alterar la sincronía y alineación de los cromosomas en la placa metafásica del huso meiótico, dando lugar a bivalentes o univalentes erráticos en metafase I, afectando al punto de control de la anafase I. Si no se produce el bloqueo meiótico, el espermatozoido primario puede progresar la meiosis sin dividirse y dar lugar

a espermatoцитos secundarios diploides, que culminarán en dos **gametos diploides** tras la segunda división meiótica (Egozcue et al., 2000a; Vendrell, 2005).

#### 1.1.4. Regulación hormonal de la espermatogénesis

En humanos, el proceso completo de la espermatogénesis tiene una duración de 64 días, y está controlado hormonalmente (Figura I-5). Al llegar la pubertad, el hipotálamo secreta **hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)**, que actúa sobre la hipófisis liberando gonadotropinas, la **hormona luteinizante (LH)** y la **hormona foliculo estimulante (FSH)** (revisado en Gil-Salom et al., 2002).

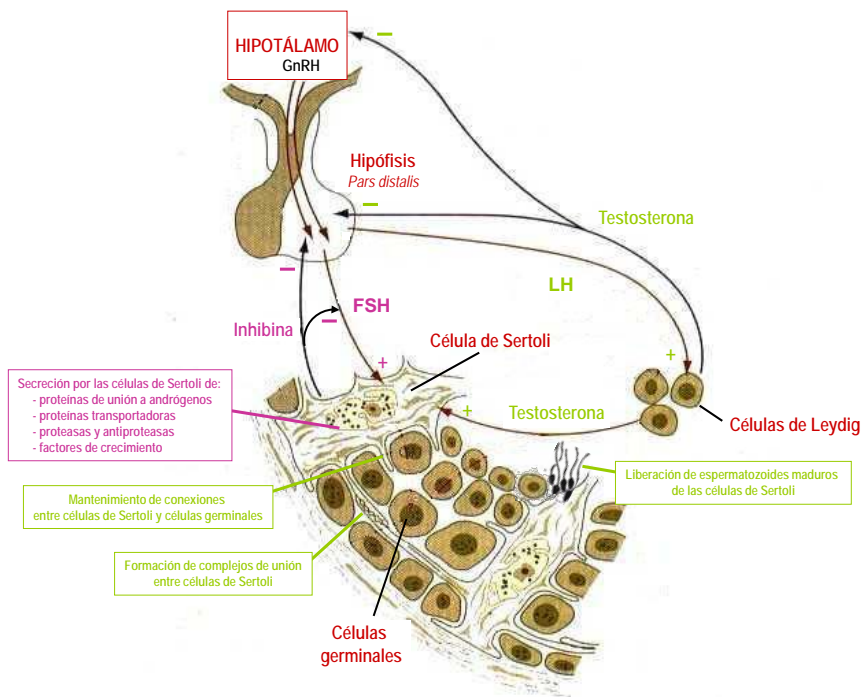
La LH estimula a las células de Leydig, localizadas entre los túbulos seminíferos del testículo, a secretar la hormona sexual masculina, la **testosterona**, que presenta dos niveles de acción:

- sobre los receptores de andrógenos de las células de Sertoli, activando la expresión de determinados genes necesarios para la regulación de la espermatogénesis a nivel local. La testosterona se requiere en tres procesos: 1) la formación de los complejos de unión entre las células de Sertoli para constituir la barrera hematotesticular; 2) el mantenimiento de las conexiones entre las células de Sertoli y las células germinales haploides; 3) la liberación de espermatozoides maduros de las células de Sertoli.
- como mecanismo de retroalimentación, frenando la liberación de GnRH y de LH hipofisaria.

La FSH actúa sobre las células de Sertoli, estimulando la secreción de numerosos productos entre los que destacan: proteínas de unión a andrógenos, proteínas transportadoras (como la proteína transportadora de andrógenos), proteasas y antiproteasas (necesarias para la remodelación del epitelio seminífero, la migración de las células germinales al compartimento adluminal y la liberación de las espermátidas

del cuerpo residual durante la espermiogénesis) y factores de crecimiento (necesarios para el crecimiento, función y diferenciación de las propias células de Sertoli, de las células de Leydig, y de las células germinales), entre otros. Uno de los factores de crecimiento liberados por las células de Sertoli es la **inhibina**. Se trata de un péptido no esteroideo formado por dos subunidades polipeptídicas, A y B, siendo la inhibina B la forma circulante más importante en los varones. La inhibina presenta dos niveles de acción:

- actúa como mecanismo de retroalimentación frenando la secreción de FSH por la hipófisis.
- a nivel local, restringe la acción de la FSH en el testículo.



**Figura I-5.** Control hormonal de la espermatogénesis.

(a partir de <http://www.uaz.edu.mx/histo/morfoembrio/carlson/Cap01/Cap01.htm>)



La tabla I-1 muestra los valores hormonales séricos normales en varones adultos (Corrales, 2001; Meeker et al., 2007; Myers et al., 2009; ValoresNormales.com, 2011).

**Tabla I-1.** Hormonas implicadas en la regulación de la espermatogénesis. Valores séricos normales en adultos.

	Nivel en suero
<b>Hormona luteinizante (LH)</b>	2-12 UI/L
<b>Hormona folículo estimulante (FSH)</b>	1-12 UI/L
<b>Testosterona libre (T)</b>	11-40 pg/mL
<b>Inhibina B</b>	80-140 pg/mL

### 1.1.5. Apoptosis y control de la espermatogénesis

La apoptosis, o muerte celular programada, es el mecanismo que utiliza el testículo para **equilibrar la proporción de células de Sertoli/germinales** (espermatogonias, espermatocitos y espermátidas) durante el desarrollo normal de la espermatogénesis (Rodríguez et al., 1997). Se han descrito dos vías principales de apoptosis a nivel testicular. La **vía intrínseca o ruta mitocondrial**, que está mediada por inductores de apoptosis como *Bax*, e inhibidores de apoptosis como *Bcl-xL*, *Bcl-w* y *Bcl-2*, cuyo equilibrio es necesario para el desarrollo normal de la espermatogénesis. Y la **vía extrínseca o de receptores de muerte celular**, mediada por la expresión de proteínas de membrana como el *sistema Fas/FasL*, cuya sobreexpresión activa la apoptosis de la célula. La apoptosis es un proceso regulado genética y hormonalmente (Print and Loveland, 2000; Ruwanpura et al., 2008; Baccetti et al., 1997; Sinha Hikim and Swerdloff, 1999). Así, cuando existe un exceso de células germinales, disminuyen los niveles testiculares de FSH y testosterona, lo que permite la unión de estradiol a los receptores de las células de Sertoli, que a su vez emiten señales hacia las células germinales para inducir su apoptosis, tanto por vías intrínsecas como extrínsecas. Las células que entran en apoptosis agregan su cromatina, sufren un proceso de condensación nuclear y citoplásmico, el ADN se fragmenta y se forma un cuerpo apoptótico que es

rápidamente reconocido, fagocitado y digerido por macrófagos o células epiteliales adyacentes (Stilbar-Martincic et al., 2009). Cuando se equilibra el número de células germinales, los niveles de FSH y testosterona aumentan y se unen a los receptores de las células de Sertoli, que dejan de mandar señales de apoptosis permitiendo el mantenimiento de la proliferación de las células germinales (Shaha et al., 2010; Pareek et al., 2007).

La apoptosis también se utiliza para **eliminar células germinales incapaces de completar la meiosis, dañadas o con alteraciones cromosómicas** (Odorisio et al., 1998; Print and Loveland, 2000; Eaker et al., 2001; Hamer et al., 2008). Cuando se producen errores de sinapsis o apareamiento en la división meiótica, se ponen en marcha los mecanismos de control de la meiosis o checkpoints, que inducen la eliminación por apoptosis de los espermatocitos afectados. Se cree que la inducción de la apoptosis a este nivel también está mediada por las células de Sertoli a través del sistema *Fas/FasL*. Así, las células de Sertoli expresan *FasL*, que al unirse a los receptores *Fas* de los espermatocitos dañados inducen su apoptosis (Stilbar-Martincic et al., 2009).

Por último, también se ha descrito que la eliminación del citoplasma residual durante la maduración de los espermatozoides se produce por apoptosis mediada por caspasas (revisado en Shaha et al., 2010).

## 1.2. ETIOLOGÍA DE LA INFERTILIDAD MASCULINA

El Comité Internacional de Seguimiento en Tecnología de Reproducción Asistida (ICMART) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han definido la **infertilidad clínica** como enfermedad del sistema reproductivo caracterizada por la incapacidad de lograr embarazo clínico después de 12 o más meses de relaciones sexuales regulares no protegidas (Zegers-Hochschild et al., 2009a, 2009b). Los problemas de fertilidad afectan a un 10-15% de parejas en edad reproductiva. Se considera que entre un 30-40% de los

casos la causa de la infertilidad es exclusivamente femenina, entre un 10-30% de los casos exclusivamente masculina, y entre un 15-30% de causa mixta, permaneciendo un 5-10% de parejas con infertilidad de causa desconocida (World Health Organization, 1992). Se han identificado un gran número de etiologías como posibles causas de infertilidad: factores endocrinos, la edad, el ejercicio, la obesidad, factores inmunológicos o psicológicos, enfermedades infecciosas, defectos anatómicos, quimioterapia y radioterapia, o anomalías definidas en los gametos (por ejemplo, parámetros seminales alterados) entre otros (Huynh et al., 2002; Shah et al., 2003; Vogt, 2004; Ferlin et al., 2007; Bellver et al., 2010).

La infertilidad de causa masculina suele ir asociada a la presencia de parámetros seminales alterados y puede estar causada por cuatro grupos de factores diferentes (revisado en Brugo-Olmedo et al., 2003): **factores pretesticulares**, que afectan a la producción de hormonas que controlan la espermatogénesis (ej: hipogonadismo hipogonadotrópico); **factores testiculares**, que afectan al propio proceso de la espermatogénesis (ej: varicocele); **factores posttesticulares**, que afectan al transporte de los espermatozoides (aneyaculación, eyaculación retrógrada, eyaculación prematura, obstrucción o agenesia de conductos seminales); y **factores espermáticos**, que afectan a los propios espermatozoides.

La mayoría de los factores asociados a la infertilidad masculina presentan algún componente genético actuando sobre el sistema reproductor o la gametogénesis. Las **alteraciones genéticas** que afectan a la fertilidad pueden ser de dos tipos: anomalías cromosómicas y defectos génicos.

### **1.2.1. Anomalías cromosómicas *de novo***

La introducción en el campo de la **reproducción asistida** de técnicas como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) ha permitido el salto de las barreras de

selección natural que ofrece el óvulo al espermatozoide, y la obtención de embarazos en parejas infértiles en las que subyace un factor masculino severo. Sin embargo, las pruebas de diagnóstico prenatal realizadas en estas gestaciones han revelado un incremento en la incidencia de **alteraciones cromosómicas de novo** (Van Steirteghem et al., 2002; Bonduelle et al., 2002), cuyo origen ha sido atribuido principalmente a las características de los varones infértiles tratados (In't Veld et al., 1995; Bonduelle et al., 1998). De esta forma, se han descrito incidencias de gestaciones anormales del 0,24% en varones normozoospermicos, del 2,1% en varones oligozoospermicos, del 1-2,4% en varones con azoospermia obstructiva y del 7-11,1% en varones con azoospermia secretora (Bonduelle et al., 2002; Vernaev et al., 2003). En referencia a los cromosomas sexuales, se ha observado una incidencia de embarazos anormales del 0,6% en varones oligozoospermicos y del 1,5% en varones azoospermicos (Bonduelle et al., 2002; Jozwiak et al., 2004).

### **1.2.2. Varones portadores de anomalías cromosómicas**

El 5,8% de los varones infértiles que presentan oligozoospermia o azoospermia tienen alteraciones cromosómicas constitucionales (numéricas o estructurales) que afectan al desarrollo normal de la espermatogénesis. El 4,2% son alteraciones de los cromosomas sexuales y el 1,5% de los autosomas (Johnson, 1998).

Entre las **alteraciones numéricas** que pueden cursar con problemas de infertilidad destacan el síndrome de Klinefelter y el síndrome 47,XYY. En estos casos puede verse afectada tanto la producción y la calidad de los espermatozoides, como la correcta dotación cromosómica en los mismos (González-Merino et al., 2007; Rodrigo et al., 2010; García-Quevedo et al., 2011; Vialard et al., 2012).

Los varones portadores de **alteraciones estructurales equilibradas** (translocaciones Robertsonianas, translocaciones recíprocas e inversiones) generalmente presentan un

fenotipo normal. Sin embargo, su gametogénesis puede resultar comprometida en un rango variable dependiendo del tipo de alteración estructural, pudiendo ser desde azoospermicos hasta normozoospermicos. Del mismo modo, pueden producir espermatozoides con desequilibrios cromosómicos en una proporción muy variable, lo que les confiere un riesgo elevado de transmitir alteraciones cromosómicas a su descendencia (Antón et al., 2007; Rosenbusch et al., 2010).

### **1.2.3. Defectos génicos**

Aunque pueden deberse a heterogeneidad génica, la mayoría de los defectos génicos asociados a infertilidad masculina afectan a un único gen. Estos defectos pueden ser mutaciones en uno de los alelos o en ambos alelos del mismo locus, que pueden tener lugar tanto en los gonosomas como en los autosomas. En la tabla I-2 se resumen las patologías más destacadas debidas a mutaciones génicas, que cursan con infertilidad masculina (a partir de Burgo-Olmedo et al., 2003; y Dohle et al., 2010).

Entre los defectos génicos, destacan las **microdeleciones en Yq11**, **deleciones en la región AZF** (factor de azoospermia), que dan lugar a síndrome de sólo células de Sertoli o detención de la espermatogénesis si afectan a las regiones AZFa y AZFb y fenotipo variable desde oligozoospermia severa hasta azoospermia si afectan a la región AZFc.

**Tabla I-2.** Defectos génicos en autosomas que cursan con infertilidad masculina.

PATOLOGÍA	FRECUENCIA	FENOTIPO	HERENCIA/GENOTIPO
<b>Síndrome del testículo feminizante</b>	1 en 60.000 NV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resistencia a andrógenos</li> </ul>	Recesiva ligada al X (gen AR en Xq12)
<b>Síndrome de Usher</b>	1 en 30.000 NV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sordera</li> <li>Retinosis pigmentaria – ceguera</li> <li>Astenozoospermia por degeneración del axonema espermático</li> </ul>	Autosómica recesiva (diferentes genes en varios cromosomas)
<b>Síndrome de Kallman</b>	1 en 30.000 NV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hipogonadismo-hipogonadotrópico</li> <li>Anosmia</li> <li>Pubertad retardada</li> <li>Azoospermia u oligozoospermia</li> </ul>	Recesiva ligada al X (gen KALIG-1 en Xp22.3)
<b>Síndrome de Kartagener o del cilio inmóvil</b>	1 en 16.000 NV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bronquiectasias</li> <li>Sinusitis</li> <li>Infecciones del oído medio</li> <li><i>situs inversus</i></li> <li>Astenozoospermia</li> </ul>	Autosómica recesivo (diferentes genes en varios cromosomas implicados en la funcionalidad ciliar)
<b>Distrofia miotónica</b>	1 en 8.000 NV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Debilidad muscular</li> <li>Atrofia testicular</li> </ul>	Autosómica dominante (gen DMPK en 19q13.3)
<b>Síndrome de Noonan</b>	1 en 2.500 NV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Baja estatura, orejas bajas, cuello corto con piel redundante, cardiopatías</li> <li>Atrofia testicular y criptorquidia</li> <li>FSH elevada, T y LH normales</li> <li>Azoospermia u oligozoospermia</li> </ul>	Autosómica dominante (diferentes genes implicados en la vía metabólica RAS MAPK)
<b>Fibrosis quística</b>	1 en 2.500 NV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Infecciones respiratorias</li> <li>Insuficiencia pancreática</li> <li>Desarrollo pobre del conducto de Wolff</li> <li>Azoospermia obstructiva por agenesia de conductos deferentes</li> </ul>	Autosómica recesivo (gen CFTR en 7q31.2)
<b>Poliquistosis renal dominante</b>	1 en 1.000 NV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Quistes renales</li> <li>Obstrucción por quistes en el epidídimo</li> </ul>	Autosómica dominante (gen PKD1 en 16p13.1) (gen PKD2 en 4q21)

### 1.3. ESTUDIOS DE MEIOSIS EN VARONES INFÉRTILES

Los estudios de meiosis en varones infértiles con cariotipo de sangre periférica normal han detectado anomalías cromosómicas sinápticas restringidas a las células germinales en un 17-26% de los varones infértiles con menos de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml en el eyaculado (Vendrell et al., 1999; Egozcue et al., 2000b). Las anomalías meióticas más frecuentes son el bloqueo meiótico severo, que cursa con un bloqueo madurativo de la espermatogénesis en espermatocono primario con disminución de la producción espermática, dando lugar a oligozoospermia (*bloqueo incompleto*) o azoospermia (*bloqueo completo*); y las anomalías sinápticas, que generalmente producen un bloqueo meiótico incompleto, cursando clínicamente con oligozoospermia (Vendrell, 2005).

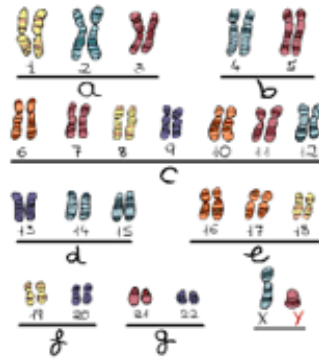
Los estudios de meiosis pueden realizarse utilizando diferentes técnicas, todas ellas partiendo de biopsias testiculares para analizar las diferentes etapas de la meiosis.

- **Estudios de meiosis clásicos**

Aportan información diagnóstica y permiten analizar todos los cromosomas, pudiéndolos identificar únicamente por grupos según su tamaño. Incluye el estudio de los cromosomas meióticos a nivel de paquitene, metafase I y metafase II, utilizando el microscopio óptico y la tinción de Leishman (20%) según el protocolo de Evans. Los estudios de meiosis clásicos han revelado la presencia de desinapsis completas en todos o en casi todos los bivalentes en un 10-20% de los varones infértiles, y de desinapsis individuales en un 80-90% de los casos. Las anomalías más frecuentes en varones infértiles son (Egozcue et al., 2005):

- 1) Separación precoz de los cromosomas sexuales en metafase I.** La presencia de un único quiasma terminal en el bivalente X e Y debido a la falta de homología entre ambos cromosomas, puede hacer que su alineación en el huso meiótico no sea estable y que se produzca una separación precoz de los cromosomas X e Y en metafase I. Si esto ocurre, ambos cromosomas podrían ser capturados por los microtúbulos de un mismo polo del huso y migrar juntos a una misma célula hija tras la división meiótica.
- 2) Desinapsis total de bivalentes de pequeño tamaño.** Es una anomalía frecuente que sólo afecta a bivalentes de pequeño tamaño (grupo G) (Figura I-6).
- 3) Desinapsis parcial de bivalentes.** Es la anomalía meiótica más común observada en varones infértiles. Los bivalentes que se ven afectados presentan un número de sitios de recombinación menor al número esperado. Afecta principalmente a cromosomas de tamaño medio (grupo C) y ocasionalmente de tamaño grande (grupos A y B).

- 4) **Desinapsis total de bivalentes.** Es muy infrecuente y afecta a todos los cromosomas. Normalmente se produce fragmentación cromosómica (Templado et al., 1976), y los fragmentos se agregan para formar pseudocromosomas o pseudobivalentes.



**Figura I-6.** Grupos de cromosomas por tamaño: autosomas y cromosomas sexuales.

([www.lagenetica.info/cromosomas/index.es.html](http://www.lagenetica.info/cromosomas/index.es.html))

- **Técnica de Multiplex-FISH (M-FISH)**

Combina los estudios de meiosis clásicos con la **hibridación *in situ* fluorescente (FISH)** utilizando 24 librerías de ADN, cada una de ellas marcada con una combinación de fluorocromos diferentes, lo que permite identificar simultáneamente todos los bivalentes en metafase I, caracterizar los bivalentes afectados por anomalías meióticas y evaluar frecuencias de recombinación. Son muy útiles en el análisis de metafases II, que son difíciles de interpretar por estudios de meiosis clásicos (Sarrate et al., 2004; Uroz et al., 2008). Permite además caracterizar alteraciones cromosómicas estructurales, que se observan de manera frecuente en los cromosomas X e Y, e identificar roturas frecuentes en el cromosoma 9 (Sarrate et al., 2004). La identificación de los cromosomas alterados en la meiosis permite realizar estudios más dirigidos posteriormente, a nivel de espermatozoide o de embrión.



- **Técnica de CenM-FISH**

Combina los estudios de meiosis clásicos con la FISH, permitiendo identificar todos los centrómeros utilizando sondas de ADN centroméricas alpha-satélite marcadas con diferentes fluorocromos. Permite incrementar el número de espermatoцитos primarios y secundarios analizables, caracterizar anomalías numéricas y sinápticas, estudiar tasas de recombinación meiótica, y distinguir fragmentos acéntricos de marcadores cromosómicos (Oliver-Bonet et al., 2003; Sun et al., 2006; Uroz et al., 2009)

- **Técnicas de inmunocitogenética**

Se basan en la utilización de anticuerpos dirigidos a proteínas que forman parte del complejo sinaptonémico (SYCP1, SYCP2, SYCP3), así como a proteínas implicadas en la recombinación (Ej: MLH1, SPO11, DMC1, RAD51, MSH4, MSH5) para estudiar la progresión meiótica, defectos en la sinapsis entre cromosomas homólogos y tasas de recombinación meiótica. En varones infértiles han permitido la identificación de menores tasas de recombinación, principalmente en el bivalente 21 y los cromosomas sexuales (Gonsalves et al., 2004; Sun et al., 2005).

#### **1.4. ESTUDIOS CITOGÉNÉTICOS EN ESPERMATOZOIDEOS MEDIANTE FISH**

Los estudios de meiosis restringen su aplicación clínica al diagnóstico de la infertilidad masculina. Sin embargo, no ofrecen información sobre la dotación cromosómica del producto final de la meiosis, los espermatozoides, que presentan un alto riesgo de alteración cromosómica en meiosis alteradas.

Los primeros estudios cromosómicos en espermatozoides aparecieron en 1970 con el uso de tinciones diferenciales de regiones concretas de los cromosomas (Pearson et al., 1970; Barlow et al., 1970), estimándose tasas de aneuploidías para los cromosomas sexuales del 1,4% y tasas medias de aneuploidías para los autosomas del 2%, resultando

en una tasa de aneuploidías total del 38% (Pawlowitzki et al., 1972), valores excesivamente elevados que se justificaron por la poca especificidad cromosómica de la técnica utilizada. Posteriormente se desarrolló la técnica de fusión de espermatozoides en ovocitos de Hamster sin zona pelúcida (Yanagimachi et al., 1976). Esta técnica comenzó a usarse para el estudio de los cromosomas de espermatozoides humanos en 1978 (Rudak, 1978), y se estandarizó en 1982 (Martin et al., 1982), ofreciendo información del contenido cromosómico completo del espermatozoide. La complejidad y laboriosidad de la técnica, así como la limitación que presentaba de poder estudiar únicamente espermatozoides con capacidad de fecundación, dio paso a mediados de los 80 al desarrollo de técnicas de hibridación *in situ*, mediante el uso de sondas de ADN específicas marcadas con isótopos radiactivos (Joseph et al., 1984). Y fue en la década de los noventa, cuando el uso de sondas marcadas con isótopos no radiactivos (Guttenbach et al., 1990) permitió la aparición de la técnica de FISH (Wyrobek et al., 1990) para el estudio cromosómico de los espermatozoides.

La técnica de FISH proporciona un método sensible y específico para detectar secuencias de ácidos nucleicos en el interior del núcleo de células en interfase, como es el caso de los espermatozoides. Consiste en la utilización de segmentos específicos de ADN o ARN (sondas), marcados con diferentes fluorocromos que, al unirse a las secuencias complementarias presentes en los cromosomas que interesa estudiar, permiten su visualización y enumeración. La utilización simultánea de varias sondas específicas para los distintos cromosomas permite una evaluación rápida y relativamente sencilla de un gran número de espermatozoides, posibilitando la detección de anomalías numéricas y algunas estructurales (Downie et al., 1997; Egozcue et al., 1997), en muestras procedentes tanto de eyaculado, como de epidídimo y testículo. El número de espermatozoides evaluados puede oscilar entre 1000-10000, dependiendo en muchos casos del origen y las características de la muestra que se analiza, y se ha estimado que la tasa total de espermatozoides aneuploides en varones

normozoospermicos es del 6%, con una frecuencia media de disomía para los autosomas de 0,12% y para los cromosomas sexuales de 0,31% (revisado en Egozcue et al., 1997).

#### 1.4.1. Varones con cariotipo alterado

La técnica de FISH se ha convertido en la herramienta por excelencia para el estudio de la frecuencia de aneuploidías en espermatozoides a nivel de investigación en varones infértiles, corroborando la presencia de alteraciones cromosómicas en espermatozoides de varones con cariotipo alterado, tanto en **portadores de anomalías para los cromosomas sexuales**: síndrome de Klinefelter (XXY) y varones XYY (Rives et al., 2000; Hennebicq et al., 2001; Blanco et al., 1997; Wong et al., 2008; González-Merino et al., 2007; Rodrigo et al., 2010), como en **portadores de alteraciones cromosómicas estructurales**: translocaciones recíprocas y Robertsonianas, e inversiones (Antón et al., 2004, 2005, 2007).

La incidencia de espermatozoides portadores de alteraciones cromosómicas observada en estos estudios es muy variable:

- en varones XXY y XYY se observan incidencias del 1-20% de espermatozoides con alteraciones para los cromosomas sexuales (revisado en Blanco et al., 2001), así como incrementos del 1% de espermatozoides diploides.
- en varones portadores de alteraciones estructurales, la incidencia de espermatozoides con desequilibrios para los cromosomas implicados es del 10-40% en translocaciones Robertsonianas, del 50-65% en translocaciones recíprocas, y del 1-55% en portadores de inversiones (revisado en Antón et al., 2007).

En estos dos grupos, diversos estudios han descrito además un efecto de los cromosomas alterados sobre la segregación anómala de otros pares cromosómicos durante la meiosis, fenómeno conocido como **efecto intercromosómico** (Blanco et al., 2000; Hennebicq et al., 2001; Antón et al., 2007, 2011).

#### **1.4.2. Varones con cariotipo normal**

Mediante los estudios de FISH en espermatozoides se han podido identificar grupos de varones con cariotipo normal que presentan mayor riesgo de transmitir alteraciones cromosómicas a su descendencia, destacando aquellos que han sido **sometidos a tratamientos de quimioterapia y radioterapia** (Robbins et al., 1997; Martin et al., 1999), así como los que presentan una **gestación previa con cromosomopatía de origen paterno**: con Síndrome de Down (Blanco et al., 1998), Síndrome de Klinefelter (Eskenazi et al., 2002) o Síndrome de Turner (Martínez-Pasarell et al., 1999a; Tang et al., 2004).

La incidencia de espermatozoides portadores de alteraciones cromosómicas observada en estos estudios también es variable:

- en varones con cariotipo normal y tratamientos de quimioterapia y radioterapia se han observado incidencias de alteraciones para los autosomas, los cromosomas sexuales y diploidías, de hasta cinco veces superiores a los valores pre-tratamiento, volviendo a los valores originales tras un periodo de tres meses post-tratamiento (Robbins et al., 1997; Martin et al., 1999).
- en varones con cariotipo normal y con gestaciones previas con cromosomopatía de origen paterno, la incidencia de alteraciones cromosómicas en los espermatozoides para los cromosomas alterados se ha descrito entre el 1-20% (Blanco et al., 1998; Martínez-Pasarell et al., 1999a; Eskenazi et al., 2002; Tang et al., 2004).

Por otra parte, diversos autores han observado una tasa mayor de espermatozoides aneuploides en **varones infértiles** que en la población fértil (Moosani et al., 1995; Bernardini et al., 1998; Lahdetie et al., 1997; Pang et al., 1999; Pfeffer et al., 1999; Arán et al., 1999; Vegetti et al., 2000; Ushijima et al., 2000). Aunque las indicaciones clínicas del estudio de FISH en espermatozoides en la población infértil no están aún claramente definidas, los principales candidatos en la actualidad son:

- varones con **parámetros espermáticos anormales**: con **oligozoospermia** (Rubio et al., 2001; Bernardini et al., 1998; Pang et al., 1999; Pfeffer et al., 1999; Vegetti et al., 2000; Ushijima et al., 2000; Nishikawa et al., 2000; Martin et al., 2003a) y **teratozoospermia severa** (In't Veld et al., 1997; Devillard et al., 2002; Mateu et al., 2006); con **azoospermia obstructiva o secretora** (Levron et al., 2001; Palermo et al., 2002; Burrello et al., 2002; Mateizel et al., 2002; Rodrigo et al., 2004); y con **estudio de meiosis alterado** en biopsia de testículo (Rubio et al., 2001; Sarrate et al., 2010).
- **parejas con aborto de repetición** de causa desconocida (Giorlandino et al., 1998; Rubio et al., 2001; Bernardini et al., 2004; Al-Hassan et al., 2005; Rubio et al., 2009).
- **parejas con fallo repetido de implantación** tras técnicas de reproducción asistida (In't Veld, et al., 1997; Pang et al., 1999; Rubio et al., 2001; Petit et al., 2005).

Los análisis mediante FISH en espermatozoides están corroborando los hallazgos observados en varones infértiles con meiosis alteradas, observándose una mayor tasa de aneuploidía en los cromosomas 21 y sexuales, debidas a fenómenos de no disyunción meiótica (Ferguson et al., 2007; Sun et al., 2008a, 2008b). Es por ello que los cromosomas 21 y sexuales, junto con los cromosomas 13 y 18 sean los más comúnmente incluidos en estos estudios, ya que además, sus alteraciones numéricas

pueden dar lugar a gestaciones anormales potencialmente viables, como los Síndromes de Patau (trisomía 13), Edwards (trisomía 18), Down (trisomía 21), Turner (45,X), Klinefelter (47,XXY), 47,XXX ó 47,XYY.

## **1.5. DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL EN LA INFERTILIDAD MASCULINA**

El **diagnóstico genético preimplantacional (DGP)** permite conocer el contenido cromosómico de los embriones antes de ser transferidos al útero materno, sin afectar negativamente a su desarrollo o capacidad de implantación (Hardy et al., 1990). Ha resultado de gran utilidad en parejas con elevado riesgo de transmisión de enfermedades monogénicas a la descendencia, y para descartar anomalías cromosómicas numéricas y estructurales, evitando la aplicación de interrupciones voluntarias del embarazo. En los últimos años, esta tecnología se ha aplicado también como una herramienta adicional para la selección de embriones en varios grupos de pacientes, consideradas como de “mal pronóstico” dentro de los centros de reproducción asistida. En estos casos se realiza screening de aneuploidías, y se ha indicado principalmente en mujeres de edad avanzada (  $\geq 38$  años), en casos de fallo repetido de implantación tras Fecundación In Vitro (FIV) ( $\geq 3$  fallos previos), en parejas con aborto recurrente de causa desconocida ( $>2$  abortos previos) y en casos de infertilidad masculina severa.

Las dos primeras indicaciones han sido motivo de gran controversia en los dos últimos años, tras la publicación de varios estudios prospectivos randomizados, sobre todo en el grupo de edad materna avanzada (Mastenbroek et al., 2011). Por otra parte, estos estudios han sido ampliamente cuestionados debido a los criterios de inclusión y a la metodología empleada, sobre todo a la técnica de biopsia embrionaria y al análisis cromosómico realizado (Cohen et al., 2007; Rubio et al., 2009; Mir et al., 2010).

El análisis cromosómico se puede realizar en diferentes estadios: tras biopsia de los corpúsculos polares, biopsia embrionaria de una célula en día 3 de desarrollo, ó biopsia de blastocisto con la obtención de varias células del trofoectodermo en día 5-6 de desarrollo. Tras la biopsia se aplican técnicas de biología molecular o de citogenética en función del tipo de alteración que interesa evaluar. Para el estudio de anomalías cromosómicas en embriones las técnicas más utilizadas han sido la FISH y más recientemente la hibridación genómica comparada (CGH) y los arrays basados en esta tecnología (aCGH). En este último año se han publicado dos nuevos estudios prospectivos randomizados, que parecen indicar que utilizando la tecnología adecuada el DGP puede ser de utilidad para diferentes indicaciones utilizando FISH (Rubio et al., 2013) ó aCGH (Yang et al., 2012).

#### **1.5.1. DGP en factor masculino severo**

Los **varones portadores de alteraciones para los cromosomas sexuales** (XXY y XYY) en los que se ha observado un incremento de espermatozoides aneuploides para los gonosomas mediante FISH, producen una elevada tasa de embriones anormales - tanto para los gonosomas como para los autosomas - y de mosaicismo – presencia de 2 o más líneas celulares diferentes- tras DGP (Bielanska et al., 2000; González-Merino et al., 2007; Rodrigo et al., 2010). En parejas con **varones portadores de translocaciones recíprocas**, el DGP ha puesto de manifiesto que la tasa de embriones desequilibrados para los cromosomas implicados en la translocación es directamente proporcional a la tasa de espermatozoides desequilibrados encontrados en el varón (Van Assche et al., 1999; Wiland et al., 2008). Esta tasa de embriones desequilibrados ha sido descrita como de 1,5 veces superior a la tasa de espermatozoides desequilibrados (Escudero et al., 2003). Resultados similares se han observado en **varones portadores de translocaciones Robertsonianas** (Escudero et al., 2000) y de **inversiones** (Bernicot et al., 2010), lo que apunta al estudio de FISH en espermatozoides como una buena

herramienta para predecir la proporción de embriones desequilibrados que se van a encontrar en un ciclo de DGP.

El DGP en **varones infértiles con cariotipo normal** en sangre periférica ha permitido evaluar cómo afectan elevadas tasas de espermatozoides con alteraciones cromosómicas numéricas en la constitución cromosómica de los embriones. En este sentido, se han observado mayores tasas de embriones anormales, destacando una elevada incidencia de aneuploidías para los cromosomas sexuales y de embriones mosaico (Gianaroli et al., 2000; Silber et al., 2003; Rubio et al., 2005; Gianaroli et al., 2005b; Sánchez-Castro et al., 2009; Rodrigo et al., 2010; Al-Asmar et al., 2012). Dentro de los pacientes con oligozoospermia severa o criptoospermia, aquellos casos que presentan microdeleciones del cromosoma Y se asocian a un incremento mayor de aneuploidías embrionarias, destacando la monosomía X (Mateu et al., 2010).

## 1.6. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los varones estériles presentan una frecuencia elevada de anomalías citogenéticas, algunas de ellas detectables mediante el cariotipo, pero otras limitadas a las células germinales como resultado de meiosis anormales. Con las nuevas técnicas de reproducción asistida como el ICSI, la fecundación por espermatozoides cromosómicamente anormales puede dar lugar a fallos de implantación, abortos de repetición y a la transmisión de anomalías cromosómicas a la descendencia. El FISH de espermatozoides es una técnica de análisis citogenético que mediante el marcado de los cromosomas con moléculas de ADN fluorescentes, permite valorar la presencia de aneuploidías y diploidías en los espermatozoides en estadio de interfase.

Es de esperar una mayor tasa de anomalías cromosómicas cuanto más severa es la alteración de la espermatogénesis. Los pacientes con oligozoospermia y/o teratoospermia muy severas o con azoospermias (fundamentalmente secretoras),



son quienes, en principio, tendrían mayor probabilidad de presentar espermatozoides cromosómicamente anormales. Por tanto, el FISH de espermatozoides en estos casos podría ser muy útil para seleccionar a los pacientes con mayor riesgo de generar embriones con anomalías cromosómicas. Esta información podría ser muy valiosa antes de iniciar el ciclo de tratamiento, ya sea para desaconsejar el mismo o para valorar las posibilidades de diagnóstico genético preimplantatorio.



## 2. OBJETIVOS



El **objetivo general** de esta tesis es determinar los factores que podrían estar asociados con un incremento de anomalías cromosómicas en espermatozoides en varones con cariotipo normal, y evaluar cómo afecta este incremento al éxito reproductivo en parejas con problemas de infertilidad.

**Objetivos específicos:**

1. Conocer mediante FISH el valor basal de anomalías numéricas de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y en espermatozoides procedentes del eyaculado de varones fértiles normozoospermicos (grupo control de eyaculado) y en espermatozoides procedentes del testículo de varones fértiles que son sometidos a vasectomía (grupo control de testículo).
2. Conocer mediante FISH la incidencia de anomalías numéricas de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y de espermatozoides procedentes del eyaculado de varones estériles candidatos a ICSI y de espermatozoides procedentes de biopsias de testículo de varones con azoospermia obstructiva y secretora.
3. Relacionar los resultados obtenidos en los estudios de FISH de espermatozoides con los parámetros seminales: concentración, movilidad y morfología espermáticas.
4. Relacionar los resultados obtenidos en los estudios de FISH de espermatozoides con la indicación clínica por la que se solicita el FISH: fallo repetido de implantación, aborto de repetición, factor masculino y causas mixtas.
5. Evaluar el impacto de las anomalías cromosómicas en espermatozoides sobre los resultados clínicos tras realizar ciclos de FIV/ICSI convencional y ciclos de DGP para screening de aneuploidías.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS





Este proyecto de tesis doctoral fue aprobado por el Comité de Investigación del Instituto Valenciano de Infertilidad en el año 1999. Los varones incluidos firmaron un consentimiento informado para el análisis de las muestras mediante la técnica de FISH.

### 3.1. MUESTRAS ANALIZADAS

#### 3.1.1. Grupos de estudio

- **Varones infértiles con espermatozoides en eyaculado**

En un periodo de diez años, comprendido entre 1999 y 2009, realizamos estudio de FISH en espermatozoides de eyaculado a un total de 2008 pacientes con cariotipo normal, procedentes de las diferentes clínicas IVI. La edad media en este grupo de pacientes es  $37,5 \pm 5,1$  ( $\pm DS$ ) años. Los varones acudieron a las clínicas IVI en pareja, por presentar un historial de infertilidad. Se indicó clínicamente la realización del estudio de FISH en espermatozoides por las siguientes causas:

- **fallo repetido de implantación (FI)** tras técnicas de reproducción asistida ( $\geq 2$  fallos previos) en 594 pacientes;
- **aborto de repetición (AR)** ( $\geq 2$  abortos previos) en 391 pacientes;
- **factor masculino (FM)**, con parámetros seminales alterados según criterios de la OMS (Cooper et al. 2010), y sin historia de aborto de repetición o fallo repetido de implantación previa en 748 pacientes. Estos criterios establecen oligozoospermia con menos de  $15 \times 10^6$  espermatozoides/ml, astenozoospermia con menos de un 32% de espermatozoides con movilidad A+B y teratozoospermia con menos de un 4% de espermatozoides con morfología normal;
- **causas mixtas (MIX)**, incluyendo gestaciones previas con cromosomopatía, tratamientos de quimioterapia y/o radioterapia, o mala calidad embrionaria en 275 pacientes.

- **Varones infértiles con azoospermia obstructiva**

Se han incluido en este grupo un total de 16 varones infértiles candidatos a ICSI por presentar azoospermia obstructiva (AO). La edad media en este grupo de pacientes es  $40,9 \pm 7,7$  ( $\pm$ DS) años. El diagnóstico clínico de la azoospermia ha sido: obstrucción de epidídimo (n=2), agenesia bilateral congénita de conductos deferentes (n=2), obstrucción bilateral de conductos deferentes (n=1), y vasectomía (n=11). En el grupo de pacientes con vasectomía, el estudio de FISH en espermatozoides de testículo se ha realizado  $10,8 \pm 6,1$  años post-vasectomía.

- **Varones infértiles con azoospermia secretora**

Se han analizado muestras de espermatozoides procedentes de biopsia de testículo de 19 varones infértiles candidatos a ICSI por presentar azoospermia secretora (AS). La edad media en este grupo de pacientes es  $34,4 \pm 4,1$  ( $\pm$ DS) años. La etiología de la azoospermia ha sido: orquitis (n=1), criptorquidia (n=3), varicocele (n=3), quimioterapia (n=2), e idiopática (n=10). El diagnóstico histológico de cada paciente se resume en la tabla R-13 (ver apartado 4.4.4. en resultados).

### 3.1.2. Grupos control

- **Grupo control clínico (CC)**

Debido a que el inicio de la aplicación clínica del estudio de FISH en espermatozoides fue anterior al inicio de la realización de la presente tesis doctoral, para valorar clínicamente el resultado de FISH en espermatozoides de eyaculado de los varones infértiles se utilizó un grupo control de 14 donantes normozoospermicos utilizado históricamente en la clínica de IVI Valencia, realizado en colaboración con la Universidad Autónoma de Barcelona (Blanco et al., 1996; 1997) - ver Tabla R-1 en apartado de resultados.

Para valorar clínicamente el resultado de FISH en espermatozoides de testículo de los varones infértiles con AO y AS se utilizaron dos grupos control, uno procedente de espermatozoides de eyaculado y uno procedente de espermatozoides de testículo:

- **Grupo control de eyaculado (CE)**

Se determinó el valor basal de anomalías cromosómicas numéricas en espermatozoides de eyaculado de 10 varones normozoospermicos, a los que se realizó FISH en espermatozoides para el análisis de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y. La edad media en este grupo es  $31,4 \pm 7,3$  ( $\pm$ DS) años. Todos los varones tienen fertilidad probada, con un número medio ( $\pm$ DS) de niños previos procedentes de gestaciones espontáneas de  $1,5 \pm 0,6$ .

- **Grupo control de testículo (CT)**

Se determinó el valor basal de anomalías cromosómicas numéricas en espermatozoides de testículo de 10 varones de fertilidad probada. Para ello se analizaron mediante FISH muestras de espermatozoides de testículo obtenidas a partir de una aspiración testicular, realizada en el momento en que fueron sometidos a vasectomía. La edad media en este grupo es  $38,6 \pm 5,2$  ( $\pm$ DS) años. El número medio de niños procedentes de gestaciones espontáneas en este grupo fue  $1,8 \pm 0,5$  ( $\pm$ DS).

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Obtención de espermatozoides

Las muestras de **eyaculado** se recogen por masturbación en un recipiente estéril, previo lavado aséptico de manos y genitales. Se recomienda un período de abstinencia sexual no inferior a tres días, asegurando así un volumen seminal óptimo para obtener la mayor cantidad posible de espermatozoides con la eyaculación.

Los espermatozoides del **testículo** se obtienen por los siguientes métodos (Mínguez et al., 2000):

#### ***Punción aspiración percutánea de espermatozoides de testículo (TESA):***

- Se conecta una jeringa de 10-20 ml a una aguja tipo “palomilla” de calibre 19 ó 20, comercializada con su propio sistema, y se carga por el extremo de la aguja con aproximadamente 1 ml de medio de cultivo de espermatozoides a 37°C y gaseado (5% CO<sub>2</sub>), que servirá de vehículo para los espermatozoides.
- Tras desinfectar la piel escrotal y anestesiar la zona, se punciona con la jeringa el epidídimo o el testículo, aspirando y modificando la trayectoria de la aguja con frecuencia.
- Finalmente, se vacía el contenido de la aspiración en un tubo cónico y se evalúa en el laboratorio.

#### ***Biopsia de testículo:***

- Se realiza una incisión de 1 cm en el escroto, desde donde se disecan una a una las capas del testículo hasta llegar a la albugínea, en la que se practica un corte con un bisturí para tomar una pieza de tejido del tamaño de una lenteja, que se deposita en una placa Petri con medio de cultivo de espermatozoides.

### 3.2.2. Análisis cromosómico de espermatozoides

La determinación del contenido cromosómico de los espermatozoides mediante FISH nos permite evaluar el riesgo de transmisión de anomalías cromosómicas de origen paterno a la descendencia.

#### 3.2.2.1. Fijación de las muestras

La FISH en espermatozoides precisa de un paso previo de *fijación y extensión* en portaobjetos de las muestras de espermatozoides.

##### **Material necesario:**

##### **Soluciones:**

##### Medio de cultivo de espermatozoides:

HTF-HSA (10 ml) (Vitrolife)

##### Solución hipotónica:

KCl 0,075 M (Sigma)/H<sub>2</sub>O destilada

##### Solución de fijación "Carnoy":

Metanol:Ácido acético glacial(3:1)(Merck)

##### **Equipo:**

- |  |                             |
|--|-----------------------------|
| - Microscopio de fluorescencia OLYMPUS Provis AX-70 equipado con objetivo de contraste de fases de 10X |                             |
| - Campana de extracción de gases   | - Probeta graduada de 20 ml |
| - Estufa a 37°C  | - Pipetas Pasteur           |
| - Placas Petri   | - Centrífuga                |
| - Bisturís   | - Vórtex                    |
| - Tubos cónicos de 10 ml   | - Portaobjetos Superfrost   |

##### **Protocolo de fijación de muestras de eyaculado:**

- Tras esperar a que licue la muestra, se realiza un seminograma con recuento de volumen, concentración, movilidad y morfología, y se deposita la muestra en un tubo cónico de 10 ml.
- Se lava con medio de cultivo para espermatozoides hasta completar un volumen de 10 ml y se centrifuga 10 minutos a 600g.
- Posteriormente, se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet con la solución de fijación "Carnoy", agitando con el vórtex, hasta un volumen final de 3-4

ml de solución de fijación. Se centrifuga 5 minutos a 600g y se repite este paso una vez.

- Se descarta el sobrenadante y se añade gota a gota el fijador hasta conseguir una dilución semitransparente.
- Finalmente, se extienden los espermatozoides en portaobjetos, dejando caer una gota de la dilución en el centro del portaobjetos desde una altura de 20-25 cm. Se comprueba al microscopio de contraste de fases que los espermatozoides están dispersos y no solapados, y se almacenan los portaobjetos a -20°C hasta la hibridación.

#### **Protocolo de fijación de muestras de testículo:**

- Se coloca la muestra de la biopsia o la aspiración en una placa Petri con 1 ml de medio de cultivo para espermatozoides y se dilacera con la ayuda de dos bisturís a modo de cuchilla. Se deposita el tejido en un tubo cónico de 10 ml y se deja sedimentar durante 10 minutos.
- Posteriormente, se recoge el sobrenadante y se deposita en un tubo cónico de 10 ml, al que se añaden 10 ml de solución hipotónica, previamente atemperada a 37°C durante 30 minutos, y se mantiene en estufa a 37°C durante 20 minutos.
- Finalmente, se centrifuga 10 minutos a 600g y se descarta el sobrenadante, para proceder a la fijación del pellet con la solución “Carnoy” siguiendo el protocolo descrito para muestras de eyaculado.

#### **3.2.2.2. Hibridación *in situ* fluorescente**

Se trata de una técnica de análisis citogenético que consiste en marcar con *sondas de ADN fluorescentes* secuencias centroméricas (CEP) o específicas de locus (LSI) de cromosomas concretos en el núcleo de los espermatozoides en estadio de interfase, para poder determinar si presentan o no una dotación cromosómica correcta.

**Material necesario:****Soluciones:****Soluciones de lavado:**

- 20xSSC (Vysis)/ H<sub>2</sub>O destilada, pH: 5,3
- 0,4xSSC/H<sub>2</sub>O destilada, pH: 7,0-7,5
- 2xSSC/H<sub>2</sub>O destilada, pH: 7,0-7,5
- 2xSSC/ 0,1% NP-40 (Vysis)/H<sub>2</sub>O destilada, pH: 7,0-7,5

**Solución de descondensación:**

- 1,4-DTT 5mM/Tris/Triton X-100(Roche)/H<sub>2</sub>O destilada, pH: 7,4

**Solución de desnaturalización:**

- 70% Formamida(Roche)/20xSSC/H<sub>2</sub>O destilada, pH: 7,3

**Soluciones de deshidratación:**

- 70% Etanol (Merck)/H<sub>2</sub>O destilada
- 85% Etanol (Merck)/H<sub>2</sub>O destilada
- 90% Etanol (Merck)/H<sub>2</sub>O destilada
- 100% Etanol (Merck)/H<sub>2</sub>O destilada

**Sondas de ADN fluorescentes:****Sondas centroméricas:** (Kit Aneuvysion, Vysis)

- CEP X SpectrumGreen™
- CEP Y SpectrumOrange™
- CEP 18 SpectrumAqua™

**Sondas específicas de locus:** (Kit Aneuvysion, Vysis)

- LSI 13q14 SpectrumGreen™
- LSI 21q22.13-q22.2 SpectrumOrange™

**Contratinción:** (Vysis)

- DAPI II

**Equipo:**

- Microscopio de fluorescencia OLYMPUS Provis AX-70 equipado con:
  - Objetivo de contraste de fases de 10X
  - Objetivo de fluorescencia de 40X
  - Objetivo de fluorescencia de 100X
  - Filtro individual específico para FITC
  - Filtro individual específico para Texas-Red
  - Filtro individual específico para Aqua-Blue
  - Triple filtro DAPI/Texas-Red/FITC
- Placa calefactora Hy-bryte (Vysis)
- Estufa a 37°C
- Baño térmico
- Cola de encuadernar
- Jarras Coplin
- Cubreobjetos de cristal de 12x12 y 15x15mm

**Protocolo de FISH sobre espermatozoides:**

- Se preparan dos portaobjetos por muestra con los espermatozoides fijados y extendidos previamente. En uno se realiza una *hibridación dual* para evaluar los cromosomas 13 y 21, y en el otro una *hibridación triple* para evaluar los cromosomas 18, X e Y.
- Se marca con un lápiz de tungsteno un área de 15x15 mm, recogiendo el centro de la gota donde tenemos extendidos los espermatozoides.
- Seguidamente, se lavan las extensiones en 2xSSC durante 5 minutos. Sin dejar secar, se deshidran las muestras en una serie creciente de alcoholes (etanol 70%, 90%, 100%) durante 2 minutos en cada alcohol y se deja secar.

**DESCONDENSACIÓN:**

- Se incuban las muestras durante 5-7 minutos en una jarra coplin con DTT atemperado a 37°C.
- Posteriormente, se realiza un lavado de 5 minutos en 2xSSC a temperatura ambiente. Sin dejar secar, se deshidratan las muestras en una serie creciente de alcoholes (etanol 70%, 90%, 100%) durante 2 minutos en cada alcohol y se deja secar.

**DESNATURALIZACIÓN:**

- A continuación, se incuban las muestras durante 5 minutos a 73°C en Formamida al 70%. Sin dejar secar, se deshidratan las muestras en una serie creciente de alcoholes (etanol 70%, 85%, 100%) durante 2 minutos en cada alcohol y se deja secar.

**HIBRIDACIÓN:**

- Se aplican 2 µl de la sonda sobre el área de hibridación marcada al inicio, se coloca un cubreobjetos de 12x12 mm, y se sella con cola. A continuación, se hibridan las muestras en cámara de humedad, seleccionando la temperatura de acuerdo a las sondas utilizadas:
  - Sondas centroméricas: temperatura de hibridación de 42°C y tiempo de hibridación variable entre 30 minutos y 16 horas.



- Sondas específicas de locus: temperatura de hibridación de 37°C y tiempo de hibridación variable entre 6 y 16 horas.

#### DETECCIÓN:

- Tras la hibridación, se elimina la cola, se retira el cubreobjetos deslizándolo suavemente y se lavan las muestras un minuto y medio a 73°C en 0,4xSSC. Sin dejar secar, se lavan las muestras 30 segundos en 2xSSC/0,1% NP-40 a temperatura ambiente y se deja secar.
- Finalmente, se aplica 5 µl de una contratinción de DAPI II, se coloca un cubreobjetos de 15x15 mm, se sella con esmalte de uñas y se almacenan los portaobjetos a -20°C hasta la evaluación al microscopio de fluorescencia.



**Figura M-1.** Esquema del procesado de los espermatozoides para el análisis cromosómico mediante FISH.

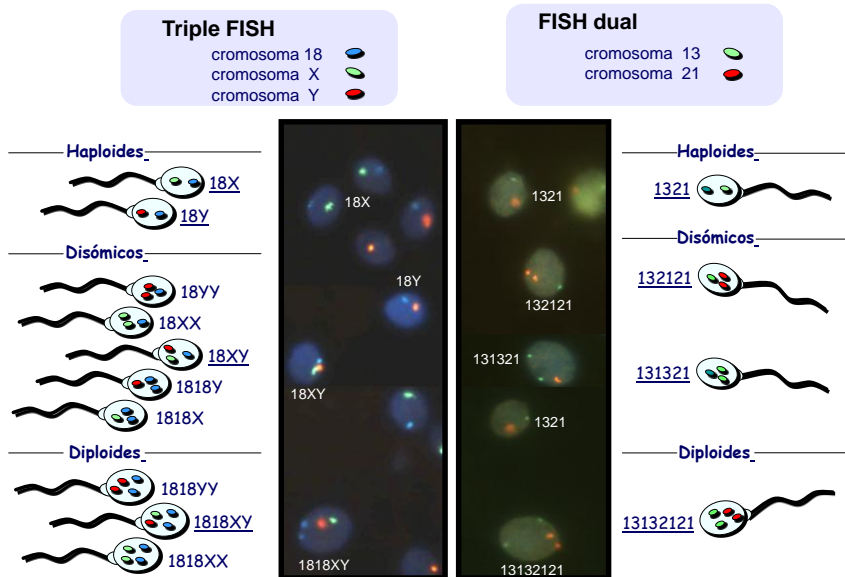
#### 3.2.2.3. Evaluación de las señales de hibridación

La visualización de las señales de hibridación se realiza bajo microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados para los haptenos utilizados. Debido a la baja tasa de anomalías cromosómicas que suelen presentar los espermatozoides para un determinado cromosoma, analizamos entre 1000-2000 espermatozoides por

paciente, excepto en aquellos casos en los que la calidad de la muestra no lo permite (criptozoospermias, muestras procedentes de testículo o epidídimo). Siguiendo los criterios de evaluación descritos por Blanco *et al.* (1996), evaluamos cada espermatozoide como:

- **Haploide normal:** si presenta una señal única para cada cromosoma analizado.
- **Disómico:** si presenta dos señales para un cromosoma concreto y una señal única para el resto de cromosomas analizados.
- **Diploide:** si presenta dos señales para cada uno de los cromosomas analizados.

Para determinar si el resultado del FISH en espermatozoides es normal o anormal, se compara mediante un test estadístico Chi-cuadrado ( $p < 0,05$ ) el porcentaje de espermatozoides con anomalías numéricas (disomía y diploidía) para cada uno de los cromosomas analizados con un grupo control. Así, si se observa un incremento estadísticamente significativo en la incidencia de alteraciones cromosómicas para al menos uno de los cromosomas analizados, se considera que la muestra analizada presenta un resultado de FISH anormal.



**Figura M-2.** Clasificación de los espermatozoides según el número de señales de hibridación para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y

### 3.2.3. Análisis cromosómico de embriones

El DGP permite el estudio genético en los embriones antes de ser transferidos al útero, y por tanto, antes de que se produzca la implantación. Con la técnica de FISH sobre blastómeros podemos enumerar los cromosomas que contiene y con ello determinar si el embrión del que procede es normal para los cromosomas analizados y por tanto es apto para la transferencia.

#### 3.2.3.1. Biopsia y procesado de blastómeros previo al análisis

Los blastómeros se obtienen de embriones en día 3 de su desarrollo mediante el proceso de biopsia embrionaria. Hasta el año 2007, se utilizó el ácido Tyrode para perforar la zona pelúcida del embrión, y a partir de esta fecha se sustituyó por la técnica del láser.

#### **Material necesario:**

#### **Soluciones y medios:**

Tampón MOPS sin  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ :

G-PGD/5% HSA (Vitrolife) a 37°C

Solución de biopsia:

Ácido Tyrode (Medicult), pH: 2,3 -2,4

Medios de cultivo embrionario para cultivo prolongado (Medicult; Vitrolife)

Soluciones de lavado:

Medio de lavado/10%HSA (SAGE), a 37°C

1%PBS-PVP, a 37°C

Solución de fijación "Carnoy":

Metanol:Ácido acético glacial(3:1)(Merck)

Solución salina:

2 µl PBS en tubo de PCR, a 4°C

Aceite mineral (Sigma-Aldrich)

#### **Equipo:**

- Campana de flujo laminar con luz UV
- Campana de extracción de gases
- Microscopio invertido NIKON / OLYMPUS, equipado con:
  - Objetivo de 40X Hoffman para la biopsia embrionaria
  - Objetivo de 10X de contraste de fases
- Platina calefactora TOKAI-HIT (MATF-U 5530)
- 2 micromanipuladores hidráulicos NARISHIGE (MO-188)
- 2 micromanipuladores motorizados NARISHIGE (MM-188)
- 2 microinyectores EPPENDORF Cell Tram Vario

- 1 microinyector EPPENDORF Cell Tram Oil
- 1 soporte doble de pipetas NARISHIGE HD- 21
- Micropipetas:
  - Pipeta Holding*: 100  $\mu\text{m}$  de diámetro externo, 20  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, ángulo 30° (Humagen)
  - Pipeta de Tyrode*: 8  $\mu\text{m}$  de diámetro externo, 5  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, ángulo 30° (Humagen)
  - Pipeta de Aspiración*: 35-40  $\mu\text{m}$  de diámetro externo, 30-35  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, ángulo 30° (Humagen)
- Láser (OCTAX)
- Lupa binocular
- Placas Petri estériles
- Pipetas Pasteur
- Portaobjetos Superfrost
- Tubos de PCR de 0,2 ml con PBS
- Microcapilares GC100T-10 estirados en Puller P-97 (Sutter Instrument Co.)
- PCR Cooler de Eppendorf® (para mantener refrigerados los tubos 0,2 ml)

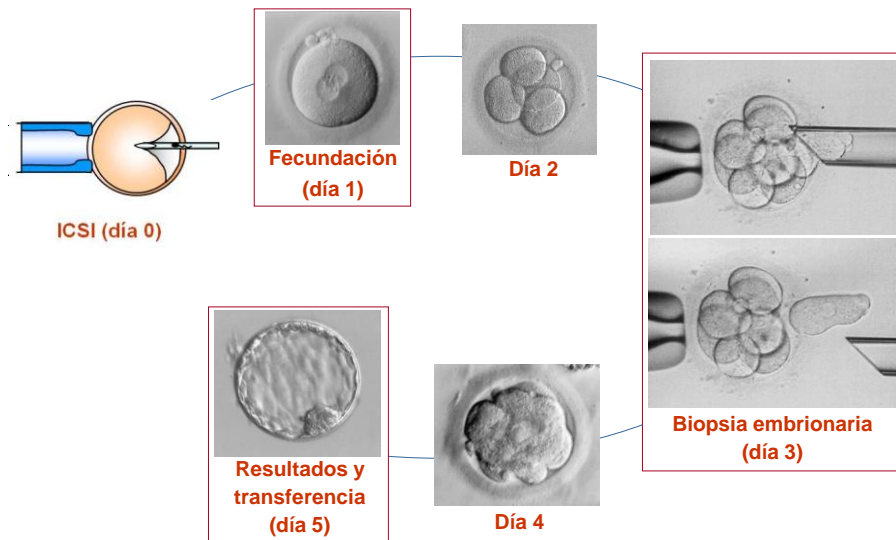
### **Protocolo de biopsia embrionaria:**

- La biopsia embrionaria se realiza en una placa Petri que contiene microgotas de 20  $\mu\text{l}$  de G-PGD en las que se colocan los embriones, y microgotas de 20  $\mu\text{l}$  con la solución de ácido Tyrode.
- Tras colocar las micropipetas de aspiración y de Tyrode a la derecha y la pipeta “holding” a la izquierda, alineadas con las anteriores, se enfoca una microgota de ácido Tyrode con el objetivo de 10x y se aspira con la pipeta de Tyrode. Posteriormente, se enfoca la gota en la que se encuentra el embrión y se sujeta con la pipeta “holding”, colocándolo de manera que queden 1 ó 2 blastómeros enfocados con la zona pelúcida.
- Se aproxima la pipeta que contiene el *ácido Tyrode* a la zona donde están las células enfocadas y se libera el ácido suavemente hasta que se observe el comienzo de la disolución de la zona pelúcida y la formación de un orificio de aproximadamente 30-35  $\mu\text{m}$  de diámetro. A continuación, se aspira el exceso de ácido liberado y se neutraliza la presión de la micropipeta.

En el caso de utilizarse el *láser* para la perforación de la zona pelúcida, se regula el láser para un tiempo de exposición de 1,9 ms, y con el objetivo del láser 40x se

enfoca la zona pelúcida y la célula a biopsiar en el monitor del ordenador conectado al láser, moviendo el embrión para que la zona pelúcida quede debajo de la diana del láser. Se dan entre 5-8 pulsos de láser para realizar un orificio de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ .

- Utilizando el objetivo Hoffman 40x, se introduce la pipeta de aspiración en el orificio de la zona pelúcida, se aspira el blastómero suavemente y se retira dejando el blastómero en el medio, próximo al embrión.
- Si se quiere biopsiar otra célula, se introduce nuevamente la pipeta de aspiración por el mismo orificio y se repite la misma operación.
- Finalmente, se libera el embrión de la pipeta “holding”, y se retiran los embriones de la placa lavándolos con medio de cultivo para eliminar los restos de medio de biopsia. Se colocan de nuevo en la placa de cultivo, y los blastómeros extraídos permanecen en la placa de biopsia hasta su procesado.



**Figura M-3.** Desarrollo embrionario y cronología de un ciclo de DGP

***Protocolo de fijación de blastómeros para análisis mediante FISH:***

Consiste en la eliminación del citoplasma y fijación del núcleo del blastómero sobre un portaobjetos.

- El blastómero biopsiado se retira de la placa de biopsia y se coloca en un pocillo con 0,5 ml de medio de lavado suplementada con 10% HSA.
- A continuación, se aspira de nuevo el blastómero y haciendo uso de una lupa binocular, se deposita sobre un portaobjetos Superfrost. Se retira cuidadosamente el exceso de medio depositado y se valora la expansión del blastómero sobre el portaobjetos.
- Posteriormente se coloca el portaobjetos en el microscopio invertido con objetivo de 10x de contraste de fases, y se deja caer verticalmente sobre el blastómero una gota de la solución de fijación “Carnoy”, utilizando el método de Tarkowski (1996). Finalmente, se añaden tantas gotas de fijador como sea necesario hasta que se observa la desaparición de todo el citoplasma y el núcleo queda extendido.

***3.2.3.2. Hibridación in situ fluorescente***

Una vez fijados en portaobjetos, los núcleos de los blastómeros se marcan con sondas de ADN fluorescentes dirigidas a secuencias centroméricas (CEP), específicas de locus (LSI) o subteloméricas (TEL) de los cromosomas responsables de las principales aneuploidías en humanos. Se realiza una *FISH secuencial* en la que se analizan los cromosomas 13, 16, 18, 21 y 22 en una primera ronda de hibridación, y los cromosomas 15, 17, X e Y en una segunda ronda de hibridación sobre el mismo núcleo. En caso de tener señales superpuestas, muy próximas, partidas o desorganizadas, se realizan *rondas de hibridación adicionales* con sondas LSI o TEL diferentes a las ya utilizadas para confirmar/rescatar señales de hibridación.

**Material necesario:****Soluciones:****Soluciones de lavado:**

- 20xSSC (Vysis)/ H<sub>2</sub>O destilada, pH: 5,3
- 0,4xSSC/H<sub>2</sub>O destilada, pH: 7,0-7,5
- 2xSSC/ 0,1% NP-40 (Vysis)/H<sub>2</sub>O destilada, pH: 7,0-7,5

**Soluciones de deshidratación:**

- 70% Etanol (Merck)/H<sub>2</sub>O destilada
- 85% Etanol (Merck)/H<sub>2</sub>O destilada
- 100% Etanol (Merck)/H<sub>2</sub>O destilada

**Sondas de ADN fluorescentes:****Kit MultiVysion PB panel (Vysis)**

- LSI 13 q14 SpectrumRed™
- CEP 16 SpectrumAqua™
- CEP 18 SpectrumBlue™
- LSI 21q22.13-q22-2 SpectrumGreen™
- LSI 22q11.2 SpectrumOrange™

**Kit MultiVysion 4CC panel (Vysis)**

- CEP 15 SpectrumOrange™
- CEP 17 SpectrumAqua™
- CEP X SpectrumGreen™
- CEP Y SpectrumBlue™

**Sondas LSI y TEL: (Vysis)**

- LSI 13q34 SpectrumGreen™
- TEL 16p SpectrumGreen™
- TEL 16q SpectrumOrange™
- TEL 15q SpectrumOrange™
- TEL 17p SpectrumGreen™
- TEL 17q SpectrumOrange™

- TEL 18q SpectrumOrange™
- TEL 21q SpectrumOrange™
- TEL 22q SpectrumOrange™

**Contratinciones: (Vysis)**

- ANTIFADE II
- DAPI II

**Equipo:**

- Microscopio de fluorescencia OLYMPUS Provis AX-70 equipado con:
  - Objetivo de contraste de fases de 10X
  - Objetivo de fluorescencia de 40X
  - Objetivo de fluorescencia de 100X
  - Filtro individual específico para FITC
  - Filtro individual específico para Texas-Red
  - Filtro individual específico para Aqua-Blue
  - Triple filtro DAPI/Texas-Red/FITC
- Placa calefactora Hy-bryte (Vysis) o Thermobryte (Abbott)
- Baño térmico
- Jarras Coplin
- Cubreobjetos de cristal de 10mm Ø y 22x22 mm
- Cola de encuadernar

**Protocolo de FISH sobre blastómeros:****1ª ronda de hibridación:**

- Tras realizar un círculo en el reverso del portaobjetos con lápiz de tungsteno para señalar el área en la que se ha fijado el núcleo/núcleos, se deshidratar las

extensiones en una serie creciente de alcoholes de 70, 85 y 100% etanol, colocando los portaobjetos 1 minuto en cada cubeta, y dejamos secar a temperatura ambiente.

- Para el análisis simultáneo de los cromosomas 13, 16, 18, 21 y 22, se aplica 1  $\mu$ l del kit MultiVysion PB sobre el área de hibridación, se coloca un cubreobjetos de 10 mm de diámetro y se sella con cola.

#### *DESNATURALIZACIÓN e HIBRIDACIÓN:*

- A continuación, se co-desnaturaliza la sonda y el ADN del núcleo en placa calefactora durante 5 minutos a 73°C y se hibrida entre 3-5 horas a 37°C.

#### *DETECCIÓN:*

- Finalizada la hibridación, se retira la cola y el cubre con cuidado, se sumergen los portaobjetos durante 2 minutos en una cubeta Coplin con 0,4xSSC atemperado a 73°C en un baño térmico, y se realiza un segundo lavado de 30 segundos en una cubeta con 2x SSC/0,1% NP-40 a temperatura ambiente.
- Sin dejar secar, se aplica 7  $\mu$ l de Antifade II sobre el área de hibridación, se coloca un cubreobjetos de 20x20 mm y se analizan las señales de hibridación al microscopio de fluorescencia.

#### **2ª ronda de hibridación:**

- Finalizado el primer diagnóstico, se colocan las extensiones durante 3 minutos, agitando ligeramente, en una cubeta con 2xSSC/0,1% NP-40 a temperatura ambiente. Posteriormente se deshidratan las extensiones en una serie creciente de alcoholes de 70, 85 y 100% etanol, colocando los portaobjetos 1 minuto en cada cubeta y se deja secar a temperatura ambiente.
- A continuación para el análisis simultáneo de los cromosomas 15, 17, X e Y se aplica 1  $\mu$ l del kit MultiVysion 4CC sobre el área de hibridación, se coloca un cubreobjetos de 10 mm de diámetro y se sella con cola.

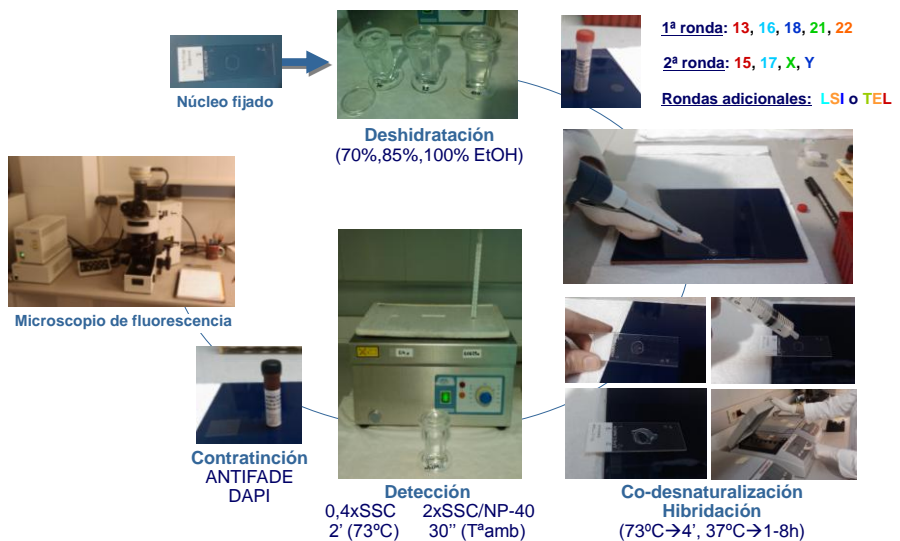


**DESNATURALIZACIÓN e HIBRIDACIÓN:**

- Posteriormente, se co-desnaturaliza la sonda y el ADN del núcleo en placa calefactora durante 5 minutos a 73°C, se hibrida entre 1-3 horas a 37°C, y se procede a la detección y observación al microscopio del mismo modo en que se describe en el protocolo de la 1ª ronda de hibridación.

**3ª ronda de hibridación ó rondas adicionales:**

- Si al finalizar el diagnóstico de las dos rondas de hibridación convencionales son necesarias rondas de hibridación adicionales, se procede del mismo modo que en el protocolo de la 2ª ronda de hibridación, aplicando en este caso 1 µl de la mezcla de sondas para el/los cromosomas de interés. A continuación, se co-desnaturaliza e hibrida a la temperatura y tiempo adecuados según el tipo de sondas utilizado, se realiza la detección aplicando DAPI II como contratinción de la cromatina, y se analizan las señales de hibridación al microscopio de fluorescencia.



**Figura M-4.** Esquema del procesado de los núcleos fijados para su análisis cromosómico en el DGP mediante FISH

### **3.2.3.3. Evaluación de las señales de hibridación**

La visualización de las señales de hibridación se realiza bajo microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados para los haptenos utilizados. Contabilizando el número de marcas fluorescentes que aparece en cada núcleo para cada uno de los cromosomas a analizar se interpretan los resultados como:

- **Diploide normal:** la célula analizada presenta dos señales para cada uno de los cromosomas analizados.
- **Haploide/triploide/tetraploide:** la célula analizada presenta una/tres/cuatro señal/es para todos y cada uno de los cromosomas analizados.
- **Monosomía/s:** la célula analizada presenta una única señal de hibridación para uno o varios (pero no todos) cromosomas analizados.
- **Trisomía/s:** la célula analizada presenta tres señales de hibridación para uno o varios (pero no todos) cromosomas analizados

El resultado observado en el núcleo del blastómero biopsiado se extrapola al contenido completo del embrión del que procede, pudiendo ser éste diagnosticado como **embrión normal** candidato a transferencia, o como **embrión anormal** no candidato a transferencia.

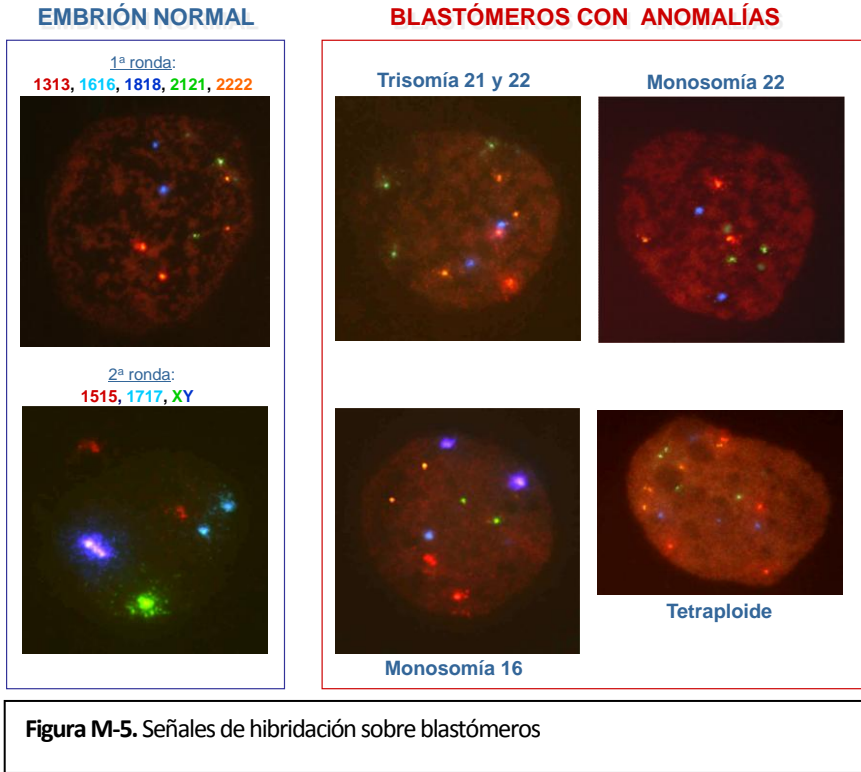


Figura M-5. Señales de hibridación sobre blastómeros



## 4. RESULTADOS



#### **4.1. INCIDENCIA DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS EN ESPERMATOZOIDES DE EYACULADO DE VARONES INFÉRTILES**

Se realizó FISH dual para los cromosomas 13 y 21, y FISH triple para los cromosomas 18, X e Y en muestras de eyaculado de 2008 varones infértiles que acudieron a las diferentes clínicas IVI. La tabla R-1 muestra la incidencia de espermatozoides con alteraciones numéricas (diploidía y disomía para los cromosomas 13, 18, 21, X, Y) observada en el grupo control clínico. La frecuencia total de espermatozoides aneuploides (espermatozoides con disomía 13 + disomía 18 + disomía 21 + disomía X e Y) en el grupo control fue 0,95%, y la frecuencia total de espermatozoides anormales (aneuploides + diploides) del 1,2%. Se utilizó un test estadístico Chi-cuadrado con corrección de Yates ( $p < 0,05$ ) para comparar la incidencia de anomalías numéricas observadas en cada uno de los pacientes con el grupo control. El 14,6% de las muestras procedentes de varones infértiles mostró un resultado de FISH anormal en espermatozoides (294/2008) comparado con el grupo control.

##### **4.1.1. Relación de los parámetros seminales con el resultado del FISH**

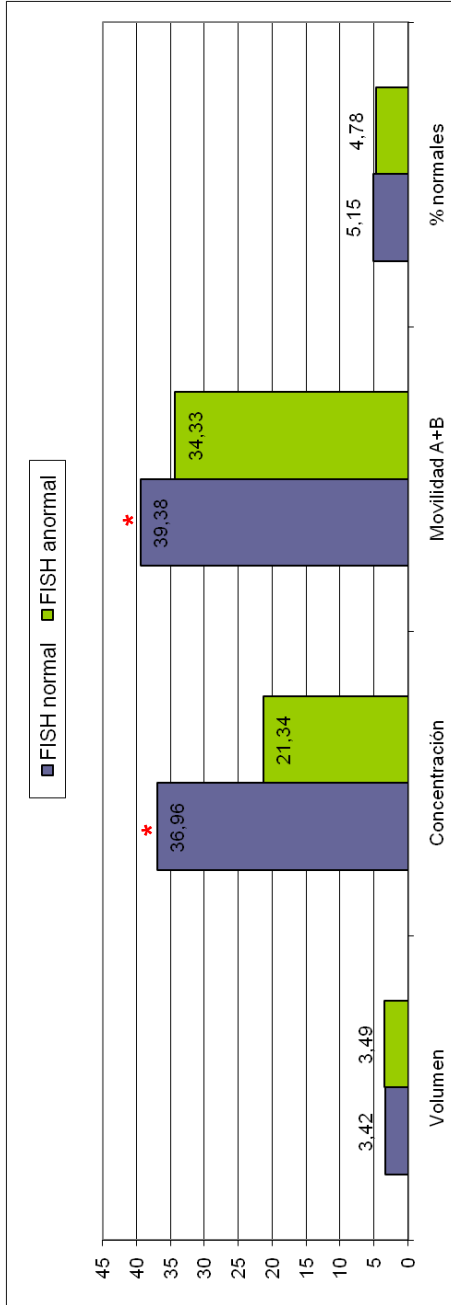
Se compararon los parámetros seminales (volumen, concentración, movilidad A+B, y morfología normal) de los 2008 pacientes en los dos grupos de pacientes con resultado de FISH normal ( $n = 1714$ ) y resultado de FISH anormal ( $n = 294$ ) en espermatozoides. Para ello se realizó un análisis de varianza (ANOVA de un factor) en el que los datos se presentaron como media y desviación estándar, incluyendo el intervalo de confianza del 95% (Figura R-1). El grupo de pacientes con un resultado de FISH normal en espermatozoides mostró una concentración y un porcentaje de espermatozoides con movilidad A+B significativamente mayor al observado en el grupo de pacientes con FISH anormal en espermatozoides (concentración:  $36,9 \times 10^6$  vs.  $21,3 \times 10^6$ , respectivamente; movilidad A+B: 39,4% vs. 34,3%, respectivamente;  $p < 0,0001$ ).

**Tabla R-1.** Resultados de FISH en espermatozoides de eyaculado del grupo control clínico (CC) utilizado en IVI Valencia.

Muestra	Analizados cr. 18/X/Y	Disómicos					Analizados cr. 13	Analizados cr. 21	Disómicos		Diploides
		18	XX	YY	XY	Total X/Y			13	21	
UAB-1	10.101	8	8	15	14	37	-	3.968	-	17	38
UAB-2	10.092	15	16	14	5	35	-	1.970	-	10	19
UAB-3	10.095	6	4	8	6	18	-	2.068	-	7	25
UAB-4	10.062	9	11	22	14	47	-	2.014	-	5	21
UAB-5	10.096	10	10	24	17	51	-	2.018	-	11	59
UAB-6	-	-	-	-	-	-	-	1.570	-	6	4
UAB-7	-	-	-	-	-	-	-	2.015	-	10	3
UAB-8	-	-	-	-	-	-	-	2.030	-	6	5
UAB-9	-	-	-	-	-	-	-	2.008	-	4	4
IVI-10	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-
IVI-11	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-
IVI-12	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-
IVI-13	-	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-
IVI-14	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>50.446</b>	<b>48</b> <b>(0,10%)</b>	<b>49</b> <b>(0,10%)</b>	<b>83</b> <b>(0,16%)</b>	<b>56</b> <b>(0,11%)</b>	<b>188</b> <b>(0,37%)</b>	<b>50.425</b>	<b>19.661</b>	<b>50</b> <b>(0,10%)</b>	<b>76</b> <b>(0,38%)</b>	<b>178</b> <b>(0,25%)</b>



**Figura R-1.** Comparación de los parámetros seminales entre los grupos de pacientes con FISH normal y FISH anormal (ANOVA de un factor,  $p < 0,05$ ).



Pacientes	Media	DS	Intervalo de confianza para la media al 95%		Sig
			Límite inferior	límite superior	
Volumen (ml)	FISH N	1,72	3,339	3,501	0,5171
	FISH AN	1,66	3,300	3,680	
Concentración (x10 <sup>6</sup> esper/ml)	FISH N	56,48	34,286	39,634	<0,0001
	FISH AN	27,79	17,020	25,660	
Movilidad A+B (%)	FISH N	20,25	38,421	40,339	<0,0001
	FISH AN	19,75	32,072	36,588	
Normales (%)	FISH N	6,99	4,819	5,481	0,4293
	FISH AN	9,52	3,692	5,868	

Para conocer si existe una posible asociación del resultado del FISH (normal, anormal) con los parámetros seminales (volumen, concentración, movilidad A+B, y morfología), se realizó un análisis de regresión logística en el que se presentaron los datos como Odds Ratio (OD) incluyendo el intervalo de confianza del 95%. La probabilidad de obtener un resultado de FISH anormal fue independiente del volumen, la movilidad A+B y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal. Sin embargo, sí que observó una asociación negativa con la concentración de espermatozoides. De este modo, la probabilidad de obtener un resultado de FISH anormal disminuyó en 0,988 veces con el incremento de cada unidad de concentración de espermatozoides ( $1 \times 10^6$ /ml) en el eyaculado del paciente (Tabla R-2).

**Tabla R-2.** Relación de los parámetros seminales con el resultado del FISH en espermatozoides.

	OR	Intervalo de confianza al 95%		Sig.
		Límite inferior	Límite superior	
<b>Volumen</b>	0,985	0,908	1,068	0,712
<b>Concentración</b>	0,988	0,982	0,994	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Movilidad A+B</b>	0,998	0,990	1,005	0,548
<b>Normales</b>	1,007	0,989	1,025	0,452

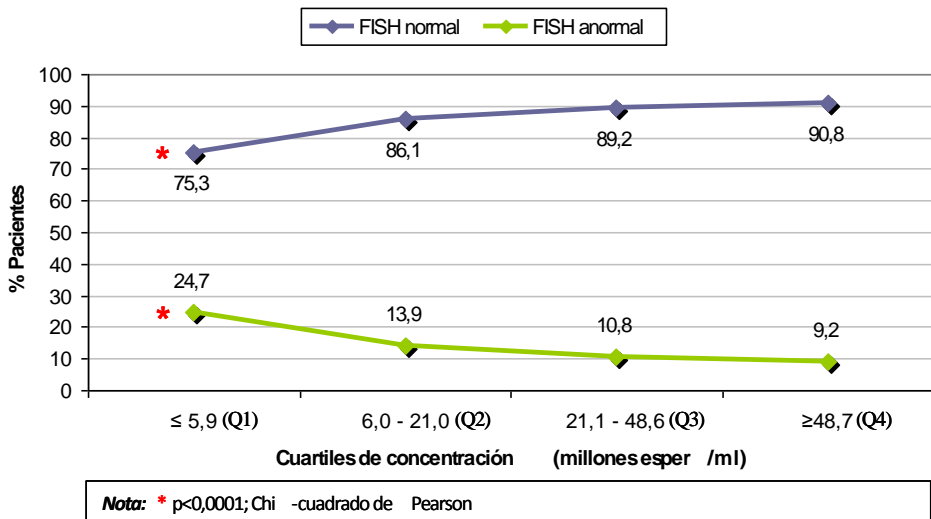
**Notas:** OR=Odds Ratio (OR)

- **Efecto de la concentración espermática sobre el resultado del FISH**

Para estudiar el efecto de la concentración sobre el resultado del FISH en espermatozoides, se dividió la variable concentración en cuartiles, quedando la población distribuida de la siguiente forma: el 25% con una concentración  $\leq 5,9 \times 10^6$  espermatozoides/ml (Q1), el 25% con una concentración entre  $6,0-21,0 \times 10^6$  espermatozoides/ml (Q2), el 25% con una concentración entre  $21,1-48,6 \times 10^6$  espermatozoides/ml (Q3), y el 25% con una concentración  $\geq 48,7 \times 10^6$  espermatozoides/ml (Q4). Se diseñó una tabla de contingencia con el número de

pacientes que presentaba un resultado de FISH normal y anormal en cada cuartil, y se analizaron los datos mediante pruebas de Chi-cuadrado ( $p < 0,05$ ). El porcentaje de pacientes con un resultado de FISH anormal disminuyó de forma gradual desde el cuartil con menor concentración hasta el cuartil con mayor concentración de espermatozoides, siendo este porcentaje significativamente más elevado ( $p < 0,001$ ) en el cuartil de concentración de espermatozoides más bajo (Q1: 24,7%) comparado con el resto de cuartiles: Q2: 13,9%; Q3: 10,8%; Q4: 9,2%) (Figura R-2).

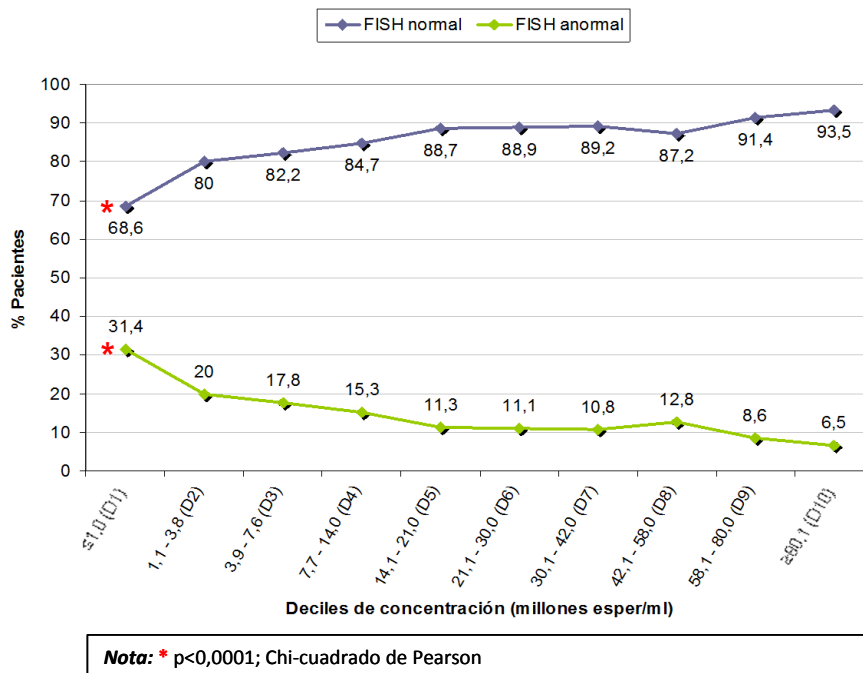
**Figura R-2.** Distribución de la población con resultado de FISH normal y FISH anormal, en cuartiles de concentración.



Determinamos si se mantenía este incremento de pacientes con FISH anormal en concentraciones menores de  $6 \times 10^6$  espermatozoides/ml realizando el mismo análisis pero dividiendo la población en deciles (D1-D10), de manera que cada decil contuviese el 10% de los individuos de la población. De nuevo, se obtuvo un descenso gradual en el porcentaje de pacientes con un resultado de FISH anormal de espermatozoides desde el decil de menor concentración (D1:  $\leq 1 \times 10^6$  espermatozoides/ml) hasta el decil con mayor concentración de espermatozoides (D10:  $\geq 80,1 \times 10^6$  espermatozoides/ml),

siendo significativamente más elevado ( $p < 0,0001$ ) en el decil de concentración de espermatozoides más bajo (D1: 31,4%) comparado con el resto de deciles (D2: 20%; D3: 17,8%; D4: 15,3%; D5: 11,3%; D6: 11,1%; D7: 10,8%; D8: 12,8%; D9: 8,6%; D10: 6,5%)

**Figura R-3.** Distribución de la población con resultado de FISH normal y FISH anormal, en deciles de concentración.



#### 4.1.2. Relación de los parámetros seminales con las diferentes anomalías observadas en el FISH

De los 294 pacientes con un resultado de FISH anormal, 173 pacientes (58,8%) presentaron un incremento sólo de espermatozoides con disomía para los cromosomas sexuales; 71 pacientes (24,2%) presentaron incremento sólo de espermatozoides diploides; 32 pacientes (10,9%) presentaron incremento tanto de espermatozoides diploides como con disomía para los cromosomas sexuales; 16 pacientes (5,4%) presentaron espermatozoides con disomía 13, disomía 18 y/o disomía 21 combinada con disomía de cromosomas sexuales y/o espermatozoides diploides; 2 pacientes

(0,7%) presentaron incremento sólo de espermatozoides con disomía 13. Teniendo en cuenta la elevada frecuencia de espermatozoides diploides y/o con disomía para los cromosomas sexuales respecto a las alteraciones observadas para el resto de cromosomas analizados, para cada uno de los pacientes se mostraron los resultados del FISH en 4 categorías:

- **DISSEX:** porcentaje de espermatozoides con disomía para los cromosomas sexuales.
- **DIPL:** porcentaje de espermatozoides diploides.
- **AneuT:** porcentaje de espermatozoides aneuploides totales (dissex + disomía 13 + disomía 18 + disomía 21).
- **AnT:** porcentaje de espermatozoides anormales totales (AneuT + dipl).

El análisis de correlación de Pearson no mostró relación entre los parámetros seminales (volumen, concentración, movilidad A+B y morfología) y el porcentaje de DISSEX, DIPL, AneuT y AnT observado en las muestras (Tabla R-3).

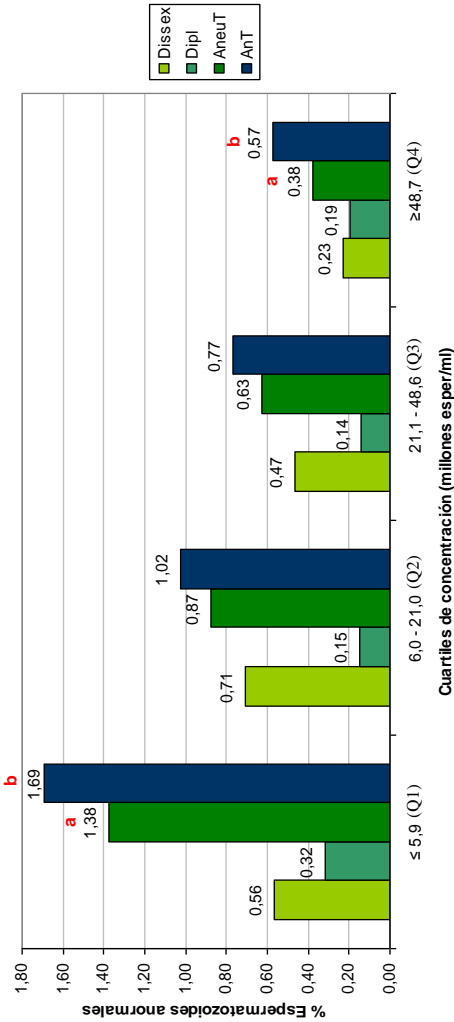
**Tabla R-3.** Estudio de correlación entre los parámetros seminales y las 4 categorías de anomalías en el FISH.

		%DISSEX	%DIPL	%AneuT	%AnT
<b>Volumen</b>	Correlación de Pearson	0,019	-0,013	0,040	0,034
	Sig. (bilateral)	0,386	0,559	0,072	0,131
	N	2006	2006	2006	2006
<b>Concentración</b>	Correlación de Pearson	-0,022	-0,022	-0,033	-0,035
	Sig. (bilateral)	0,335	0,325	0,134	0,121
	N	2008	2008	2008	2008
<b>Movilidad A+B</b>	Correlación de Pearson	-0,014	-0,038	-0,032	-0,037
	Sig. (bilateral)	0,532	0,090	0,148	0,099
	N	2.008	2.008	2.008	2.008
<b>% Normales</b>	Correlación de Pearson	-0,004	-0,014	-0,012	-0,013
	Sig. (bilateral)	0,854	0,574	0,626	0,577
	N	1735	1735	1735	1735

**Nota:** la correlación es significativa al nivel 0,05 bilateral

No obstante, teniendo en cuenta el efecto de la concentración sobre el resultado del FISH, se dividió la población en cuartiles de concentración y se realizó un análisis de varianza de la media para cada una de las categorías (ANOVA de un factor). Los datos se presentaron como media y desviación estándar, incluyendo el intervalo de confianza del 95% (Figura R-4). El porcentaje de DISSEX y DIPL fue similar en todos los cuartiles de concentración. Sin embargo, el porcentaje de AneuT y de AnT fue significativamente mayor en el cuartil de menor concentración (Q1) comparado con el cuartil de mayor concentración de espermatozoides (Q4) (AneuT: 1,38% vs. 0,38% respectivamente,  $p=0,038$ ; AnT: 1,69% vs. 0,57% respectivamente,  $p=0,028$ ), observándose un descenso gradual de AneuT y AnT a medida que aumenta la concentración de espermatozoides.

**Figura R-4.** Incidencia de las cuatro categorías de anomalías observadas en el FISH (Dissex, Dipl, AneuT, AnT) por cuartiles de concentración. ((1)=2008 pacientes totales; <sup>ab</sup>p<0,05. Anova de un factor).



Intervalo de confianza para la media al 95%				Intervalo de confianza para la media al 95%			
Limite superior	Limite inferior	DS	Media	Limite superior	Limite inferior	DS	Media
0,41	0,72	1,78	0,56	0,65	2,11	8,32	1,38
0,16	1,26	6,28	0,71	0,33	1,42	6,27	0,87
0,07	0,86	4,46	0,47	0,24	1,02	4,46	0,63
0,21	0,25	0,23	0,23	0,35	0,41	0,36	0,38
<b>0,32</b>	<b>0,67</b>	<b>3,96</b>	<b>0,49</b>	<b>0,57</b>	<b>1,06</b>	<b>5,68</b>	<b>0,81</b>
0,16	0,47	1,79	0,32	0,84	2,54	9,69	1,69
0,12	0,18	0,33	0,15	0,47	1,57	6,28	1,02
0,11	0,17	0,31	0,14	0,37	1,16	4,47	0,77
0,04	0,35	1,72	0,19	0,4	0,75	1,97	0,57
<b>0,14</b>	<b>0,25</b>	<b>1,26</b>	<b>0,2</b>	<b>0,74</b>	<b>1,29</b>	<b>6,28</b>	<b>1,01</b>

Cuartil de concentración		Cuartil de concentración	
Q1 ≤5,9	Q2 6,0 - 21,0	Q3 21,1 - 48,6	Q4 ≥48,7
% Dissex		% AneuT	
Total (1)		Total (1)	
Q1 ≤5,9		Q1 ≤5,9	
Q2 6,0 - 21,0		Q2 6,0 - 21,0	
Q3 21,1 - 48,6		Q3 21,1 - 48,6	
Q4 ≥48,7		Q4 ≥48,7	
% Dipl		% AnT	
Total (1)		Total (1)	

#### 4.1.3. Relación de la edad del varón con las diferentes anomalías observadas en el FISH

De los 2008 varones infértiles que se realizaron FISH en espermatozoides, conocemos la edad en 1955 varones. Para determinar si existe relación de la edad del varón con el porcentaje de espermatozoides con DISSEX, DIPL, AneuT y AnT, se realizó un análisis de correlación de Pearson (Tabla R-4).

**Tabla R-4.** Análisis de correlación de la edad del varón con las alteraciones cromosómicas en los espermatozoides.

		% DISSEX	% DIPL	% AneuT	% AnT
<b>Edad varón</b>	Correlación de Pearson	0,003	- 0,059	- 0,011	- 0,022
	Sig. (bilateral)	0,885	0,052	0,617	0,327
	N	1955	1955	1955	1955

**Nota:** la correlación es significativa al nivel 0,05 bilateral

El análisis de correlación no mostró relación entre la edad de los varones y la incidencia de las diferentes anomalías observadas en el FISH. Se dividió la población en cuartiles de edad, representando cada cuartil un rango de edad de la población que incluyese una cuarta parte de la misma (Q1-Q4), y se realizó un análisis de varianza inter-grupo e intra-grupo. Los datos se representaron como media y desviación estándar, incluyendo el intervalo de confianza del 95% para cada cuartil de edad (Tabla R-5). De nuevo, el análisis de varianza no mostró relación entre los rangos de edad de los varones y la incidencia de las diferentes categorías de anomalías del FISH en espermatozoides.



**Tabla R-5.** Comparación de las diferentes alteraciones cromosómicas en espermatozoides en función de la edad de los varones categorizada en cuartiles.

	Edad por cuartiles	Pacientes	Media	DS	Intervalo de confianza para la media al 95%		Sig.
					Límite inferior	Límite superior	
% DISSEX	Q1 ≤33,778	379	0,692	5,264	0,160	1,224	0,435
	Q2 33,779-36,644	490	0,325	0,355	0,293	0,356	
	Q3 36,645-39,906	473	0,369	1,459	0,238	0,501	
	Q4 ≥39,907	613	0,607	5,700	0,155	0,106	
% DIPL	Q1 ≤33,778	379	0,389	2,465	0,140	0,638	0,051
	Q2 33,779-36,644	490	0,148	0,286	0,123	0,173	
	Q3 36,645-39,906	473	0,199	1,296	0,082	0,317	
	Q4 ≥39,907	613	0,126	0,305	0,101	0,149	
% Aneut	Q1 ≤33,778	379	1,081	6,069	0,468	1,694	0,791
	Q2 33,779-36,644	490	0,702	4,321	0,318	1,086	
	Q3 36,645-39,906	473	0,793	6,801	0,178	1,407	
	Q4 ≥39,907	613	0,767	5,697	0,315	1,218	
% Ant	Q1 ≤33,778	379	1,470	7,120	0,751	2,189	0,476
	Q2 33,779-36,644	490	0,850	4,343	0,464	1,235	
	Q3 36,645-39,906	473	0,992	8,078	0,262	1,722	
	Q4 ≥39,907	613	0,892	5,705	0,440	1,345	

**Nota:** ANOVA de un factor para el análisis inter-grupo e intra grupo.

#### 4.1.4. Relación de la indicación con el resultado del FISH

En función de la indicación por la que se solicitó el estudio de FISH en espermatozoides, mostraron un resultado de FISH anormal el 13,8% (82/594) de los varones con FI, el 11% (43/391) de los varones con AR, el 18,45% (138/748) de los varones con FM, y el 12,71% (31/244) de los varones con MIX.

Para conocer si la indicación por la que se realizó el estudio de FISH en espermatozoides (FI, AR, FM, MIX) condiciona la obtención de un resultado de FISH normal o anormal con independencia de los parámetros seminales, se realizó un análisis de regresión logística en el que se incluyó en el modelo la variable concentración de espermatozoides. Los datos se presentaron como Odds Ratio (OR) incluyendo el intervalo de confianza del 95%. El análisis mostró que la probabilidad de obtener un resultado de FISH anormal en espermatozoides no se asociaba a la indicación, siendo la concentración de espermatozoides la única variable capaz de condicionar el resultado del FISH (Tabla R-6).

**Tabla R-6.** Relación de la indicación con el resultado de FISH en espermatozoides.

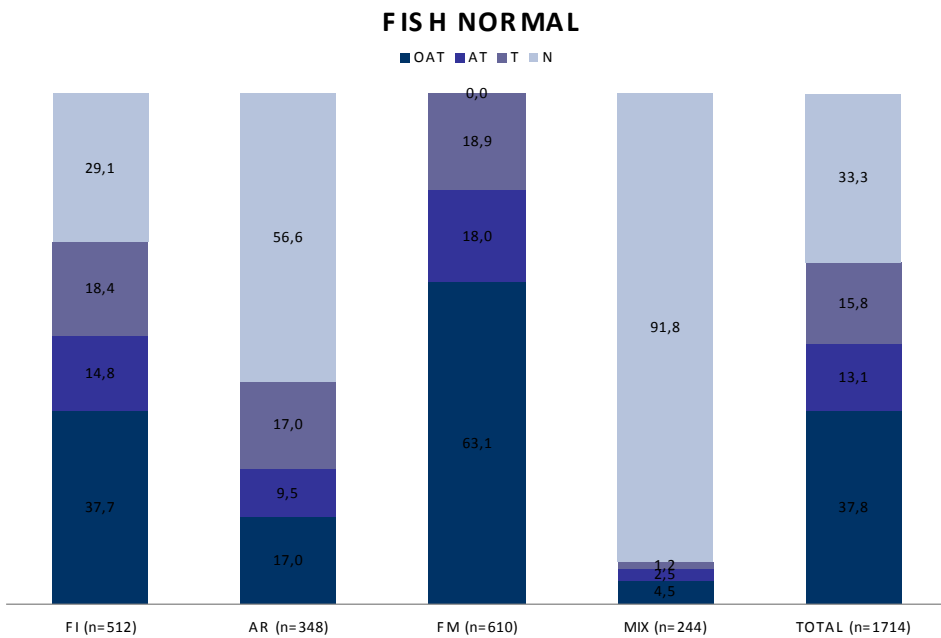
	OR	Intervalo de confianza 95% para OR		Sig.
		Límite inferior	Límite superior	
<b>Concentración</b>	0,987	0,981	0,992	<b>&lt;0,0001</b>
<b>AR/FI/FM/MIX</b>	--	--	--	0,551
<b>FI/FM/MIX</b>	1,052	0,703	1,574	0,807
<b>AR/FM/MIX</b>	1,265	0,856	1,868	0,238
<b>AR/FI/FM</b>	1,144	0,697	1,879	0,594

**Notas:** OR=Odds Ratio (OR)

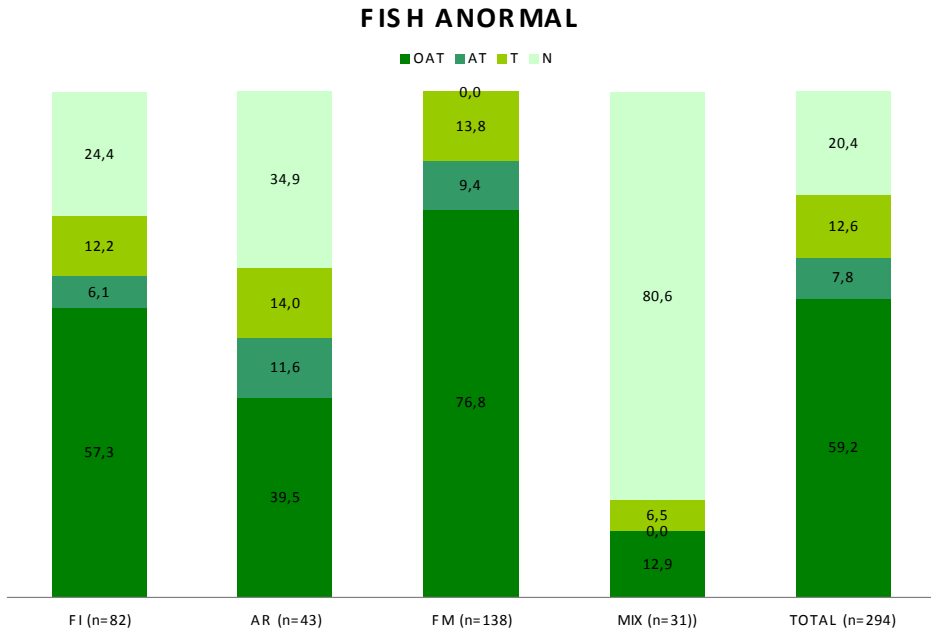
Las figuras R-5 y R-6 describen la frecuencia de pacientes con FISH normal y FISH anormal en función de los parámetros seminales (OAT=oligoastenoteratozoospermia; AT=astenoteratozoospermia; T=teratozoospermia; N=normozoospermia) en cada

grupo de indicación (FI, AR, FM, MIX). Aunque el parámetro concentración condiciona la presencia de un resultado de FISH anormal en espermatozoides, se observa una elevada incidencia de pacientes normozoospermicos en las indicaciones de FI, AR y MIX que presentan un resultado de FISH anormal, siendo esta incidencia especialmente elevada en los pacientes con AR (34,9%) y MIX (80,6%).

**Figura R-5.** Frecuencia de pacientes con FISH normal en espermatozoides en función de la indicación (FI, AR, FM, MIX) y los parámetros seminales (OAT, AT, T, N).



**Figura R-6.** Frecuencia de pacientes con FISH anormal en espermatozoides en función de la indicación (FI, AR, FM, MIX) y los parámetros seminales (OAT, AT, T, N).



- **Efecto del número de fallos de implantación sobre el resultado del FISH**

En el grupo de pacientes cuya indicación para realizarse el estudio de FISH de espermatozoides fue presentar un historial clínico de FI, se determinó si el número de fallos de implantación previos a la realización del FISH condicionaba el resultado del mismo. Para ello se realizó un análisis de varianza de la media (ANOVA de un factor) en el que los datos se presentaron como media y desviación estándar, incluyendo el intervalo de confianza del 95%. La media de fallos de implantación previos en el grupo de pacientes con FISH normal se comparó con la del grupo de pacientes con FISH anormal (3,34 vs. 3,28), no observándose diferencias entre ambos grupos ( $p=0,717$ ) (Tabla R-7).

**Tabla R-7.** Media de fallos de implantación previos al análisis de FISH de espermatozoides, en los pacientes con FISH normal y con FISH anormal.

					Intervalo de confianza para la media al 95%		
		Pacientes	Media	DS	Límite inferior	Límite superior	Sig.
FI	FISH N	512	3,34	1,41	3,22	3,46	0,717
	FISH AN	82	3,28	1,49	2,95	3,61	

**Notas:** Comparaciones inter-grupo e intra-grupo

La tabla R-8 muestra el porcentaje de pacientes que presentó un resultado de FISH anormal según el número de fallos de implantación que presentaba la pareja en el momento del análisis cromosómico de los espermatozoides. La incidencia de pacientes con un resultado de FISH anormal fue similar en todos los grupos, independientemente del número de fallos de implantación previos.

**Tabla R-8.** Porcentaje de pacientes con FISH anormal en la indicación FI, en función del número de fallos de implantación previos en el momento de la realización del FISH.

Nº FI previos	Pacientes	Con FISH AN (%)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
2	194	31 (15,98)	10,82	21,14
3	191	23 (12,04)	7,42	16,66
4	114	16 (14,04)	7,66	20,42
5	44	5 (11,36)	1,98	20,74
≥ 6	51	7 (13,73)	4,28	23,18
<i>Total</i>	594	82 (13,81)	11,04	16,58

- **Efecto del número de abortos sobre el resultado del FISH**

En el grupo de pacientes cuya indicación para realizarse el estudio de FISH de espermatozoides fue presentar un historial clínico de AR, se determinó si el número de abortos previos a la realización del FISH condicionaba el resultado del mismo. Para ello se realizó un análisis de varianza de la media (ANOVA de un factor) en el que los datos

se presentaron como media y desviación estándar, incluyendo el intervalo de confianza del 95%. La media de abortos previos en el grupo de pacientes con FISH normal se comparó con la del grupo de pacientes con FISH anormal (2,95 vs. 2,58), no observándose diferencias entre ambos grupos ( $p=0,086$ ) (Tabla R-9).

**Tabla R-9.** Media de abortos previos al análisis de FISH de espermatozoides, en los pacientes con FISH normal y con FISH anormal.

					Intervalo de confianza para la media al 95%		
		Pacientes	Media	DS	Límite inferior	Límite superior	Sig.
AR	FISH N	512	2,95	1,39	2,81	3,10	0,086
	FISH AN	82	2,58	0,82	2,33	2,83	

**Notas:** Comparaciones inter-grupo e intra-grupo

La tabla R-10 muestra el porcentaje de pacientes que presentó un resultado de FISH anormal según el número de abortos que presentaba la pareja en el momento del análisis cromosómico de los espermatozoides. Los grupos que presentaron entre 2 y 4 abortos mostraron una incidencia similar de pacientes con un resultado de FISH anormal de espermatozoides (13,7% con 2 abortos; 8,6% con 3 abortos; 11,8% con 4 abortos). Sin embargo, el 5,9% de los pacientes con 5 abortos previos mostró un resultado de FISH anormal, y ninguno de los pacientes con 6 o más abortos previos tuvo un resultado de FISH anormal en espermatozoides.

**Tabla R-10.** Porcentaje de pacientes con FISH anormal en la indicación AR, en función del número de abortos previos en el momento de la realización del FISH.

Nº Ab. previos	Pacientes	Con FISH AN (%)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
2	190	26 (13,68)	8,79	18,57
3	117	10 (8,55)	3,48	13,62
4	51	6 (11,76)	2,92	20,60
5	17	1 (5,88)	0	17,06
≥ 6	16	0	0	0
<b>Total</b>	<b>391</b>	<b>43 (10,99)</b>	<b>7,89</b>	<b>14,09</b>

## 4.2. INCIDENCIA DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS EN ESPERMATOZOIDES DE TESTÍCULO DE VARONES INFÉRTILES CON AZOOSPERMIA

### 4.2.1. FISH de espermatozoides procedentes de eyaculado y testículo de varones fértiles: control de eyaculado y control de testículo

Determinamos el valor basal de alteraciones cromosómicas numéricas (disomías y diploidía) en espermatozoides procedentes de eyaculado y de testículo de los grupos control de varones fértiles.

En el grupo control de eyaculado (CE) evaluamos un total de 102377 espermatozoides para los cromosomas 18, X e Y, y de 102209 espermatozoides para los cromosomas 13 y 21. En el grupo control de testículo (CT), el número total de espermatozoides evaluados se vio limitado por el número de espermatozoides encontrados en las muestras de aspiración de testículo, siendo este de 6821 espermatozoides evaluados para los cromosomas 18, X e Y, y de 7467 espermatozoides para los cromosomas 13 y 21 (Tabla R-11).

La incidencia de espermatozoides **haploides normales X** fue similar a la de espermatozoides **haploides normales Y** en ambos grupos control, siendo estos valores de 50,8% y 49,2% en el grupo CE y de 49,0% y 51,0% en el grupo CT, respectivamente. Sin embargo, se observó una incidencia de espermatozoides diploides y con disomía para los cromosomas 13, 21, X e Y significativamente más elevada en el grupo CT comparada con el grupo CE. De esta manera, la frecuencia total de espermatozoides aneuploides (disomía para los cinco cromosomas analizados) fue de 0,43% y de 0,79% en el grupo CE y CT respectivamente, y la frecuencia total de espermatozoides anormales (disomías + diploidía) de 0,53% y 1,06% respectivamente.

**Tabla R-11.** Resultados de FISH en espermatozoides de los grupos control de eyaculado (CE) y de testículo (CT).

Muestras	Edad	Analizados XY18	% Haploides		% Disómicos		Analizados 13/21	% Haploides		% Disómicos		% Diploides
			Cr. 18	Cr. X/Y	Cr. 13	Cr. 21		Cr. 13	Cr. 21			
CE-1	27	10.159	99,5	0,01	0,30	10.060	99,49	0,11	0,19	0,18		
CE-2	22	9.883	99,8	0,06	0,10	10.051	99,79	0,06	0,09	0,05		
CE-3	29	9.991	99,5	0,05	0,34	10.134	99,69	0,07	0,13	0,11		
CE-4	30	10.038	99,6	0,02	0,25	10.166	99,52	0,15	0,23	0,11		
CE-5	46	10.202	99,7	0,02	0,24	10.014	99,60	0,11	0,10	0,10		
CE-6	30	11.061	99,9	0,00	0,05	11.117	99,80	0,01	0,17	0,02		
CE-7	29	10.097	99,8	0,02	0,18	10.043	99,74	0,08	0,09	0,06		
CE-8	28	10.224	99,6	0,05	0,21	10.168	99,89	0,03	0,02	0,09		
CE-9	30	10.381	99,9	0,01	0,12	10.397	99,86	0,05	0,03	0,05		
CE-10	43	10.341	99,5	0,06	0,29	10.059	99,52	0,06	0,19	0,23		
<b>TOTAL CE</b>	<b>314±73</b> <i>(media±DS)</i>	<b>102.377</b>	<b>99,7</b> <i>(n=102.052)</i>	<b>0,03</b> <i>(n=30)</i>	<b>0,21</b> <i>(n=210)</i>	<b>102.209</b>	<b>99,69</b> <i>(n=101.895)</i>	<b>0,07</b> <i>(n=73)</i>	<b>0,12</b> <i>(n=126)</i>	<b>0,10</b> <i>(n=203)</i>		
CT-1	33	495	99,0	0,00	0,81	244	99,18	0,82	0,00	0,14		
CT-2	45	1.143	99,5	0,00	0,44	775	99,23	0,13	0,26	0,16		
CT-3	33	139	99,3	0,00	0,00	697	99,57	0,00	0,29	0,24		
CT-4	39	930	99,8	0,00	0,22	1.006	99,00	0,20	0,30	0,41		
CT-5	46	452	98,5	0,00	1,33	322	99,38	0,00	0,00	0,39		
CT-6	42	749	99,5	0,27	0,13	449	99,33	0,00	0,67	0,08		
CT-7	35	517	99,6	0,00	0,39	525	99,62	0,00	0,00	0,19		
CT-8	38	1.253	99,5	0,00	0,08	2.101	99,33	0,19	0,19	0,31		
CT-9	32	312	99,7	0,00	0,00	144	100,00	0,00	0,00	0,22		
CT-10	43	831	99,4	0,12	0,24	1.204	98,92	0,25	0,42	0,34		
<b>TOTAL CT</b>	<b>38.6±5,2</b> <i>(media±DS)</i>	<b>6.821</b>	<b>99,4</b> <i>(n=6.782)</i>	<b>0,04</b> <i>(n=3)</i>	<b>0,34<sup>a</sup></b> <i>(n=23)</i>	<b>7.467</b>	<b>99,26</b> <i>(n=7.412)</i>	<b>0,16<sup>a</sup></b> <i>(n=12)</i>	<b>0,25<sup>b</sup></b> <i>(n=19)</i>	<b>0,27<sup>c</sup></b> <i>(n=39)</i>		

**Notas:** Test  $\chi^2$ : <sup>a</sup>  $p<0,05$ , <sup>b</sup>  $p<0,01$ , <sup>c</sup>  $p<0,0001$  vs. total CE



#### **4.2.2. FISH de espermatozoides procedentes de biopsias de testículo de varones infértiles con azoospermia obstructiva y azoospermia secretora**

Se realizó FISH en espermatozoides de testículo a 16 varones con azoospermia obstructiva (AO) y a 19 varones con azoospermia secretora (AS). Se utilizó un test estadístico Chi-cuadrado con corrección de Yates ( $p < 0,05$ ) para comparar la incidencia de anomalías numéricas observadas en cada uno de los pacientes con los dos grupos control (CE y CT).

- **Varones con AO**

En el grupo de varones con AO se observó un incremento significativo de espermatozoides con disomía para los cromosomas sexuales comparado con el grupo CE (0,35% vs. 0,21%). Sin embargo, este grupo no mostró diferencias en la incidencia de espermatozoides anormales comparado con el grupo CT (ver Tabla R-11 y Tabla R-12).

Utilizando el grupo CE como control estadístico, las muestras AO-1 y AO-3 presentaron un resultado de FISH anormal en espermatozoides, representando un 12,5% (2/16) del total de las muestras AO evaluadas. Cuando utilizamos el grupo CT como control estadístico, únicamente la muestra AO-3 fue diagnosticada con un FISH anormal, disminuyendo a un 6,3% el porcentaje de varones con AO con elevada incidencia de espermatozoides alterados (Tabla R-12).

**Tabla R-12.** Resultados de FISH en espermatozoides de testículo del grupo de varones con AO.

Muestra	Edad	Etiología	Analizados XY18	% Disómicos		Analizados 13/21	% Disómicos		% Diploides	Resultado FISH	
				Cr. 18	Cr. X/Y		Cr. 13	Cr. 21		vs. CE	vs. CT
AO-1	37	OE	336	0,00	0,60	595	0,34	0,34	0,54 <sup>b</sup>	A	N
AO-2	37	OE	35	0,00	0,00	87	0,00	1,15	0,00	N	N
AO-3	32	CBAVD	673	0,00	1,49 <sup>c,d</sup>	279	0,00	0,36	0,11	A	A
AO-4	35	VAS	140	0,00	0,00	152	0,00	0,66	0,00	N	N
AO-5	39	VAS	450	0,00	0,44	237	0,00	0,00	0,00	N	N
AO-6	39	VAS	2.165	0,00	0,28	1.326	0,15	0,15	0,06	N	N
AO-7	34	VAS	744	0,00	0,13	60	0,00	0,00	0,12	N	N
AO-8	38	VAS	1.182	0,00	0,17	118	0,85	0,00	0,15	N	N
AO-9	47	VAS	195	0,00	0,00	80	0,00	1,25	0,00	N	N
AO-10	60	VAS	77	0,00	1,30	66	0,00	0,00	0,70	N	N
AO-11	53	VAS	128	0,00	0,00	43	0,00	0,00	0,00	N	N
AO-12	32	CBAVD	157	0,00	0,00	60	0,00	0,00	0,46	N	N
AO-13	45	VAS	116	0,00	0,00	32	0,00	0,00	0,00	N	N
AO-14	45	VAS	20	0,00	0,00	3	0,00	0,00	0,00	N	N
AO-15	43	VAS	22	0,00	0,00	59	0,00	0,00	0,00	N	N
AO-16	39	OBVD	344	0,00	0,00	238	0,00	0,00	0,00	N	N
<b>TOTAL AO</b>	<b>40,9±7,7</b> <i>(media±DS)</i>	--	<b>6.784</b>	<b>0,00</b> <i>(n=0)</i>	<b>0,35<sup>a</sup></b> <i>(n=24)</i>	<b>3.435</b>	<b>0,15</b> <i>(n=5)</i>	<b>0,23</b> <i>(n=8)</i>	<b>0,13</b> <i>(n=13)</i>	<b>A</b>	<b>N</b>

**Notas:** OE= obstrucción de epididimo; CBAVD= agenesia bilateral de conductos deferentes; VAS= vasectomía; OBVD= obstrucción bilateral de conductos deferentes.  
<sup>a</sup>p<0,05, <sup>b</sup>p<0,001, <sup>c</sup>p<0,0001 vs. total CE; <sup>d</sup>p<0,05 vs. total CT (Tabla R1); Test Chi-cuadrado.

- **Varones con AS**

En el grupo de varones con AS se observó un incremento estadísticamente significativo de espermatozoides diploides y con disomía para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y comparado con el grupo CE. Estos resultados fueron similares cuando comparamos el grupo total de AS con el total CT, excepto para las disomías del cromosoma 18 que resultaron ser similares en ambos grupos (Tabla R-13).

Utilizando el grupo CE como grupo control para comparaciones estadísticas, un 68,4% (13/19) de los varones con AS presentó un resultado de FISH anormal. Este porcentaje disminuyó cuando utilizamos el grupo CT para comparaciones estadísticas, observando en este caso un resultado de FISH anormal en un 42,1% (8/19) de los varones con AS.

Adicionalmente, comparando el total de ambos grupos de estudio, los varones con AS presentaron significativamente una mayor incidencia de espermatozoides diploides (0,56% vs. 0,13%) y con disomía para los cromosomas 13 (0,54% vs. 0,15%), 18 (0,14% vs. 0%), X e Y (1,13% vs. 0,35%) que los varones con AO.

**Tabla R-13.** Resultados de FISH en espermatozoides de testículo del grupo de varones con AS.

Muestra	Edad	Etiología	Patología	Analizados X/18	% Disómicos		Analizados 13/21	% Disómicos		% Diploides	Resultado FISH	
					Cr. 18	Cr. X/Y		Cr. 13	Cr. 21		vs. EC	vs. TC
AS-1	26	ORQ	Esclerosis	114	0,00	2,63 <sup>f,d</sup>	304	0,00	0,33	0,24	A	A
AS-2	30	CRIP1	SCO	345	0,00	0,29	212	0,47	0,94 <sup>e</sup>	0,18	A	N
AS-3	32	CRIP1	Hipo	12	8,33 <sup>h,d</sup>	50,00 <sup>h,d</sup>	19	0,00	0,00	9,68 <sup>h,d</sup>	A	A
AS-4	40	ID	Hipo	457	0,22	0,88 <sup>b</sup>	544	0,37	0,37	0,30	A	N
AS-5	34	VAR	DM	128	0,00	0,00	320	0,53 <sup>b</sup>	0,53	0,00	A	N
AS-6	36	VAR	DM	16	6,25 <sup>h,d</sup>	6,25 <sup>a</sup>	8	0,00	0,00	4,17 <sup>b</sup>	A	A
AS-7	34	ID	SCO	215	0,00	0,93	107	0,00	1,87 <sup>e,c</sup>	1,24 <sup>f,d</sup>	A	A
AS-8	36	ID	Hipo	230	0,00	2,17 <sup>g,d</sup>	450	0,22	0,67 <sup>b</sup>	0,88 <sup>e,d</sup>	A	A
AS-9	40	ID	Hipo	260	0,00	0,77	136	0,74	0,00	0,25	N	N
AS-10	32	ID	SCO	477	0,21	0,63	267	0,00	0,37	0,13	N	N
AS-11	40	ID	DM	306	0,33	0,65	166	0,60	0,60	0,21	N	N
AS-12	29	QUIM	Hipo	134	0,00	0,75	80	1,25	1,25	0,47	N	N
AS-13	41	QUIM	DM	433	0,00	0,69	397	0,50 <sup>a</sup>	0,00	0,36	A	N
AS-14	33	CRIP1	SCO	22	0,00	13,60 <sup>h,d</sup>	8	25,00 <sup>h,d</sup>	0,00	0,00	A	A
AS-15	36	ID	DM	58	0,00	0,00	58	1,72 <sup>a</sup>	1,72	0,86	A	N
AS-16	30	ID	SCO	410	0,24	0,73	471	0,85 <sup>f,d</sup>	0,85 <sup>c</sup>	0,57 <sup>c</sup>	A	A
AS-17	33	ID	Hipo	213	0,00	0,94	13	0,00	0,00	0,00	N	N
AS-18	37	VAR	DM	623	0,00	0,48	369	0,27	0,27	0,10	N	N
AS-19	35	ID	Hipo	433	0,23	2,54 <sup>h,d</sup>	323	1,24 <sup>g,d</sup>	0,31	2,38 <sup>h,d</sup>	A	A
<b>TOTAL AS</b>	<b>34,4±4,1</b> <i>(mediana)</i>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>4.886</b>	<b>0,14 <sup>b,i</sup></b> <i>(n=7)</i>	<b>1,13 <sup>h,d,i</sup></b> <i>(n=55)</i>	<b>4.252</b>	<b>0,54 <sup>g,d,i</sup></b> <i>(n=23)</i>	<b>0,52 <sup>e,d</sup></b> <i>(n=22)</i>	<b>0,56 <sup>g,d,i</sup></b> <i>(n=51)</i>	<b>A</b>	<b>A</b>

**Notas:** CRIP1=criptorquidia, DM=detención de la maduración, Hipo=hipoespermatogénesis, ID=idioipática, ORQ=orquitis, QUIM=quimioterapia, SCO=sólo células de Sertoli, VAR=varicocele; Test X<sub>2</sub>: <sup>a</sup>p<0,05, <sup>b</sup>p<0,01, <sup>c</sup>p<0,001, <sup>d</sup>p<0,0001 vs. total CE; <sup>e</sup>p<0,05, <sup>f</sup>p<0,01, <sup>g</sup>p<0,001, <sup>h</sup>p<0,0001 vs. total CT (Tabla R-11); <sup>i</sup>p<0,01, <sup>j</sup>p<0,0001 vs. total AO (Tabla R-12)

### 4.3. RESULTADOS CLÍNICOS EN PAREJAS CON INFERTILIDAD MASCULINA Y CON PRESENCIA DE ESPERMATOZOIDES EN EYACULADO

De los 2008 pacientes a los que se les realizó un estudio de FISH en espermatozoides, 1527 pacientes realizaron un total de 4143 ciclos de fecundación *in vitro* convencional (FIV o ICSI) sin análisis cromosómico de los embriones, y 481 pacientes realizaron un total de 1097 ciclos de DGP mediante FISH para estudio de aneuploidías de 9 cromosomas por indicación de aborto de repetición, fallo repetido de implantación, factor masculino (incluido FISH anormal en espermatozoides), edad materna avanzada o causas mixtas.

#### 4.3.1. Resultados en función del resultado del estudio de FISH en espermatozoides

En la tabla R-14 se resumen los resultados clínicos de los ciclos de reproducción asistida realizados en estas parejas, en función del resultado del estudio de FISH en los espermatozoides. En los pacientes que se realizaron **ciclos de FIV/ICSI convencional**, en aquellos casos con un FISH de espermatozoides anormal se observó una disminución significativa en el porcentaje de ciclos con transferencia embrionaria comparado con el grupo de pacientes con un resultado de FISH normal (73,2% vs. 82,6%,  $p < 0,0001$ ). La tasa de embarazo por transferencia y la tasa de implantación fueron también significativamente inferiores en los pacientes con FISH anormal comparado con los pacientes con FISH normal de espermatozoides (tasa gestación: 18,1% vs. 36,3%; tasa implantación: 8,9% vs. 22,8%, respectivamente,  $p < 0,0001$ ), a pesar de transferir un número mayor de embriones en los casos con FISH anormal. La tasa de aborto en los pacientes con FISH anormal fue significativamente superior a la de los pacientes con FISH normal (62,5% vs. 34,9%,  $p < 0,0001$ , respectivamente). Y la tasa de ciclos que finalizaron con recién nacido vivo (RNV) fue significativamente menor en los pacientes con FISH anormal comparado con los pacientes con FISH normal de espermatozoides (4,9% vs. 19,6%,  $p < 0,0001$ , respectivamente).

En los pacientes que se realizaron **ciclos de DGP** (n=1097), sólo 249 ciclos fueron por factor masculino, y los ciclos restantes fueron por indicaciones tales como aborto de repetición, fallo repetido de implantación, edad materna avanzada o causas mixtas, donde la etiología de las anomalías cromosómicas podía ser tanto de origen masculino como femenino. Los ciclos con un resultado de FISH anormal en espermatozoides presentaron un porcentaje de embriones con anomalías cromosómicas significativamente menor que los pacientes con un resultado de FISH normal (56,9% vs. 70,8%,  $p<0,0001$ , respectivamente). La tasa de ciclos con transferencia embrionaria fue superior en los pacientes con FISH anormal que en los pacientes con FISH normal (73,6% vs. 57,5%,  $p<0,0001$ , respectivamente), así como la tasa de gestación por transfer (44% vs. 31,5%,  $p<0,01$ , respectivamente) y la tasa de implantación embrionaria (36,2% vs. 24,9%,  $p<0,001$ , respectivamente). Los pacientes con FISH anormal presentaron significativamente menor tasa de aborto tras DGP que los pacientes con FISH normal (18,5% vs. 31,2%,  $p<0,05$ , respectivamente). Y la tasa de ciclos con RNV fue significativamente superior en los pacientes con FISH anormal comparado con los pacientes con FISH normal en espermatozoides (26,4% vs. 12,5%,  $p<0,0001$ , respectivamente).

Adicionalmente, se compararon los resultados clínicos de los ciclos de FIV/ICSI convencional con los de los ciclos de DGP. Los pacientes con **FISH normal en espermatozoides** presentaron mayor número de transferencias embrionarias (82,6% vs. 57,5%,  $p<0,0001$ ) y mayor número medio de embriones transferidos ( $2,1\pm 0,7$  vs.  $1,6\pm 0,6$ ,  $p<0,0001$ ) en los ciclos de FIV/ICSI convencional comparado con los ciclos de DGP. Aunque en ambos tratamientos se observaron similares tasas de gestación clínica (36,3% vs. 31,5%, respectivamente), implantación (22,8% vs. 24,9%, respectivamente) y aborto (34,9% vs. 31,2%, respectivamente), la tasa de ciclos con RNV fue superior en los ciclos de FIV/ICSI convencional que en los ciclos de DGP (19,6% vs. 12,5%,  $p<0,0001$ , respectivamente). Sin embargo, los pacientes con **FISH anormal en espermatozoides**

presentaron significativamente menor tasa de gestación clínica (18,1% vs. 44%,  $p<0,0001$ ) e implantación (8,9% vs. 36,2%,  $p<0,0001$ ) y mayor tasa de aborto (62,5% vs. 18,5%,  $p<0,0001$ ) en los ciclos de FIV/ICSI convencional comparado con los ciclos de DGP, a pesar de transferir un número medio de embriones significativamente superior (2,3±0,9 vs. 1,6±0,6,  $p<0,0001$ ). En estos pacientes, la tasa de ciclos con RNV fue significativamente superior en los ciclos de DGP comparado con los ciclos de FIV/ICSI convencional (26,4% vs. 4,9%,  $p<0,0001$ , respectivamente).

**Tabla R-14.** Resultados clínicos de los ciclos de FIV/ICSI convencional y de los ciclos de DGP, en función de los resultados del FISH en espermatozoides.

	FIV/ICSI convencional		DGP	
	FISH normal (n=1385 pac.)	FISH anormal (n=142 pac.)	FISH normal (n=329 pac.)	FISH anormal (n=152 pac.)
Edad media mujer (±DS)	34,1 (3,5)	33,8 (3,8)	36,2 (3,7)	33,8 (3,7)
Edad media varón (±DS)	37,7 (5,3)	37,1 (4,4)	38,9 (10,1)	36,8 (9,1)
Nº de ciclos de ICSI	3841	302	779	318
Nº de embriones biopsiados	--	--	3529	1286
Nº de embriones informativos (%)	--	--	3376 (95,7)	1243 (96,7)
Nº de embriones anormales (%)	--	--	2391 (70,8) <sup>f</sup>	707 (56,9) <sup>f</sup>
Nº de transferencias (%)	3174 (82,6) <sup>a, k</sup>	221 (73,2) <sup>a</sup>	448 (57,5) <sup>a, k</sup>	234 (73,6) <sup>a</sup>
Embriones transferidos	6748	516	730	379
Media de embriones transferidos (±DS)	2,1 (0,7) <sup>b, l</sup>	2,3 (0,9) <sup>b, m</sup>	1,6 (0,6) <sup>l</sup>	1,6 (0,6) <sup>m</sup>
Tasa gestación clínica/transfer (%)	1153 (36,3) <sup>f</sup>	40 (18,1) <sup>c, n</sup>	141 (31,5) <sup>h</sup>	103 (44) <sup>h, n</sup>
Tasa implantación (%)	1540 (22,8) <sup>d</sup>	46 (8,9) <sup>d, o</sup>	182 (24,9) <sup>i</sup>	137 (36,2) <sup>h, o</sup>
Tasa aborto (%)	402 (34,9) <sup>e</sup>	25 (62,5) <sup>e</sup>	44 (31,2) <sup>j</sup>	19 (18,5) <sup>j</sup>
Tasa de ciclos con RNV (%)	751 (19,6) <sup>a, s</sup>	15 (4,9) <sup>a, t</sup>	97 (12,5) <sup>r, s</sup>	84 (26,4) <sup>r, t</sup>

**NOTAS:** b-b, d-d, e-e, f-f, g-g, k-k, l-l, m-m, n-n, o-o, p-p, q-q, r-r, s-s, t-t  $p<0,0001$ ; c-c, i-i  $p<0,001$ ; a-a, h-h  $p<0,01$ ; j-j  $p<0,05$ . Test Chi-cuadrado con corrección de Yates, test exacto de Fisher y test t-Welch

Para determinar de forma más adecuada el posible efecto del factor masculino en los resultados clínicos, analizamos los resultados obtenidos en el grupo de **mujeres jóvenes (≤37 años)**. Los resultados en este grupo fueron muy similares a los descritos para la población total, tanto en los ciclos de FIV/ICSI convencional como en los ciclos de DGP (Tabla R-15). La tasa de embriones cromosómicamente anormales fue de 67,1% en los

pacientes con FISH normal de espermatozoides y de 61,6% en los pacientes con FISH anormal ( $p < 0,001$ ). De nuevo, los pacientes con FISH normal presentaron tasas de gestación, implantación y aborto similares en los ciclos de FIV/ICSI convencional comparado con los ciclos de DGP, a pesar de presentar mayor porcentaje de ciclos con transferencia (84% vs. 68,7%,  $p < 0,0001$ ) y mayor número medio de embriones transferidos ( $2,1 \pm 0,6$  vs.  $1,6 \pm 0,6$ ,  $p < 0,0001$ ). La tasa de ciclos con RNV fue significativamente superior en los ciclos con FIV/ICSI convencional comparado con los ciclos de DGP (20,6% vs. 16,7%,  $p < 0,05$  respectivamente). Sin embargo, los pacientes con FISH anormal en espermatozoides mostraron significativamente menores tasas de gestación (18,4% vs. 45,6%,  $p < 0,0001$ ) e implantación (9,7% vs. 37,3%,  $p < 0,0001$ ), y mayor tasa de aborto (60,5% vs. 17,2%,  $p < 0,0001$ ) en los ciclos de FIV/ICSI convencional comparado con los ciclos de DGP, a pesar del mayor número de embriones transferido ( $2,3 \pm 0,9$  vs.  $1,6 \pm 0,6$ ,  $p < 0,0001$  respectivamente). En estos pacientes, la tasa de ciclos con RNV fue significativamente superior en los ciclos con DGP comparado con los ciclos de FIV/ICSI convencional (29,3% vs. 5,4%,  $p < 0,0001$  respectivamente).



**Tabla R-15.** Resultados clínicos en pacientes jóvenes ( $\leq 37$  años) de los ciclos de FIV/ICSI convencional y de los ciclos de DGP, en función de los resultados del FISH en espermatozoides.

♀ $\leq 37a$	FIV/ICSI convencional		DGP	
	FISH normal (n=1233 pac.)	FISH anormal (n=127 pac.)	FISH normal (n=184 pac.)	FISH anormal (n=133 pac.)
Edad media mujer ( $\pm$ DS)	33,0 (2,8)	32,8 (2,7)	33,9 (2,4)	32,7 (2,8)
Edad media varón ( $\pm$ DS)	37,5 (5,3)	36,6 (4,2)	37,9 (11,2)	35,9 (8,7)
Nº de ciclos de ICSI	3521	276	504	280
Nº de embriones biopsiados	--	--	2552	1399
Nº de embriones informativos (%)	--	--	2438 (95,5)	1349 (96,4)
Nº de embriones anormales (%)	--	--	1636 (67,1) <sup>f</sup>	831 (61,6) <sup>f</sup>
Nº de transferencias (%)	2959 (84,0) <sup>a,i</sup>	207 (75,0) <sup>a</sup>	346 (68,7) <sup>b,j</sup>	217 (77,5) <sup>g</sup>
Embriones transferidos	6307	480	585	351
Media de embriones transferidos ( $\pm$ DS)	2,1 (0,6) <sup>b,k</sup>	2,3 (0,9) <sup>b,l</sup>	1,7 (0,6) <sup>k</sup>	1,6 (0,6) <sup>l</sup>
Tasa gestación clínica/transfer (%)	1108 (37,5) <sup>c</sup>	38 (18,4) <sup>c,m</sup>	114 (32,9) <sup>h</sup>	99 (45,6) <sup>h,m</sup>
Tasa implantación (%)	1485 (23,6) <sup>d</sup>	44 (9,7) <sup>d,n</sup>	151 (25,8) <sup>i</sup>	131 (37,3) <sup>i,n</sup>
Tasa aborto (%)	382 (34,5) <sup>e</sup>	23 (60,5) <sup>e,o</sup>	30 (26,3)	17 (17,2) <sup>o</sup>
Tasa de ciclos con RNIV (%)	726 (20,6) <sup>p,r</sup>	15 (5,4) <sup>p,s</sup>	84 (16,7) <sup>p,r</sup>	82 (29,3) <sup>q,s</sup>

**NOTAS:** b-b, c-c, d-d, j-j, k-k, l-l, m-m, n-n, o-o, p-p, q-q, s-s p<0,0001; a-a, f-f, i-i p<0,001; e-e, h-h p<0,01; g-g, r-r p<0,05. Test Chi-cuadrado con corrección de Yates, test exacto de Fisher y test t-Welch

#### 4.3.2. Estudios de asociación de las alteraciones cromosómicas en los espermatozoides con los resultados clínicos

Para poder determinar la posible asociación entre la probabilidad de presentar gestación clínica (con visualización de saco), implantación, aborto y nacido vivo (consideradas como variables cualitativas) con la incidencia de las diferentes anomalías cromosómicas en los espermatozoides (DISSEX, DIPL, AneuT, AnT) y el resultado final del FISH en espermatozoides (normal, anormal), se realizó un análisis de regresión logística en el que se incluyó en el modelo la edad de la mujer en el momento de la realización del ciclo. Para cada uno de los análisis, los datos se presentaron como Odds Ratio (OD) incluyendo el intervalo de confianza del 95%.

#### 4.3.2.1. Asociación con los resultados clínicos de FIV/ICSI convencional

- **Relación con la gestación clínica (GC)**

El análisis de regresión logística determinó ausencia de asociación entre la probabilidad de presentar GC y el porcentaje de espermatozoides con las diferentes anomalías cromosómicas (DISSEX, DIPL, AneuT y AnT) observado en el estudio de FISH (Tabla R-16). Sin embargo, sí que se observó una asociación tanto con el resultado final del FISH en espermatozoides como con la edad de la mujer en el ciclo. De esta manera, la probabilidad de presentar GC tras un ciclo de FIV/ICSI convencional en pacientes con un resultado de FISH normal en espermatozoides fue 2,617 veces superior a la de los pacientes con un FISH anormal en espermatozoides. Además, se observó una asociación negativa con la edad de la mujer, disminuyendo en 0,937 veces la probabilidad de obtener una GC por cada año que aumentaba la edad de la mujer en el ciclo.

**Tabla R-16.** Relación de las alteraciones cromosómicas en espermatozoides con la presencia de gestación clínica.

	OR	Intervalo de confianza para OR al 95%		Sig.
		Límite inferior	Límite superior	
<b>% Dissex</b>	1,002	0,786	1,278	0,987
<b>% Dipl</b>	3,303	2,752E-07	3,964E+07	0,886
<b>% AneuT</b>	1,002	0,988	1,017	0,778
<b>% AnT</b>	0,847	0,544	1,319	0,463
<b>FISH normal/anormal</b>	<b>2,617</b>	1,843	3,718	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Edad mujer en el ciclo</b>	<b>0,937</b>	0,913	0,962	<b>&lt;0,0001</b>

**Notas:** OR=Odds Ratio (OR)

- **Relación con la tasa de implantación embrionaria (TI)**

Para estudiar la posible relación entre la incidencia de las diferentes anomalías cromosómicas en los espermatozoides y la tasa de implantación embrionaria en los

ciclos de FIV/ICSI convencional, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. De esta manera, se determinó una relación lineal únicamente entre el porcentaje de espermatozoides diploides y la tasa de implantación embrionaria (Tabla R-17), observándose un descenso en la tasa de implantación con el incremento en el porcentaje de espermatozoides diploides en el eyaculado.

**Tabla R-17.** Estudio de correlación de las alteraciones cromosómicas en espermatozoides con la tasa de implantación tras FIV/ICSI.

		<b>TI</b>
<b>% Dissex</b>	Correlación de Pearson	0,007
	Sig. (bilateral)	0,675
	N	3395
<b>% Dipl</b>	Correlación de Pearson	-0,036
	Sig. (bilateral)	<b>0,037</b>
	N	3395
<b>% AneuT</b>	Correlación de Pearson	0,000
	Sig. (bilateral)	0,981
	N	3395
<b>% AnT</b>	Correlación de Pearson	0,003
	Sig. (bilateral)	0,851
	N	3395

**Nota:** la correlación es significativa al nivel 0,05 bilateral

Posteriormente transformamos la variable cuantitativa tasa de implantación embrionaria en una variable cualitativa con las siguientes categorías:

- **TI $\geq$ 50%:** implantan 1 de 2; ó 2 de 3; ó 2 de 2; ó 3 de 3 embriones transferidos.
- **TI<50%:** no implanta ningún embrión, ó implanta 1 de 3 embriones transferidos.

De esta manera, con el análisis de regresión logística se determinó la posible asociación entre la probabilidad de presentar una TI $\geq$ 50% y la incidencia de las diferentes anomalías cromosómicas en los espermatozoides, el resultado final del FISH en

espermatozoides y la edad de la mujer en el ciclo. El análisis determinó ausencia de asociación entre la probabilidad de presentar  $Ti \geq 50\%$  y el porcentaje de espermatozoides con los diferentes tipos de anomalías cromosómicas (DISSEX, DIPL, AneuT y AnT) observado en el estudio de FISH (Tabla R-18). Sin embargo, sí que se observó una asociación tanto con el resultado final del FISH en espermatozoides como con la edad de la mujer en el ciclo. Respecto al resultado del FISH, la probabilidad de presentar una  $Ti \geq 50\%$  en pacientes con FISH normal fue 4,551 veces superior a la de los pacientes con un FISH anormal en espermatozoides. De nuevo se observó una asociación negativa con la edad de la mujer, disminuyendo en 0,929 veces la probabilidad de obtener una  $Ti \geq 50\%$  por cada año que aumentaba la edad de la mujer en el ciclo.

**Tabla R-18.** Relación de las alteraciones cromosómicas en espermatozoides con la tasa de implantación.

	OR	Intervalo de confianza para OR al 95%		Sig.
		Límite inferior	Límite superior	
<b>% Dissex</b>	1,662	0,960	2,875	0,069
<b>% Dipl</b>	0,820	0,425	1,584	0,555
<b>% AneuT</b>	0,606	0,350	1,048	0,073
<b>% AnT</b>	1,213	4,202E-08	3,502E+07	0,982
<b>FISH normal/anormal</b>	<b>4,551</b>	2,796	7,408	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Edad mujer en el ciclo</b>	<b>0,929</b>	0,904	0,955	<b>&lt;0,0001</b>

**Notas:** OR=Odds Ratio (OR)

- **Relación con la presencia de aborto (AB)**

En este caso, el análisis de regresión logística determinó una asociación entre la probabilidad de que se produzca aborto y el porcentaje total de espermatozoides con aneuploidías, el porcentaje total de espermatozoides con anomalías cromosómicas, el resultado final del estudio de FISH en espermatozoides y la edad de la mujer en el ciclo (Tabla R-19). De este modo, la probabilidad de que se produzca aborto tras un ciclo de

FIV/ICSI en pacientes con FISH normal en espermatozoides fue 0,434 veces inferior a la de los pacientes con un FISH anormal en espermatozoides, y disminuyó en 0,280 veces por cada unidad en que se incrementaba el porcentaje de espermatozoides aneuploides. Sin embargo, esta probabilidad aumentó 3,623 veces por cada unidad en que se incrementaba el porcentaje total de espermatozoides anormales en el eyaculado, y 1,098 veces por cada año que aumentaba la edad de la mujer en el ciclo.

**Tabla R-19.** Relación de las alteraciones cromosómicas en espermatozoides con la presencia de aborto.

	OR	Intervalo de confianza para OR al 95%		Sig.
		Límite inferior	Límite superior	
<b>% Dissex</b>	0,046	2,023E-14	1,026E+11	0,831
<b>% Dipl</b>	0,721	0,343	1,515	0,389
<b>% AneuT</b>	<b>0,280</b>	0,096	0,820	<b>0,020</b>
<b>% AnT</b>	<b>3,623</b>	1,237	10,606	<b>0,019</b>
<b>FISH normal/anormal</b>	<b>0,434</b>	0,217	0,869	<b>0,018</b>
<b>Edad mujer en el ciclo</b>	<b>1,098</b>	1,045	1,153	<b>&lt;0,0001</b>

**Notas:** OR=Odds Ratio (OR)

- **Relación con la probabilidad de recién nacido vivo (RNV)**

Finalmente, con el análisis de regresión logística se observó una asociación entre la probabilidad de obtener un RNV y el porcentaje total de espermatozoides con anomalías cromosómicas, el resultado final del estudio de FISH en espermatozoides y la edad de la mujer en el ciclo (Tabla R-20). Así, la probabilidad de obtener un RNV tras un ciclo de FIV/ICSI convencional en pacientes con FISH normal en espermatozoides fue 3,782 veces superior a la de los pacientes con un FISH anormal en espermatozoides. Sin embargo, esta probabilidad disminuyó 0,460 veces por cada unidad en que se incrementaba el porcentaje total de espermatozoides anormales en el eyaculado, y 0,897 veces por cada año que aumentaba la edad de la mujer en el ciclo.

**Tabla R-20.** Relación de las alteraciones cromosómicas en espermatozoides con la presencia de RNV.

	OR	Intervalo de confianza para OR al 95%		Sig.
		Límite inferior	Límite superior	
<b>% Dissex</b>	1,118	0,627	1,994	0,704
<b>% Dipl</b>	30,482	2,585E-07	3,594E+09	0,719
<b>% AneuT</b>	2,163	1,000	4,679	0,05
<b>% AnT</b>	<b>0,460</b>	0,213	0,995	<b>0,049</b>
<b>FISH normal/anormal</b>	<b>3,782</b>	2,170	6,592	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Edad mujer en el ciclo</b>	<b>0,897</b>	0,871	0,923	<b>&lt;0,0001</b>

**Notas:** OR=Odds Ratio (OR)

#### 4.3.2.2. Asociación con los resultados clínicos de DGP

- **Relación con la gestación clínica (GC)**

El análisis de regresión logística determinó ausencia de asociación entre la probabilidad de presentar GC tras DGP y el porcentaje de espermatozoides con disomía para los cromosomas sexuales, el porcentaje total de espermatozoides con aneuploidías y el resultado final del FISH en espermatozoides (Tabla R-21). Sin embargo, sí que se observó una asociación con el porcentaje de espermatozoides diploides, el porcentaje total de espermatozoides anormales y la edad de la mujer en el ciclo. Así, la probabilidad de presentar GC tras un ciclo de DGP disminuyó en 0,644 veces por cada unidad en que incrementaba el porcentaje de espermatozoides diploides en el eyaculado, y en 0,925 veces por cada año que aumentaba la edad de la mujer en el ciclo. Por el contrario, la probabilidad de obtener una GC tras DGP aumentó en 1,392 veces por cada unidad en que incrementaba el porcentaje total de espermatozoides anormales en el eyaculado.

**Tabla R-21.** Relación de las alteraciones cromosómicas en espermatozoides con la presencia o no de gestación clínica.

	OR	Intervalo de confianza para OR al 95%		Sig.
		Límite inferior	Límite superior	
<b>% Dissex</b>	0,604	0,257	1,419	0,247
<b>% Dipl</b>	<b>0,644</b>	0,449	0,924	<b>0,017</b>
<b>% AneuT</b>	0,000	7,105E-19	9,502E+10	0,629
<b>% AnT</b>	<b>1,392</b>	1,083	1,790	<b>0,010</b>
<b>FISH normal/anormal</b>	0,787	0,521	1,189	0,255
<b>Edad mujer en el ciclo</b>	<b>0,925</b>	0,880	0,972	<b>0,002</b>

**Notas:** OR=Odds Ratio (OR)

- **Relación con la tasa de implantación embrionaria (TI)**

El coeficiente de correlación de Pearson determinó una relación lineal del porcentaje de espermatozoides con disomía para los cromosomas sexuales y el porcentaje total de espermatozoides aneuploides, con la tasa de implantación embrionaria en los ciclos con DGP (Tabla R-22). Esta relación resultó ser positiva, observándose un incremento en la tasa de implantación con el incremento en el porcentaje de espermatozoides con dichas anomalías en el eyaculado.

**Tabla R-22.** Estudio de correlación de las alteraciones cromosómicas en espermatozoides con la tasa de implantación tras DGP.

		TI
<b>% Dissex</b>	Correlación de Pearson	0,118
	Sig. (bilateral)	<b>0,002</b>
	N	682
<b>% Dipl</b>	Correlación de Pearson	-0,006
	Sig. (bilateral)	0,867
	N	682
<b>% AneuT</b>	Correlación de Pearson	0,111
	Sig. (bilateral)	<b>0,004</b>
	N	682
<b>% AnT</b>	Correlación de Pearson	0,037
	Sig. (bilateral)	0,330
	N	682

**Nota:** la correlación es significativa al nivel 0,05 bilateral

Al igual que en el apartado anterior para ciclos de FIV/ICSI convencional (ver apartado 4.3.2.1), transformamos la variable cuantitativa tasa de implantación embrionaria en una variable cualitativa, con las categorías  $TI \geq 50\%$  y  $TI < 50\%$ . Se realizó un análisis de regresión logística para determinar la posible asociación entre la probabilidad de presentar una  $TI \geq 50\%$  tras DGP y la incidencia de anomalías cromosómicas observadas en el FISH de espermatozoides, la presencia de un resultado de FISH normal y la edad de la mujer en el ciclo. El análisis determinó ausencia de asociación entre la probabilidad de presentar  $TI \geq 50\%$  tras DGP y el porcentaje de espermatozoides con disomía de cromosomas sexuales, el porcentaje total de espermatozoides aneuploides, y el resultado final del FISH en espermatozoides (Tabla R-23). Al igual que ocurría con la GC, se observó una asociación con el porcentaje de espermatozoides diploides, el porcentaje total de espermatozoides anormales, y con la edad de la mujer en el ciclo. De esta manera, la probabilidad de presentar una  $TI \geq 50\%$  tras un ciclo de DGP disminuyó en 0,638 veces por cada unidad en que se incrementaba el porcentaje de espermatozoides diploides en el eyaculado, y en 0,928 veces por cada año que aumentaba la edad de la mujer en el ciclo. Sin embargo, la probabilidad de obtener una  $TI \geq 50\%$  tras DGP aumentó en 1,405 veces por cada unidad en que se incrementaba el porcentaje total de espermatozoides anormales en el eyaculado.

**Tabla R-23.** Relación de las alteraciones cromosómicas en espermatozoides con la tasa de implantación.

	OR	Intervalo de confianza para OR al 95%		Sig.
		Límite inferior	Límite superior	
<b>% Dissex</b>	0,644	0,275	1,510	0,312
<b>% Dipl</b>	<b>0,638</b>	0,443	0,917	<b>0,015</b>
<b>% AneuT</b>	0,000	5,109E-19	8,889E+10	0,623
<b>% AnT</b>	<b>1,405</b>	1,092	1,809	<b>0,008</b>
<b>FISH normal/anormal</b>	0,818	0,539	1,241	0,345
<b>Edad mujer en el ciclo</b>	<b>0,928</b>	0,883	0,976	<b>0,003</b>

**Notas:** OR=Odds Ratio (OR)



- **Relación con la presencia de aborto (AB)**

El análisis de regresión logística únicamente determinó asociación entre la probabilidad de que se produzca aborto y la edad de la mujer en el ciclo, incrementando la probabilidad en 1,105 veces por cada año que aumentaba la edad de la mujer en el ciclo (Tabla R-24). Así pues, no se observó asociación ni con el porcentaje de espermatozoides con los diferentes tipos de anomalías cromosómicas (DISSEX, DIPL, AneuT y AnT) en espermatozoides, ni con el resultado final del FISH en espermatozoides.

**Tabla R-24.** Relación de las alteraciones cromosómicas en espermatozoides con la presencia de aborto.

	OR	Intervalo de confianza para OR al 95%		Sig.
		Límite inferior	Límite superior	
<b>% Dissex</b>	1,754	0,325	9,464	0,514
<b>% Dipl</b>	1,277	0,475	3,436	0,628
<b>% AneuT</b>	3,698E+12	3,419E-15	4,000E+39	0,362
<b>% AnT</b>	0,978	0,767	1,248	0,860
<b>FISH normal/anormal</b>	1,788	0,956	3,342	0,069
<b>Edad mujer en el ciclo</b>	<b>1,105</b>	1,007	1,213	<b>0,035</b>

Notas: OR=Odds Ratio (OR)

- **Relación con la probabilidad de recién nacido vivo (RNV)**

Por último, con el análisis de regresión logística se observó una asociación negativa de la probabilidad de obtener un RNV con el resultado final del estudio de FISH en espermatozoides y con la edad de la mujer en el ciclo (Tabla R-25). De esta manera, la probabilidad de obtener un RNV tras un ciclo de DGP en pacientes con FISH normal en espermatozoides fue 0,541 veces inferior a la de los pacientes con un FISH anormal en espermatozoides. Además, esta probabilidad disminuyó 0,854 veces por cada año que aumentaba la edad de la mujer en el ciclo.

**Tabla R-25.** Relación de las alteraciones cromosómicas en espermatozoides con la presencia de RNV.

	OR	Intervalo de confianza para OR al 95%		Sig.
		Límite inferior	Límite superior	
<b>% Dissex</b>	0,971	0,744	1,267	0,827
<b>% Dipl</b>	0,929	0,810	1,065	0,292
<b>% AneuT</b>	0,988	0,924	1,056	0,712
<b>% AnT</b>	2,450E+11	0,000	3,785E+26	0,142
<b>FISH normal/anormal</b>	<b>0,541</b>	0,383	0,763	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Edad mujer en el ciclo</b>	<b>0,854</b>	0,812	0,897	<b>&lt;0,0001</b>

**Notas:** OR=Odds Ratio (OR)

#### 4.3.3. Relación de los resultados clínicos con los cuartiles de las diferentes anomalías observadas en los espermatozoides

Para poder evaluar la relación entre la incidencia de anomalías cromosómicas en espermatozoides y los resultados clínicos, se dividió la población en cuartiles teniendo en cuenta la incidencia de DISSEX, DIPL, AneuT y AnT en los espermatozoides (tabla R-26), y se determinó el porcentaje de ciclos de FIV/ICSI convencional y de ciclos de DGP en cada cuartil en los que se obtuvo gestación clínica (GC), tasa de implantación (TI)  $\geq 50\%$ , aborto (AB) y recién nacido vivo (RNV). Para cada caso, se diseñó una tabla de contingencia y se analizaron los datos mediante Chi-cuadrado ( $p < 0,05$ ).

**Tabla R-26.** División de la población de 2008 varones infértiles en cuartiles de DISSEX, DIPL, AnT y AnT en espermatozoides.

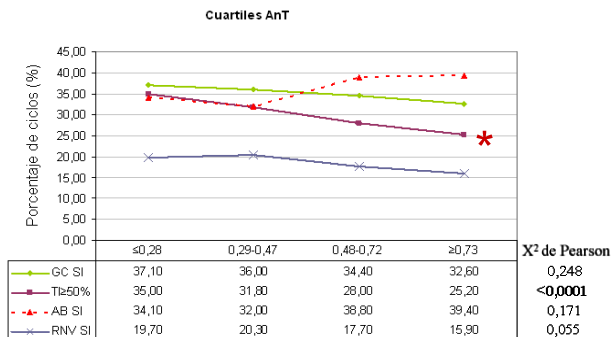
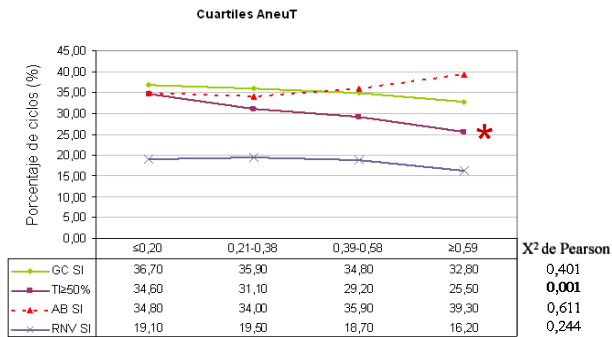
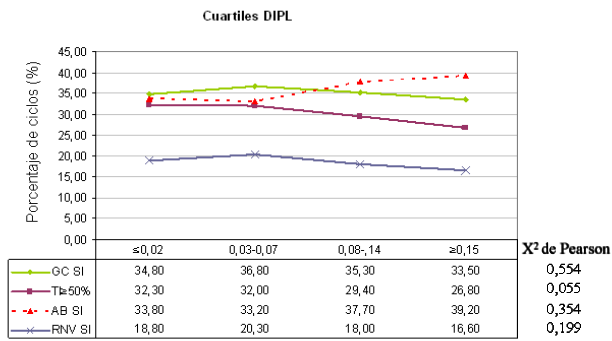
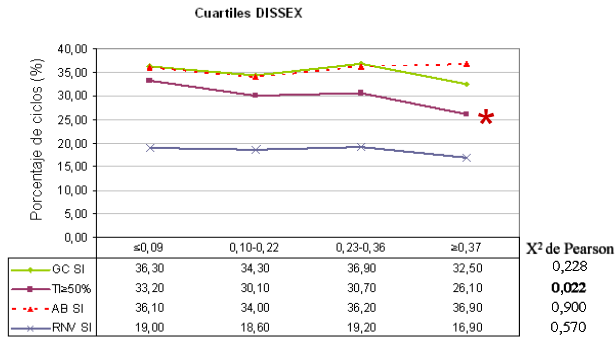
CUARTIL	DISSEX	DIPL	AneuT	AnT
<b>Q1</b>	$\leq 0,09$	$\leq 0,02$	$\leq 0,20$	$\leq 0,28$
<b>Q2</b>	0,10-0,22	0,03-0,07	0,21-0,38	0,29-0,47
<b>Q3</b>	0,23-0,36	0,08-0,14	0,39-0,58	0,48-0,72
<b>Q4</b>	$\geq 0,37$	$\geq 0,15$	$\geq 0,59$	$\geq 0,73$

**Nota:** cada cuartil contiene al 25% de la población.

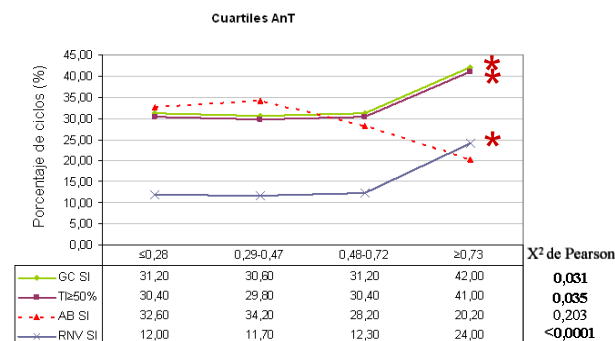
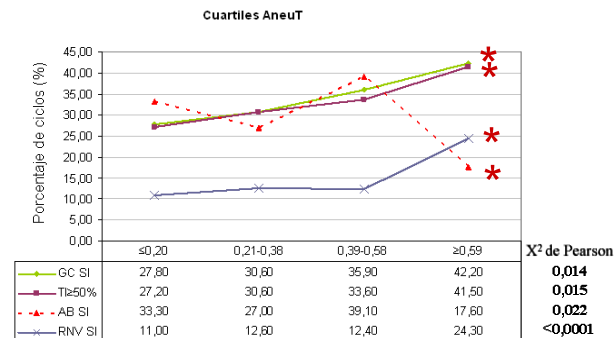
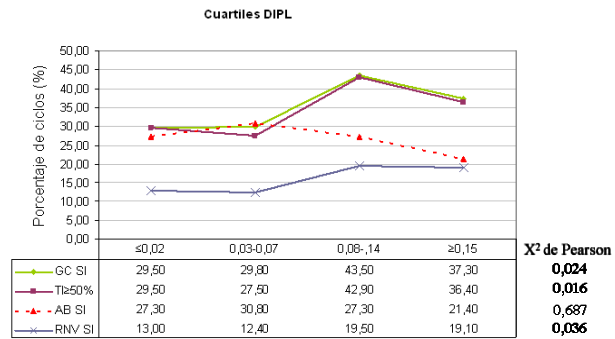
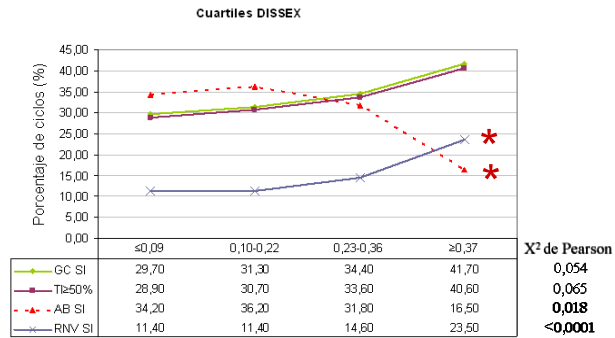
En la figura R-7 se muestran los resultados referentes a los **ciclos en los que se realizó FIV/ICSI convencional**. El porcentaje de ciclos con GC y RNV fue comparable en todos los cuartiles de DISSEX, DIPL, AneuT y AnT en espermatozoides. En cambio, el porcentaje de ciclos con una  $TI \geq 50\%$  disminuyó de forma gradual desde el cuartil con menor incidencia hasta el cuartil con mayor incidencia de DISSEX, AneuT y AnT en espermatozoides, siendo significativamente menor en el cuartil con mayor incidencia de espermatozoides anormales comparado con el resto de cuartiles (DISSEX: 33,2% (Q1), 30,1% (Q2), 30,7% (Q3) vs. 26,1% (Q4),  $p=0,022$ ; AneuT: 34,6% (Q1), 31,1% (Q2), 29,2% (Q3) vs. 25,5% (Q4),  $p=0,0001$ ; AnT: 35,0% (Q1), 31,8% (Q2), 28,0% (Q3) vs. 25,2% (Q4),  $p<0,0001$ ). Esta misma tendencia aunque sin alcanzar significancia estadística, se observó respecto a los cuartiles de DIPL (32,3% (Q1), 32,0% (Q2), 29,4% (Q3), 26,8% (Q4),  $p=0,055$ ). Sin embargo, el porcentaje de ciclos con abortos fue ligeramente superior aunque sin alcanzar diferencias significativas en el cuartil de mayor incidencia de DIPL, AneuT y AnT respecto al resto de cuartiles.

La figura R-8 muestra los resultados referentes a los **ciclos de DGP**, en los que se observa una tendencia opuesta a la descrita para ciclos de FIV/ICSI convencional. El porcentaje de ciclos con GC,  $TI \geq 50\%$  y RNV fue significativamente más elevado en el cuartil con mayor incidencia de DIPL, AneuT y AnT en espermatozoides comparado con el resto de cuartiles. El análisis de los resultados clínicos en función de los cuartiles de DISSEX mostró este mismo incremento de manera significativa únicamente para el porcentaje de ciclos con RNV (11,4% (Q1), 11,4% (Q2), 14,6% (Q3) vs. 23,5% (Q4),  $p<0,0001$ ). Por el contrario, el porcentaje de ciclos con abortos disminuyó de forma significativa en el cuartil con mayor incidencia de DISSEX y AneuT en espermatozoides comparado con el resto de cuartiles (DISSEX: 34,2% (Q1), 36,2% (Q2), 31,8% (Q3) vs. 16,5% (Q4),  $p=0,018$ ; AneuT: 33,3% (Q1), 27,0% (Q2), 39,1% (Q3) vs. 17,6% (Q4),  $p=0,022$ ).

**Figura R-7.** Relación de los resultados clínicos de los ciclos de FIV/ICSI convencional con los cuartiles de las diferentes anomalías observadas en el FISH de espermatozoides.



**Figura R-8.** Relación de los resultados clínicos de los ciclos de DGP con los cuartiles de las diferentes anomalías observadas en el FISH de espermatozoides.



#### 4.4. RESULTADOS CLÍNICOS EN VARONES INFÉRTILES CON AZOOSPERMIA

##### 4.4.1. ICSI en varones con azoospermia obstructiva y azoospermia secretora

Las 16 parejas en las que se realizó FISH en espermatozoides por AO se sometieron a un total de 21 ciclos de ICSI utilizando espermatozoides de testículo. Mientras que 16 de las 19 parejas con AS se realizaron un total de 42 ciclos de ICSI convencional.

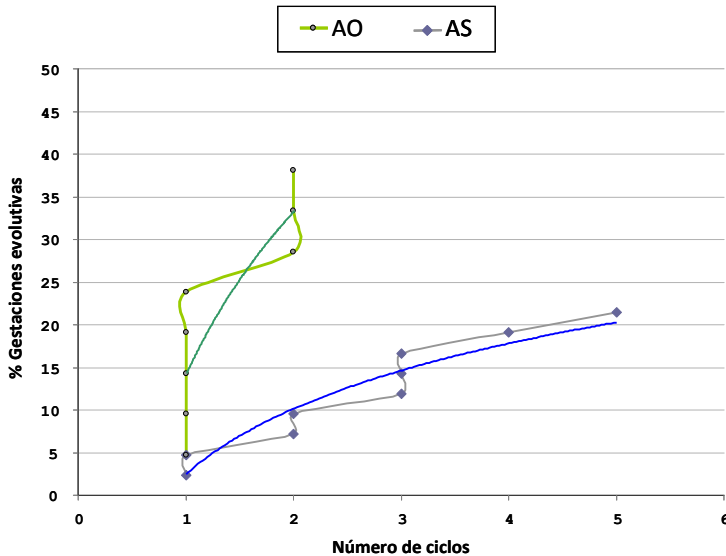
El grupo con AS presentó significativamente menor tasa de fecundación y peor calidad embrionaria - en términos de número de blastómeros y tasa de fragmentación en día 3 de desarrollo - que el grupo con AO (Tabla R-27). La tasa de gestación evolutiva por ciclo fue menor en el grupo con AS comparado con AO (21,4% vs. 38,1%).

**Tabla R-27.** Resultados clínicos de los ciclos de ICSI en pacientes con AO y AS.

	Azoospermia obstructiva (n= 16 pacientes)	Azoospermia secretora (n= 16 pacientes)
Edad media mujer ( $\pm$ DS)	33,9 (3,8)	31,7 (3,5)
Nº de ciclos de ICSI	21	42
Media de ciclos/paciente ( $\pm$ DS)	1,3 (0,5)	2,2 (2,2)
Tasa de fecundación	67,0	<b>55,5<sup>a</sup></b>
Media de blastómeros D3 ( $\pm$ DS)	6,4 (2,4)	<b>5,4 (2,4)<sup>b</sup></b>
Media de fragmentación D3 ( $\pm$ DS)	7,6 (9,4)	<b>17,8 (19,5)<sup>c</sup></b>
Nº de transferencias (%)	18 (85,7)	36 (85,7)
Media de embriones transferidos ( $\pm$ DS)	2,4 (1,5)	2,4 (1,4)
Tasa de implantación	25,5	20,8
Tasa de gestación evolutiva/ciclo (Nº)	<b>38,1 (8)</b>	<b>21,4 (9)</b>

Adicionalmente, mediante un análisis de supervivencia se compararon las tasas de gestación acumuladas de los pacientes con AO y AS, siendo mayor la de los pacientes con AO (log rank test:  $p < 0,001$ ) (Figura R-9). De esta forma, los pacientes con AS necesitaron una media de 2,7 ciclos de ICSI para conseguir una gestación evolutiva, mientras que los pacientes con AO precisaron de una media de 1,4 ciclos.

**Figura R-9.** Relación del número de ciclos de ICSI necesario para conseguir una gestación evolutiva en pacientes con AO y AS.



#### 4.4.2. FISH en espermatozoides e ICSI en varones con azoospermia secretora

En el grupo de pacientes con AS se evaluó la implicación de un incremento de espermatozoides con anomalías cromosómicas numéricas en los resultados clínicos tras ICSI. Este análisis se llevó a cabo separando a los pacientes en cuatro subgrupos en función de si presentaban un resultado de FISH normal o anormal en espermatozoides utilizando en el análisis como grupo control el control de eyaculado (CE) ó el control de testículo (CT) (Tabla R-28). Los dos subgrupos con un FISH normal en los espermatozoides mostraron tasas de implantación y de gestación evolutiva por ciclo similares, independientemente del grupo control utilizado. Sin embargo, los resultados clínicos que se observaron en los dos subgrupos con FISH anormal fueron más bajos que en los dos subgrupos con FISH normal. En particular, los peores resultados se observaron en el subgrupo de pacientes con AS y FISH anormal utilizando el CT, con una tasa de implantación de 9,1% y una tasa de gestación evolutiva de 11,1% frente a un

18,6% y un 18,5%, respectivamente, en pacientes con AS y FISH anormal utilizando el CE.

El 60% (3/5) de los pacientes con AS que presentó un resultado de FISH normal utilizando el CT consiguió una gestación evolutiva tras una media de 3,5 ciclos de ICSI. El 60% (3/5) de los pacientes con un resultado de FISH anormal utilizando el CE, pero con FISH normal utilizando el CT consiguió una gestación evolutiva tras una media de 4,5 ciclos de ICSI. Sin embargo, sólo el 16,7% (1/6) de los pacientes con un resultado de FISH anormal utilizando únicamente el CT consiguió una gestación evolutiva tras una media de 9 ciclos de ICSI.

**Tabla R-28.** Resultados clínicos de ICSI en pacientes con AS según el resultado de FISH en espermatozoides cuando se usa el CE o el CT como controles estadísticos.

	Usando CONTROL DE EYACULADO		Usando CONTROL DE TESTÍCULO	
	FISH anormal (n= 11 pacientes)	FISH normal (n= 5 pacientes)	FISH anormal (n= 6 pacientes)	FISH normal (n= 10 pacientes)
Edad media mujer (±DS)	31,2 (3,0)	32,8 (4,5)	30,4 (3,0)	32,6 (3,6)
Nº de ciclos de ICSI	27	15	9	33
Media de ciclos/paciente (±DS)	2,1 (2,3)	2,5 (1,9)	1,1 (1,0)	3,0 (2,5)
Tasa de fecundación	57,9	51,1	<b>68,2<sup>a</sup></b>	<b>51,4<sup>a</sup></b>
Media de blastómeras D3 (±DS)	5,5 (2,2)	5,3 (2,6)	5,6 (1,8)	5,4 (2,6)
Media de fragmentación D3 (±DS)	<b>12,5 (11,0)<sup>b</sup></b>	<b>23,4 (24,5)<sup>b</sup></b>	15,0 (12,2)	19,4 (22,5)
Nº de transferencias (%)	25 (92,6)	11 (73,3)	7 (77,8)	29 (87,9)
Media de embriones transferidos (±DS)	<b>2,6 (1,2)<sup>c</sup></b>	<b>2,1 (1,6)<sup>c</sup></b>	2,4 (1,7)	2,4 (1,3)
Tasa de implantación	18,6	25,8	<b>9,1</b>	<b>24,1</b>
Tasa de gestación evolutiva/ciclo	18,5	26,7	<b>11,1</b>	<b>24,2</b>

**Notas:** <sup>a,b,c</sup>p<0,01 comparado con otros valores con la misma letra. Test exacto de Fisher y test t-Welch



#### 4.5. RELACIÓN ENTRE LAS ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS ESPERMÁTICAS Y LAS ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EMBRIONARIAS

##### 4.5.1. Estudio de correlación entre la incidencia de alteraciones cromosómicas espermáticas y el porcentaje de embriones anormales

Para poder determinar si existía una correlación entre la incidencia de anomalías cromosómicas en los espermatozoides (DISSEX, DIPL, AneuT y AnT) y el porcentaje de embriones con anomalías cromosómicas (%EmbA), se realizó un estudio de correlación incluyendo los 1097 ciclos de DGP en el estudio (tabla R-29). El coeficiente de correlación de Pearson mostró ausencia de correlación entre la incidencia de alteraciones cromosómicas en espermatozoides y embriones.

**Tabla R-29.** Estudio de correlación de las alteraciones cromosómicas en espermatozoides con el porcentaje de embriones con anomalías cromosómicas en los 1097 ciclos de DGP.

		<b>% EmbA</b>
<b>% Dissex</b>	Correlación de Pearson	0,001
	Sig. (bilateral)	0,968
	N	1095
<b>% Dipl</b>	Correlación de Pearson	0,011
	Sig. (bilateral)	0,717
	N	1095
<b>% AneuT</b>	Correlación de Pearson	0,013
	Sig. (bilateral)	0,671
	N	1095
<b>% AnT</b>	Correlación de Pearson	0,014
	Sig. (bilateral)	0,632
	N	1095

**Nota:** la correlación es significativa al nivel 0,05 bilateral

Para descartar que la posible asociación estuviese enmascarada por otros factores relacionados con la producción de anomalías cromosómicas en embriones, como la edad de la mujer en el ciclo o la presencia de un historial clínico de abortos y fallos de implantación, seleccionamos para un nuevo análisis únicamente los 249 ciclos de DGP

por indicación de factor masculino (seminograma alterado según OMS 2010), cuyas parejas eran menores de 38 años en el momento de la realización del ciclo de DGP y no presentaban historial clínico de abortos de repetición ni fallos repetidos de implantación. En este grupo, el coeficiente de correlación de Pearson determinó una relación lineal del porcentaje total de espermatozoides aneuploides y del porcentaje total de espermatozoides anormales con el porcentaje de embriones con anomalías cromosómicas (Tabla R-30). Esta relación resultó ser positiva, observándose un incremento en el porcentaje de embriones anormales con el incremento en el porcentaje de espermatozoides aneuploides y de espermatozoides anormales en el eyaculado.

**Tabla R-30.** Estudio de correlación de las alteraciones cromosómicas en espermatozoides con el porcentaje de embriones con anomalías cromosómicas en los 249 ciclos de DGP por factor masculino.

		<b>% EmbA</b>
<b>% Dissex</b>	Correlación de Pearson	0,115
	Sig. (bilateral)	0,071
	N	248
<b>% Dipl</b>	Correlación de Pearson	0,113
	Sig. (bilateral)	0,077
	N	248
<b>% AneuT</b>	Correlación de Pearson	0,136
	Sig. (bilateral)	<b>0,032</b>
	N	248
<b>% AnT</b>	Correlación de Pearson	0,142
	Sig. (bilateral)	<b>0,025</b>
	N	248

**Nota:** la correlación es significativa al nivel 0,05 bilateral

#### 4.5.2. Evaluación del efecto de los diferentes tipos de anomalías cromosómicas en los espermatozoides sobre la constitución cromosómica en embriones preimplantatorios

Con el fin de poder evaluar el impacto de los diferentes patrones de anomalías cromosómicas en los espermatozoides sobre la constitución cromosómica de los embriones, seleccionamos únicamente a los 101 varones con factor masculino (seminograma alterado según OMS 2010) cuyas parejas eran menores de 38 años en el momento de la realización del ciclo de DGP, y que no presentaban historial clínico de abortos de repetición ni fallos repetidos de implantación. Estos varones fueron clasificados en tres grupos en función del patrón de anomalía cromosómica observada en el FISH de espermatozoides:

- **Disomía de cromosomas sexuales (DS):** formado por 68 varones infértiles cuyo resultado de FISH en espermatozoides mostró un incremento aislado de disomía para los cromosomas sexuales, comparado con un grupo control de 9 donantes normozoospermicos (grupo control utilizado históricamente en la clínica IVI Valencia para el estudio de FISH en espermatozoides). La edad media de los varones fue 35 años (rango 26-49 años), con una concentración media de  $8,3 \times 10^6$  espermatozoides/ml (rango  $0,001-58 \times 10^6$  espermatozoides/ml), una movilidad A+B media de 26,9% (rango 0-75%) y un porcentaje medio de espermatozoides con morfología normal de 2,3% (rango 0-15%).
- **Diploidía (DP):** formado por 21 varones infértiles cuyo resultado de FISH en espermatozoides mostró un incremento aislado de espermatozoides diploides comparado con el grupo control. La edad media de los varones fue 36 años (rango 31-47 años), con una concentración media de  $24,7 \times 10^6$  espermatozoides/ml (rango  $0,14-130 \times 10^6$  espermatozoides/ml), una movilidad A+B media de 29,7% (rango 1-80%) y un porcentaje medio de espermatozoides con morfología normal de 1,8 (rango 0-6%).

- **Disomía de cromosomas sexuales y diploides (DS+DP):** formado por 12 varones infértiles cuyo resultado de FISH en espermatozoides mostró un incremento tanto de espermatozoides diploides como con disomía para los cromosomas sexuales. La edad media de los varones fue 33 años (rango 29-38 años), con una concentración media de  $9,5 \times 10^6$  espermatozoides/ml (rango 0,1-48,6 espermatozoides/ml), una movilidad A+B media de 24,4% (rango 0-68%) y un porcentaje medio de espermatozoides con morfología normal de 3,8% (rango 0-18%).

La incidencia de anomalías cromosómicas en los tres grupos de estudio así como en el grupo control se resume en la tabla R-31. En el grupo DS, la incidencia de espermatozoides con disomía para los cromosomas sexuales fue casi tres veces superior a la observada en el grupo control (0,89% vs. 0,37%), principalmente debido a la presencia de espermatozoides 24,XY (0,71% vs. 0,11%). El grupo DP mostró un incremento de espermatozoides diploides tres veces superior al observado en el grupo control (0,71% vs. 0,25%). Finalmente, el grupo DS+DP mostró los valores más elevados de espermatozoides con disomía para los cromosomas sexuales (1,04% vs. 0,37%) y diploides (0,90% vs. 0,25%), siendo éstos casi 4 veces superiores a los observados en el grupo control de FISH de espermatozoides.

**Tabla R-31.** Resultados de FISH en espermatozoides en varones con incremento aislado de espermatozoides con disomía de cromosomas sexuales (DS), en varones con incremento aislado de espermatozoides diploides (DP), en varones con incremento de espermatozoides diploides y con disomía de cromosomas sexuales (DS+DP) y en el grupo control.

	<b>DS</b> (n=68 pacientes)	<b>DP</b> (n=21 pacientes)	<b>DS+DP</b> (n=12 pacientes)	<b>Control</b> (n=14 donantes)
<b>Nº espermatozoides evaluados 18/X/Y</b>				
Disomía 18 (%)	125.623 32 (0,03)	59.556 21 (0,04)	15.334 10 (0,07)	50.446 48 (0,10)
Total disomías cromosomas sexuales (%)	<b>1.123 (0,89) <sup>a</sup></b>	209 (0,35)	<b>159 (1,04) <sup>a</sup></b>	188 (0,37)
24,XX (%)	59 (0,05)	28 (0,05)	10 (0,07)	49 (0,10)
24,YY (%)	174 (0,14)	42 (0,07)	37 (0,24)	83 (0,16)
24,XY (%)	<b>890 (0,71) <sup>a</sup></b>	<b>139 (0,23) <sup>a</sup></b>	<b>112 (0,73) <sup>a</sup></b>	56 (0,11)
<b>Nº espermatozoides evaluados 13/21</b>				
Disomía 13 (%)	102.904 83 (0,08)	53.591 49 (0,09)	13.903 11 (0,08)	50.425 / 19.661 50 (0,10)
Disomía 21 (%)	198 (0,19)	78 (0,15)	18 (0,13)	76 (0,38)
<b>Total espermatozoides evaluados</b>	<b>228.527</b>	<b>113.147</b>	<b>29.237</b>	<b>70.107</b>
Diploidía (%)	298 (0,13)	<b>806 (0,71) <sup>a</sup></b>	<b>263 (0,90) <sup>a</sup></b>	178 (0,25)

**Notas:** <sup>a</sup> p<0,0001 vs. grupo control. Test Chi-cuadrado con corrección de Yates.

En un periodo de 10 años, de 1999 a 2009, las 101 parejas cuyos varones presentaron incremento de espermatozoides con estos tres patrones de alteraciones cromosómicas, se realizaron al menos un ciclo de DGP para screening de aneuploidías de 9 cromosomas mediante FISH, siendo el total realizado de 141 ciclos: 88 ciclos en el grupo DS, 33 ciclos en el grupo DP y 20 ciclos en el grupo DS+DP. La constitución cromosómica observada en los embriones procedentes de dichos ciclos de DGP se comparó con la observada en un grupo control, formado por embriones procedentes de 51 ciclos de DGP por enfermedad ligada al sexo, en 46 pacientes fértiles menores de 38 años y con cariotipo normal, cuyas parejas normozoospermas no se habían realizado un estudio de FISH en espermatozoides (Tabla R-32).

En los tres grupos de estudio se observó un incremento significativo de embriones cromosómicamente anormales (57,9% en el grupo DS, 62,9% en DP y 64,1% en DS+DP vs. 32,7% en el grupo control), así como de embriones mosaico (36,9% en DS, 33,3% en DP y 41,0% en DS+DP vs. 7,8% en el grupo control) respecto al observado en el grupo control. Se definió como embrión mosaico, a los embriones en los que se analizaron dos células y presentaron resultados discordantes.

Adicionalmente, se analizó el porcentaje de embriones con aneuploidías para cada uno de los cromosomas estudiados en el DGP, así como la incidencia de embriones triploides obtenidos tras el diagnóstico. El grupo de pacientes que presentaba un **incremento aislado de espermatozoides con disomía para los cromosomas sexuales** (grupo DS), no sólo mostró un incremento significativo de embriones con aneuploidías para los cromosomas sexuales (14,9% vs. 7,4%  $p<0,01$ ), sino también para los cromosomas 16 (15,1% vs. 7,9%  $p<0,01$ ), 21 (12,9% vs. 7,2%  $p<0,05$ ) y 22 (14,8% vs. 7,2%  $p<0,01$ ) respecto al observado en el grupo control. Este grupo mostró una incidencia similar de embriones triploides a la observada en el grupo control (1,1% vs. 0,6%). El grupo de pacientes con un **incremento aislado de espermatozoides diploides** (grupo DP) mostró un incremento significativo de embriones con aneuploidías sólo para

los cromosomas 16 (18,5% vs. 7,9%,  $p<0,01$ ) y 22 (21,2% vs. 7,2%,  $p<0,0001$ ) respecto al observado en el grupo control. De los tres grupos de estudio, éste fue el que mostró la mayor incidencia de embriones triploides, con un incremento significativo respecto del grupo control (3,3% vs. 0,6%  $p<0,05$ ). Finalmente, en el grupo de pacientes con un **incremento de espermatozoides tanto diploides como con disomía para los cromosomas sexuales** (grupo DS+DP), se observó un incremento significativo de embriones con aneuploidías para los cromosomas 13 (19,2% vs. 7,1%,  $p<0,01$ ), 21 (19,2% vs. 7,2%,  $p<0,01$ ) y 22 (16,1% vs. 7,2%,  $p<0,05$ ) respecto al observado en el grupo control. La incidencia de embriones con aneuploidías para los cromosomas sexuales fue elevada en este grupo, pero sin alcanzar significancia estadística con el grupo control (14,3% vs. 7,4%), y la incidencia de embriones triploides fue similar a la observada en el grupo control (1,9% vs. 0,6%).

**Tabla R-32.** Anomalías cromosómicas en embriones preimplantatorios, en función del patrón de alteración cromosómica observado en los espermatozoides.

	<b>Grupo DS</b> (n=68 pacientes)	<b>Grupo DP</b> (n=21 pacientes)	<b>Grupo DS+DP</b> (n=12 pacientes)	<b>Control</b> (n=46 pacientes)
<b>Nº ciclos DGP</b>	88	33	20	51
Embriones biopsiados	450	152	104	339
Embriones informativos (%)	447 (99,3)	151 (99,3)	103 (99,0)	336 (99,1)
Embriones normales (%)	<b>188 (42,1)<sup>a</sup></b>	<b>56 (37,1)<sup>a</sup></b>	<b>37 (35,9)<sup>a</sup></b>	226 (67,3)
Embriones anormales (%)	<b>259 (57,9)<sup>a</sup></b>	<b>95 (62,9)<sup>a</sup></b>	<b>66 (64,1)<sup>a</sup></b>	110 (32,7)
Embriones mosaico (%)	<b>64/173 (36,9)<sup>a</sup></b>	<b>27/81 (33,3)<sup>a</sup></b>	<b>16/39 (41,0)<sup>a</sup></b>	9/115 (7,8)
<b>Porcentaje de embriones con aneuploidías:</b>				
Cromosoma 13	11,1	8,3	<b>19,2<sup>b</sup></b>	7,1
Cromosoma 15	13,8	18,9	16,3	10,6
Cromosoma 16	<b>15,1<sup>b</sup></b>	<b>18,5<sup>b</sup></b>	14,3	7,9
Cromosoma 17	11,4	0	6,3	7,4
Cromosoma 18	12,6	11,6	7,6	8,7
Cromosoma 21	<b>12,9<sup>c</sup></b>	12,2	<b>19,2<sup>b</sup></b>	7,2
Cromosoma 22	<b>14,8<sup>b</sup></b>	<b>21,2<sup>a</sup></b>	<b>16,1<sup>c</sup></b>	7,2
Cromosomas X e Y	<b>14,9<sup>b</sup></b>	12,2	<b>14,3</b>	7,4
<b>Embriones triploides (%)</b>	<b>5 (1,1)</b>	<b>5 (3,3)<sup>c</sup></b>	<b>2 (1,9)</b>	<b>2 (0,6)</b>

**NOTAS:** <sup>a</sup>p<0,0001 <sup>b</sup>p<0,01 <sup>c</sup>p<0,05 vs. grupo control. Test Chi-cuadrado con corrección de Yates, test exacto de Fisher. El porcentaje de embriones mosaico se ha calculado como la proporción de embriones con dos células discordantes respecto los embriones con dos células analizadas.



#### **4.5.3. Análisis de la incidencia de embriones con anomalías cromosómicas potencialmente viables, en función del patrón de anomalía cromosómica observado en espermatozoides**

En análisis de las anomalías cromosómicas embrionarias observadas en estos 141 ciclos de DGP nos permitió determinar la incidencia de embriones portadores de cromosomopatías potencialmente viables (anomalías compatibles con la vida) en función del patrón de anomalía cromosómica observado en los espermatozoides (Tabla R-33). La incidencia de embriones portadores de aneuploidías autosómicas compatibles con la vida (trisomía 13 ó Síndrome de Patau; trisomía 18 ó Síndrome de Edwards; trisomía 21 ó Síndrome de Down) fue similar en los pacientes con incremento aislado de espermatozoides con disomía de cromosomas sexuales (grupo DS), en los pacientes con incremento aislado de espermatozoides diploides (grupo DP) y en los pacientes con incremento tanto de espermatozoides diploides como con disomía de cromosomas sexuales (grupo DS+DP) comparado con la observada en el grupo control (4,7%, 6,6%, 3,9% vs. 3,9%, respectivamente). La incidencia de aneuploidías compatibles con la vida para los cromosomas sexuales (monosomía X ó Síndrome de Turner; trisomía XXX; trisomía XXY ó Síndrome de Klinefelter; trisomía XYY) fue ligeramente más elevada en el grupo DS (3,6%) y en el grupo DP (3,3%), aunque no llegó a alcanzar significancia estadística con la observada en el grupo control (1,5%). Sin embargo, esta incidencia fue 4 veces superior a la observada en el grupo control en el grupo DS+DP (5,8% vs. 1,5%,  $p<0,05$ ). Así pues, la incidencia total de embriones portadores de cromosomopatías potencialmente viables fue mayor en los tres grupos de pacientes (grupo DS: 8,3%; grupo DP: 9,9%), siendo este incremento estadísticamente significativo en el grupo DS+DP comparado con el grupo control (11,7% vs. 5,7%,  $p<0,05$ ).

**Tabla R-35.** Incidencia de embriones portadores de cromosopatías potencialmente viables, en función del patrón de alteración cromosómica observado en los espermatozoides.

	<b>Grupo DS</b> (447 embriones)	<b>Grupo DP</b> (151 embriones)	<b>Grupo DS+DP</b> (103 embriones)	<b>Control</b> (336 embriones)
<b>Trisomía 13 (%)</b>	9 (2,0)	3 (1,9)	1 (0,9)	3 (0,9)
<b>Trisomía 18 (%)</b>	5 (1,1)	4 (2,6)	-	6 (1,8)
<b>Trisomía 21 (%)</b>	7 (1,6)	3 (1,9)	3 (2,9)	4 (1,2)
<b>Anomalías de cromosomas sexuales (%)</b>	16 (3,6)	5 (3,3)	<b>6 (5,8)<sup>a</sup></b>	5 (1,5)
Monosomía X	6	5	4	2
Trisomía XXX	4	-	1	-
Trisomía XXY	3	-	-	1
Trisomía XYY	3	-	1	2
<b>Anomalías compuestas (%)</b>	-	-	2 (1,9)	1 (0,3)
Mosaico trisomía 13/monosomía X	-	-	1	-
Mosaico trisomía 13/trisomía XXX	-	-	1	-
Trisomía 21 + trisomía XXX	-	-	-	1
<b>Total anomalías potencialmente viables (%)</b>	<b>37 (8,3)</b>	<b>15 (9,9)</b>	<b>12 (11,7)<sup>b</sup></b>	<b>19 (5,7)</b>

NOTAS: <sup>a</sup>, <sup>b</sup>p<0,05 vs. grupo control. Test exacto de Fisher.

## 5. DISCUSIÓN



La introducción de las técnicas de fecundación *in vitro* al campo de la medicina reproductiva ha incrementado las posibilidades de éxito en parejas con problemas de infertilidad en las que subyace un factor masculino severo. Se ha descrito que entre un 2-26% de los varones con cariotipo normal en sangre periférica presentan anomalías cromosómicas restringidas únicamente a la línea germinal (Egozcue et al., 1983; Vendrell et al., 1999; Egozcue et al., 2000b). Si los puntos de control o “checkpoints” de la meiosis no actúan eficazmente y alguna línea celular anómala escapa de su acción, se podrían producir espermatozoides con anomalías cromosómicas, incrementando así el riesgo de transmisión de estas anomalías a la descendencia. Esta tesis doctoral surgió con la idea de determinar los factores que podrían estar asociados con un incremento de anomalías cromosómicas en espermatozoides en varones con cariotipo normal, y evaluar cómo afecta este incremento al éxito reproductivo en parejas con problemas de infertilidad.

## **5.1. ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS EN LOS ESPERMATOZOIDES**

### **5.1.1. Incidencia basal en varones normozoospermicos**

- ***Grupo control utilizado para los diagnósticos clínicos en espermatozoides de eyaculado***

La sencillez con que la técnica de FISH permite analizar la presencia de anomalías cromosómicas numéricas en los espermatozoides hizo que, durante la década de los noventa, dejara de ser una técnica únicamente aplicada en investigación para pasar a utilizarse en medicina reproductiva como prueba diagnóstica del varón infértil. Si partimos de la premisa de que la presencia de anomalías cromosómicas en espermatozoides puede afectar a la fertilidad, hemos de suponer que los varones que son capaces de reproducirse sin problemas presentan una incidencia de espermatozoides anormales que consideraríamos como normal, basal y/o inocua.

Además, si no existen problemas durante la meiosis, ni en sus puntos de control, deberíamos pensar que estos valores basales se encuentran principalmente en varones con parámetros seminales normales, siendo estos los candidatos a formar un buen grupo control para el análisis de FISH en espermatozoides.

Para evaluar la incidencia de anomalías cromosómicas en espermatozoides de eyaculado de los 2008 varones infértiles con historial clínico de aborto de repetición, fallo repetido de implantación, causas mixtas o factor masculino severo aislado (con parámetros seminales alterados, y sin historial clínico de aborto de repetición o fallo repetido de implantación), utilizamos un grupo control histórico que es el que se utiliza en IVI-Valencia desde que se incorporó la técnica de FISH como prueba diagnóstica clínica en 1999 (grupo CC). Este CC está formado por 14 donantes normozoospermicos, siendo únicamente 5 de ellos de fertilidad probada. En este grupo, considerando un criterio conservador, observamos que la incidencia total de espermatozoides aneuploides para los cinco cromosomas analizados fue de 1,9% (0,95%x2), valor similar al 1,4% calculado a partir de la revisión realizada por Egozcue y colaboradores en 1997, quien estimó además que alcanzaría el 6% en varones normozoospermicos si consideráramos la frecuencia de aneuploidías para los 23 pares cromosómicos.

- ***Grupos control utilizados para las comparaciones en varones azoospermicos***

Hasta la fecha, este es el primer y único estudio en el que se ha analizado la incidencia basal de anomalías cromosómicas numéricas en espermatozoides de testículo de varones fértiles (grupo CT), extraídos mediante aspiración en la misma intervención quirúrgica a la que se sometieron los varones para ser vasectomizados. Por tanto, se trata de espermatozoides procedentes de un microambiente testicular normal. La mejor aproximación publicada en varones fértiles procede de estudios en espermatozoides de testículo recuperados tras varios años de vasectomía. Estos varones muestran porcentajes de aneuploidías ligeramente superiores a los nuestros

(0,46% vs. 0,34% disomía de cromosomas sexuales; 0,21% vs. 0,16% disomía 13; 0,10% vs. 0,04 disomía 18; y 0,40% vs. 0,25% disomía 21) (Ferguson et al., 2007). Estas diferencias podrían atribuirse al microambiente endocrino que, modificado como consecuencia de la obstrucción física generada tras la vasectomía, podría haber generado anomalías meióticas (Mroz et al., 1998) y por tanto, espermatozoides aneuploides.

La incidencia de espermatozoides anormales que observamos en este grupo CT fue del orden de 2 veces superior a la observada en nuestro grupo control de eyaculado (grupo CE) de varones fértiles normozoospermicos (AneuT: 0,79% vs. 0,43%; AnT: 1,06% vs. 0,53%, respectivamente). Se ha descrito que las células germinales con anomalías cromosómicas derivadas de meiosis alteradas (Eaker et al., 2001), son marcadas y eliminadas a nivel testicular por mecanismos de apoptosis durante la espermatogénesis. Aunque se cree que a nivel de eyaculado la apoptosis no actúa (Lachaud et al., 2004), sí que se ha observado en baja frecuencia la presencia de células germinales apoptóticas en el eyaculado de varones fértiles normozoospermicos (Collodel et al., 2008). Se han publicado diferentes estudios que relacionan la presencia de aneuploidías en espermatozoides con inmadurez (Morel et al., 1998; Kovanzi et al., 2001; Moretti et al., 2009; Ovari et al., 2010) y fragmentación de ADN (Muriel et al., 2007; Qiu et al., 2008; Tang et al., 2010). A su vez, la inmadurez espermática y la fragmentación del ADN se han relacionado positivamente con marcadores apoptóticos espermáticos (Mahfouz et al., 2009), lo que haría sospechar que algunas de estas células germinales apoptóticas presentes en el eyaculado podrían ser portadoras de anomalías cromosómicas. De hecho, se ha sugerido que estos espermatozoides apoptóticos del eyaculado podrían proceder de espermatocitos o espermátides apoptóticos, que escaparon al mecanismo de eliminación en el testículo y completaron el proceso de la meiosis y la espermiogénesis (Sakkas et al., 1999; Sakkas et al., 2002). Si esto es así, en los varones fértiles con parámetros seminales normales, la mayoría de los

espermatozoides apoptóticos portadores de anomalías cromosómicas debe encontrarse en el testículo a la espera de ser eliminados por los mecanismos de apoptosis, mientras que sólo un bajo número de ellos debe escapar a los mecanismos de eliminación testiculares, completar la meiosis y pasar al eyaculado. Esto explicaría que la frecuencia de espermatozoides aneuploides en el testículo sea más alta que en el eyaculado en el grupo control.

Además, el CE mostró una incidencia de espermatozoides aneuploides ligeramente inferior a la del CC (0,43% vs. 0,95%). Sin embargo, esta incidencia fue similar al 0,57% reportado por otros autores, cuyo grupo control al igual que nuestro CE, estaba formado por varones normozoospermicos de fertilidad probada (Pang et al., 2005). El hecho de observar mayor incidencia de espermatozoides aneuploides en nuestro CC podría ser debido a que, a pesar de presentar parámetros seminales normales, no todos tienen testada su fertilidad. Esto mismo les ocurre a los varones revisados en Egozcue y colaboradores (1997), lo que reforzaría nuestra idea de que son los varones normozoospermicos de fertilidad probada los que deben presentar los valores basales y presumiblemente más inocuos de espermatozoides aneuploides en el eyaculado.

### **5.1.2. Influencia de los parámetros seminales en el resultado del FISH en parejas infértiles**

Independientemente de la indicación por la que se solicitó el estudio de FISH, los varones con un resultado de FISH normal mostraron mejor calidad seminal en términos de concentración y movilidad espermática que los varones con un resultado de FISH anormal. Sin embargo, y coincidiendo con los resultados obtenidos por Sarrate y colaboradores (2010) en una serie de 319 varones infértiles, **la concentración espermática** resultó ser el único parámetro seminal asociado con el resultado del FISH. Así, hemos observado que el porcentaje de varones con un resultado de FISH anormal aumenta de forma gradual a medida que disminuye la concentración de



espermatozoides en el eyaculado, pasando de ser del ~10% en varones con concentración normal ( $\geq 15$  mill/ml), al ~17% en varones con oligozoospermia moderada (entre 1-14 mill/ml), al ~31% en varones con oligozoospermia severa ( $\leq 1$  mill/ml), y alcanzando el ~42% en varones con azoospermia secretora. Este porcentaje disminuye a 6,3% en varones con azoospermia obstructiva, cuya ausencia de espermatozoides en el eyaculado es debida a una obstrucción en el tracto reproductor masculino, y no a una meiosis alterada.

A pesar de todo, una gran proporción de varones con oligozoospermia (el 44,3% de los 2008 varones) no mostró incremento de anomalías cromosómicas numéricas en sus espermatozoides, lo que explicaría la ausencia de correlación lineal entre la incidencia de espermatozoides aneuploides y diploides y la concentración espermática en nuestra población. Sin embargo, la media de aneuploidías totales (suma de espermatozoides con disomía para los 5 cromosomas analizados) y de anomalías totales (suma de espermatozoides aneuploides totales y diploides) es más elevada en los varones con oligozoospermia severa, y disminuye de forma gradual a medida que aumenta la concentración espermática. Así, los estudios de meiosis clásicos realizados en varones con oligoastenoospermia han revelado una relación directa de las alteraciones en el apareamiento cromosómico durante la meiosis masculina con la disminución en la producción de espermatozoides (Vendrell et al., 1999; Egozcue et al., 2000b). Además, numerosos estudios han puesto de manifiesto la generación de espermatozoides aneuploides y diploides asociada a oligozoospermia (Mougou-Zerelli et al., 2011; Mokánszki et al., 2012; Durak Aras et al., 2012), siendo más patente en oligozoospermias severas con concentraciones inferiores a  $5 \times 10^5$  espermatozoides/ml (Rubio et al., 2001; Bernardini et al., 1998, 2000; Pang et al., 1999; Pfeffer et al., 1999; Vegetti et al., 2000; Ushijima et al., 2000; Nishikawa et al., 2000; Ohashi et al., 2001; Martin et al., 2003a; Nagvenkar et al., 2005).

No hemos observado relación de **la movilidad espermática** con el resultado del FISH en nuestra serie de varones infértiles. Otros trabajos confirman nuestros resultados (Rives et al. 1999; Sarrate et al., 2010; Mougou-Zerelli et al., 2011), observando incidencias similares de aneuploidías y diploidía en espermatozoides con buena movilidad y con movilidad reducida (Samura et al., 1997) ó inmóviles (Zeyneloglu et al., 2000). Sin embargo, otros autores sí que han descrito una correlación negativa de la movilidad espermática con el incremento de aneuploidías en espermatozoides (Vegetti et al., 2000), afectando principalmente a los cromosomas 13 y 21 (Hristova et al., 2002; Tempest et al., 2004). Estudiar la astenozoospermia como parámetro aislado resulta de gran dificultad, ya que suele estar asociado a oligozoospermia y/o teratozoospermia. Por ello, la mayoría de estos estudios están realizados en series de varones muy pequeñas, lo que confiere mayor peso a nuestros resultados.

Respecto a la morfología espermática, tampoco hemos observado relación entre **la teratozoospermia** y el resultado del FISH en espermatozoides. La bibliografía publicada al respecto muestra resultados controvertidos. Mientras unos autores describen resultados similares a los nuestros en varones infértiles (Rives et al., 1999; Vegetti et al., 2000; Sarrate et al., 2010), otros reportan mayor incidencia de aneuploidías en varones con teratozoospermia aislada que en varones normozoospermicos (Härkönen et al., 2001; Calogero et al., 2001; Mehdi et al., 2012). Así, Gole y colaboradores (2001) observaron una incidencia de espermatozoides con disomía de cromosomas sexuales 4 veces superior en varones teratozoospermicos que en varones normozoospermicos (0,36% vs. 0,09%, respectivamente). Intentando profundizar, Burrello y colaboradores (2004) encontraron una tasa de aneuploidías en espermatozoides con morfología anormal 4,4 veces superior a la de los espermatozoides con morfología normal en varones normozoospermicos. Estos resultados no fueron corroborados por Celik-Ozenci y colaboradores (2004), quienes observaron la misma incidencia de aneuploidías en espermatozoides de todos los tamaños y formas procedentes de varones infértiles.

Referente a alteraciones morfológicas específicas, no se ha observado incremento de espermatozoides anormales en varones con síndrome de flagelos cortos y acrosomas anormales (Viville et al., 2000). En varones con globozoospermia los resultados son controvertidos (Viville et al., 2000; Vicari et al., 2002; Carrell et al., 1999, 2004; Martin et al., 2003c; Morel et al., 2004; Ditzel et al., 2005; Perrin et al., 2013). Sin embargo, sí que existe un consenso relacionando alteraciones morfológicas muy severas - macrocefalia, múltiples cabezas y/o múltiples colas - con la presencia de anomalías cromosómicas severas en los espermatozoides, principalmente diploidía y poliploidía (In't Veld et al., 1997; Bernardini et al., 1998; Benzacken et al., 2001; Viville et al., 2000; Devillard et al., 2002; Lewis-Jones et al., 2003; Vicari et al., 2003; Mateu et al., 2006; Mougou-Zerelli et al., 2011; Brahem et al., 2012).

### **5.1.3. Influencia de otros factores en el resultado del FISH en espermatozoides de eyaculado**

Uno de los factores sobre los que existe más controversia es la influencia de **la edad del varón** en la presencia de anomalías cromosómicas numéricas en los espermatozoides. En nuestra serie de varones infértiles, la edad del varón no se ha relacionado con alteraciones cromosómicas en espermatozoides. Considerando varones con edades comprendidas entre 20 y 80 años, algunos trabajos han publicado resultados similares a los nuestros (Luetjens et al., 2002; Wyrobek et al., 2006), otros no han observado variación en la incidencia de aneuploidías para los cromosomas sexuales con la edad, pero sí incremento de espermatozoides diploides (Bosch et al., 2001; Brahem et al., 2011), mientras que otros han reportado incrementos con la edad tanto de espermatozoides con disomía para autosomas como el 4, 18 y 21, disomía XY y de espermatozoides diploides (Rives et al., 2002), como sólo de espermatozoides con disomía XY (Asada et al., 2000; Lowe et al., 2001), e incluso de anomalías cromosómicas estructurales (Templado et al., 2011).

Con respecto a **las diferentes indicaciones** por las que se solicitó un estudio de FISH en espermatozoides, ninguna de ellas presentó una probabilidad estadísticamente superior a las restantes de por sí sola asociarse a un resultado de FISH anormal. Sin embargo, observamos una tendencia hacia mayor porcentaje de varones con FISH anormal para la indicación de FM. Teniendo en cuenta que la concentración espermática es el único factor de los estudiados que está directamente relacionado con el resultado del FISH, la presencia mayoritaria de oligozoospermia en los varones con FM (el 76,8% de los varones) comparado con el 57,3% en varones con FI, el 39,5% de los varones con AR y tan sólo el 12,9% de los varones con MIX podría explicar estas diferencias.

Por otro lado, no hay que olvidar que un elevado porcentaje de varones normozoospermicos con FI (el 24,4%), AR (el 34,9%) y MIX (el 80,6%) presenta un resultado de FISH anormal, lo que muestra que en estas indicaciones el seminograma por sí mismo no es capaz de identificar una parte importante de varones con riesgo de anomalías numéricas en sus espermatozoides. Ya a finales de los años noventa se sugirió que la presencia de anomalías cromosómicas en los espermatozoides podía dar lugar a embriones anormales que culminarían en fallos de implantación (In't Veld et al., 1997; Pang et al., 1999). Desde entonces, numerosos estudios han reportado una elevada incidencia de espermatozoides diploides y con aneuploidías autosómicas y gonosómicas en parejas con historial clínico de fallo repetido de implantación, definido tanto como con  $\geq 3$  ciclos de FIV fallidos (Rubio et al., 2001; Petit et al., 2005) como con  $> 10$  embriones transferidos (Vialard et al., 2008). De igual modo, se ha descrito una elevada incidencia de anomalías meióticas (Egozcue et al., 2000a,b) y de espermatozoides aneuploides (Giorlandino et al., 1998; Carrell et al., 2003; Bernardini et al., 2004; Al-Hassan et al., 2005) y diploides (Rubio et al., 1999, 2001; Collodel et al., 2009) en varones con historial clínico de AR.

Mientras que el porcentaje de varones con FI con FISH anormal se mantiene constante independientemente del número de ciclos fallidos previos a la realización del FISH, el porcentaje de varones con AR con FISH anormal disminuye a medida que aumenta el número de abortos previos a la realización del FISH, siendo este porcentaje muy bajo (del 5,8%) con 5 abortos previos y nulo a partir de 6 abortos. Este mismo efecto fue descrito por nuestro grupo cuando analizamos la incidencia de anomalías cromosómicas embrionarias en parejas con AR de causa desconocida (Rubio et al., 2009). La incidencia de embriones cromosómicamente anormales, así como la tasa de implantación tras la transferencia de embriones normales, disminuyó en las parejas con 5 o más abortos previos. Estos datos sugieren que la elevada incidencia de espermatozoides aneuploides y diploides podría ser la causa de algunos casos de AR, siendo a partir de 5-6 abortos otras causas no cromosómicas las responsables de las pérdidas gestacionales.

El porcentaje más bajo de varones con un resultado de FISH anormal lo encontramos en el grupo con historial clínico de causas mixtas (MIX: cromosomopatía previa, tratamiento de quimioterapia/radioterapia, mala calidad embrionaria). Teniendo en cuenta que la mayoría de las trisomías autosómicas (como la trisomía 21) y parte de las gonosómicas (como la 47,XXX y el 50% de la 47,XXY) tienen su origen en errores en la meiosis materna, no es de extrañar que la incidencia de alteraciones cromosómicas en espermatozoides sea baja en estos casos. Sin embargo, la totalidad de las trisomías 47,XXY, el 74% de los 45,X y el 50% de los 47,XXY tiene un origen paterno (Thomas et al., 2000; Hall et al., 2006; Hassold et al., 2007). Es en los casos de gestaciones previas con cromosomopatías (Síndromes de Down, Klinefenter y Turner) y en los que se ha confirmado el origen paterno de la alteración, en los que se ha descrito un incremento de espermatozoides con aneuploidías para los cromosomas implicados en la cromosomopatía (Blanco et al., 1998; Martínez-Pasarell et al., 1999a,b; Lowe et al., 2001; Eskenazi et al., 2002; Tang et al., 2004). Tampoco ha de extrañarnos la baja

frecuencia de FISH anormal en varones con tratamientos de quimioterapia/radioterapia. Aunque se ha asociado la presencia de espermatozoides con aneuploidías tanto autosómicas como gonosómicas a determinados tipos de cáncer, como el linfoma Hodgkin (Fait et al., 2001; Tempest et al., 2008), la afectación de la meiosis masculina por los tratamientos de quimioterapia y radioterapia muestra resultados controvertidos. Mientras unos trabajos observan elevada incidencia de anomalías cromosómicas en espermatozoides (Martin et al., 1999; De Mas et al., 2001), otros reportan niveles normales tras meses/años post-tratamiento (Robbins et al., 1997; Martin et al., 1995, 1997; Frias et al., 2003; Thomas et al., 2004), dependiendo del tipo de cáncer, tipo de tratamiento y severidad del mismo (Tempest et al., 2008). Finalmente, aunque numerosos estudios han relacionado la presencia de aneuploidías y diploidía en espermatozoides con menores tasas de gestación y mayor tasa de aborto, sólo unos pocos la han relacionado directamente con la mala calidad embrionaria (Lazaros et al., 2011; Ghoraieian et al., 2013). Adicionalmente, otros factores espermáticos como la fragmentación del ADN, la reducción del tamaño de los telómeros, malformaciones del centrosoma, errores de imprinting, perfiles de ARNm alterados y anomalías en el empaquetamiento nuclear, se han relacionado con el desarrollo y la calidad embrionaria (revisado en Emery et al., 2006).

#### **5.1.4. Incidencia en espermatozoides de testículo de varones azoospermicos**

Los varones con azoospermia obstructiva (AO) han mostrado una incidencia total de espermatozoides anormales (0,86%) similar a la del CT, pero 1,6 veces superior a la del CE. Estos resultados están en concordancia los reportados a partir de estudios inmunocitogenéticos, que describen una disminución en la frecuencia de recombinación y un ligero incremento de espermatozoides aneuploides en muestras de testículo de varones infértiles con AO (Levron et al., 2001; Rodrigo et al., 2004; Gonsalves et al., 2004; Sun et al., 2005; Ferguson et al., 2007).

Sin embargo, un elevado porcentaje de varones con azoospermia secretora (AS) presenta un resultado de FISH anormal, siendo la incidencia total de espermatozoides anormales observada (2,89%) tres veces superior a la del CT y 5,5 veces superior a la del CE. Mientras que algunos estudios reportan incidencias extremadamente altas de espermatozoides anormales, de hasta el 93,6% (Bernardini et al., 2000), la mayoría reflejan frecuencias de espermatozoides aneuploides y diploides en varones con AS comparables a las nuestras (AnT: 19,6% en Levron et al., 2001; AneuT: 11,4% en Palermo et al., 2002; AnT: 6,9% en Rodrigo et al., 2004; AnT: 7,4% en Gianaroli et al., 2005a; AneuXY: 1,89% en Ma et al., 2006). A partir del primer trabajo en el que se observó una baja frecuencia de recombinación meiótica en espermatozoides 24,XY (Shi et al., 2001), numerosos estudios han relacionado bajas frecuencias de recombinación con el incremento en la incidencia de espermatozoides aneuploides en varones con AS (Martin et al., 2003b; Ma et al., 2006; Ferguson et al., 2007; Martin et al., 2006; Sun et al., 2008b).

## **5.2. IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LOS RESULTADOS DEL FISH EN ESPERMATOZOIDEOS**

A través de pruebas estadísticas sencillas podemos conocer si la incidencia de anomalías cromosómicas numéricas en una muestra de espermatozoides difiere de la observada en una población control. Sin embargo, el FISH de espermatozoides aplicado como herramienta diagnóstica en clínica ha de ir más allá, y ofrecer al clínico un valor pronóstico con el que poder evaluar las posibilidades reproductivas a la pareja infértil. Así, cuando diagnosticamos un resultado de FISH como anormal, éste debe ser evaluado en términos de: si afecta o no a los resultados clínicos [cómo], las diferentes consecuencias clínicas en función de las anomalías observadas [cuánto], así como posibles tratamientos que se puedan ofrecer para mejorar las posibilidades de éxito reproductivo [opciones reproductivas].

### 5.2.1. **Cómo** afecta el resultado de FISH anormal vs. FISH normal al éxito reproductivo tras FIV/ICSI

En los estudios realizados con *espermatozoides de eyaculado*, los resultados clínicos de los ciclos de FIV/ICSI convencional en mujeres jóvenes ( $\leq 37$  años) cuyos varones presentaron un resultado de FISH anormal, mostraron menor tasa de gestación clínica (18,4% vs. 37,5%) y de implantación (9,7% vs. 23,6%), mayor tasa de aborto clínico (62,5% vs. 34,9%), y menor tasa de ciclos con RNV (4,9% vs. 19,6%) que ciclos realizados en las parejas con FISH normal de espermatozoides. El análisis de regresión logística corregido por el efecto de la edad materna, muestra una asociación entre el resultado del FISH (normal/anormal), y los resultados del ciclo de FIV/ICSI convencional. De esta manera, los varones con un resultado de FISH normal en espermatozoides presentan 2,6 veces más posibilidades de obtener una gestación clínica, 4,5 veces más de tener una tasa de implantación  $\geq 50\%$ , 0,4 veces menos de que el ciclo termine en aborto, y 3,7 veces más de que el ciclo de lugar a un RNV, comparado con los varones con un resultado de FISH anormal. Uno de los puntos clave en esta tesis doctoral era determinar si el criterio matemático que estábamos utilizando para considerar un resultado de FISH como anormal - incremento significativo en la incidencia de anomalía para alguno de los cromosomas analizados comparado con la población control - tenía validez a nivel clínico. La asociación que observamos entre el resultado del FISH y los resultados clínicos nos constata la validez de este criterio.

Los primeros trabajos con incremento de espermatozoides aneuploides describieron tasas de embarazo evolutivo muy bajas (Bernardini et al., 2000) e incluso nulas (Pang et al., 1999; Pfeffer et al., 1999) tras FIV/ICSI convencional. Calogero y colaboradores (2001) reportan tasas de embarazo globales del 39% en 18 ciclos de ICSI, siendo la tasa de embarazo de 71,4% en el subgrupo sin incremento de aneuploidías en los espermatozoides, y con el 90% de los pacientes con incremento de espermatozoides aneuploides que no consiguieron gestación. Nuestro grupo publicó los resultados de



108 ciclos de ICSI de pacientes con un resultado de FISH normal comparados con 23 ciclos de ICSI de pacientes con un resultado de FISH en espermatozoides anormal, observando tasas similares de fecundación (71.5% vs. 74.5%), mayor tasa de embarazo (36.5 vs. 23.6) y menor tasa de aborto (54.8% vs. 80.0%) en el grupo de pacientes con FISH normal (Rubio et al., 2001). Burrello y colaboradores (2003), analizando los resultados clínicos en una serie de 48 pacientes sometidos a ICSI, observaron que los que tenían una incidencia de espermatozoides aneuploides superior a la normal (>1,55%) mostraban menor tasa de gestación (34% vs. 75%) e implantación (13% vs. 34%), y mayor tasa de aborto (38,9% vs. 11.1%) que los pacientes con valores normales de espermatozoides aneuploides, siendo la tasa de fecundación y la calidad embrionaria similar en ambos casos.

En nuestro estudio, los varones con **azoospermia secretora** (AS), mostraron menor tasa de fecundación (55,5% vs. 67,0%), peor calidad embrionaria, y menor tasa de gestación evolutiva (21,4% vs. 38,1%) que los varones con **azoospermia obstructiva** (AO) en los ciclos de FIV/ICSI. Además, necesitaron un mayor número de ciclos de ICSI para conseguir una gestación evolutiva que los varones con AO (media: 2,7 vs. 1,4 respectivamente). La elevada tasa de espermatozoides con anomalías cromosómicas en el grupo de varones con AS podría justificar esta diferencia. De hecho, los varones con AS y FISH normal mostraron mejores tasas de implantación (24,1% vs. 9,1%) y de gestación evolutiva (24,2% vs. 11,1%) que los varones con AS y FISH anormal, siendo éstas comparables a las de los varones con AO (tasa de implantación: 25,5%; tasa de gestación: 38,1%). Mientras que unos autores no reportan ninguna gestación clínica en un total de 7 ciclos de ICSI realizados en 3 varones con AS con una incidencia total de espermatozoides anormales del 93,67% (Bernardini et al., 2000), otros describen una única gestación que terminó en aborto, en 38 ciclos ICSI realizados en varones con AS que presentaban una incidencia total de espermatozoides anormales del 7,4% (Gianaroli et al., 2005a).

Los varones con AS que mostraron un resultado de FISH anormal al compararlo tanto con el grupo control de testículo (CT) como con el de eyaculado (CE) presentaron menor tasa de gestación e implantación que los que tuvieron un resultado de FISH normal. Además, los que presentaron un FISH anormal únicamente con el CT mostraron los peores resultados clínicos tras ICSI. La incidencia basal de espermatozoides anormales en el testículo es superior a la del eyaculado, por lo que resulta más apropiado el uso del CT para los varones azoospermicos e identifica con más rigor a los varones con peor pronóstico reproductivo. Por ello, es muy importante disponer de un buen grupo control de eyaculado y otro de testículo para valorar la repercusión clínica de un resultado de FISH anormal en función de si el estudio del paciente se ha realizado en muestra de eyaculado o de testículo.

### **5.2.2. Cuánto influye el nivel de anomalías observadas en espermatozoides**

En nuestro estudio, hemos observado una asociación de la tasa total de espermatozoides anormales (AnT: aneuploides + diploides) con el aborto y la obtención de RNV. De esta manera, la probabilidad de abortar se incrementa en 3,6 veces, y la de que el ciclo termine con un RNV disminuye en 0,4 veces por cada 1% de incremento de AnT. Sin embargo, se da la paradoja de que la probabilidad de abortar disminuye en 0,28 veces por cada 1% de incremento en la tasa total de espermatozoides aneuploides (con disomía 13, 18, 21, X e Y), es decir sin incluir los espermatozoides diploides. Este resultado podría justificarse si consideramos que el incremento de espermatozoides aneuploides genera principalmente embriones aneuploides que, o no implantan, o si lo hacen pueden dar lugar a gestaciones evolutivas (Síndromes de Patau, Edwards, Down, Klinefelter, Turner, XXX y XYY). Sin embargo, el incremento de espermatozoides diploides genera además embriones triploides capaces de implantar, pero que terminan mayoritariamente en aborto (Rodrigo et al., 2010).

Sin embargo, Nicopoullos y colaboradores (2008) utilizando la tasa total de espermatozoides aneuploides (AneuT) para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y como parámetro de asociación con la gestación clínica, sí encontraron un porcentaje de AneuT significativamente inferior en los pacientes que no consiguieron gestación frente a los que si la consiguieron (1,18% vs. 2,37%), y la probabilidad de conseguir una gestación clínica disminuía en 2,6 veces por cada 1% de incremento en la AneuT. Estas diferencias con nuestro estudio, en cuanto a la asociación negativa de AneuT y gestación, se podrían atribuir a varios factores, entre los que cabría destacar las diferentes indicaciones por las que se realiza el estudio de FISH de espermatozoides. En nuestro estudio, se incluye la indicación de aborto de repetición, por lo que el parámetro que nos da más información sobre el impacto de FISH de espermatozoides sería la tasa de aborto y la tasa de RNV y no tanto la gestación clínica. Otro factor que podría explicar las diferencias observadas en cuanto a la repercusión de AneuT en la gestación clínica, sería la diferencia del tamaño muestral del estudio de Nicopoullos (sólo 28 pacientes en cada grupo) con el nuestro. Con respecto a la tasa de aneuploidías gonosómicas por sí sola, no se asoció con la gestación en el estudio de Nicopoullos, al igual que en nuestro estudio.

En otro estudio, Petit y colaboradores (2005) describieron tasas de aneuploidías y diploidía mayores en espermatozoides de varones que no consiguen gestación tras  $\geq 4$  ciclos de ICSI, comparado con las de varones que consiguen gestación tras 1-3 ciclos de ICSI.

### **5.2.3. Opciones reproductivas en varones con FISH anormal**

Como hemos visto, cuando se identifica un FISH anormal en una pareja infértil se asocia con una disminución de las posibilidades de éxito reproductivo tras un tratamiento de FIV/ICSI convencional. Algunos grupos han propuesto el DGP como una alternativa para mejorar las posibilidades reproductivas en el factor masculino (Silber et al., 2003;

Gianaroli et al., 2005; Rubio et al., 2005). En nuestros ciclos de DGP realizados en mujeres de edad  $\leq 37$  años, cuando la muestra de espermatozoides presentaba un resultado de FISH normal, se observaron resultados similares a los de los ciclos de FIV/ICSI convencional. Sin embargo, cuando el resultado del FISH era anormal, el DGP ofrecía mayor tasa de gestación clínica (45,6% vs. 18,4%) e implantación (37,3% vs. 9,7%), menor tasa de aborto (17,2% vs. 60,5%) y mayor tasa de ciclos con RNV (29,3 vs. 5,4%) que el FIV/ICSI convencional, incluso transfiriendo un menor número de embriones ( $1,6 \pm 0,6$  vs.  $2,3 \pm 0,9$ ).

En los ciclos de DGP, el porcentaje de embriones con anomalías cromosómicas en los pacientes con un resultado de FISH anormal fue de 61,6%. Este porcentaje fue del 57,9% en los que presentaban sólo incremento de espermatozoides con disomías sexuales, del 62,9% en los pacientes con incremento únicamente de espermatozoides diploides y alcanzó el valor mayor, de 64,1%, en los pacientes que presentaban los dos tipos de anomalías conjuntamente, aneuploidías gonosómicas y diploidías. En todos estos casos con FISH de espermatozoides anormal se observó una incidencia muy elevada de embriones mosaico (30%-40%). Estos resultados están en concordancia con los observados en otros estudios, en los que se describen tasas de embriones anormales comprendidas entre un 43%-78% en pacientes con oligozoospermia y azoospermia, con FISH anormal en espermatozoides ó con meiosis alteradas (Silber et al., 2003; Arán et al., 2004; Platteau et al., 2004; Gianaroli et al., 2005b; Rubio et al., 2005; Sánchez-Castro et al., 2009; Magli et al., 2009; Rodrigo et al., 2010). En las parejas con FISH normal de espermatozoides el porcentaje de embriones anormales fue de 67,1%. Este elevado porcentaje se puede asociar a factores ovocitarios y a otros factores paternos como los derivados del centrosoma que pueden afectar a la segregación de los cromosomas durante las diferentes divisiones embrionarias (Fragouli et al., 2006; Chatzimeletiou et al., 2008).

Adicionalmente, hemos observado una correlación positiva de la incidencia de embriones anormales con la incidencia de aneuploidías totales y de anomalías totales observada en la muestra de espermatozoides. En varones infértiles con cariotipo normal, diversos estudios han reportado un incremento en el porcentaje de embriones anormales, proporcional a la severidad del factor masculino (Gianaroli et al., 2000), afectando principalmente a los cromosomas sexuales (Magli et al., 2009). Aunque Gianaroli y colaboradores (2005b) sospecharon de una correlación entre la incidencia de embriones anormales y la de espermatozoides anormales, no controlaron la posible contribución de la edad de la mujer. Por tanto, desde nuestro conocimiento, esta es la primera serie en la que se describe la correlación entre la incidencia de ambos parámetros en pacientes con factor masculino puro.

Cuando hacemos DGP, al contrario de lo que ocurre si el tratamiento de elección es un FIV/ICSI convencional, el análisis de regresión logística revela que los varones con un FISH anormal en espermatozoides tienen la misma posibilidad de gestar, de tener una tasa de implantación  $\geq 50\%$ , o de abortar que los varones con un FISH normal. Sin embargo, la probabilidad de que el ciclo finalice en RNV es 0,5 veces inferior si el FISH es normal. Una posible explicación para estos resultados sería que en las parejas con un FISH anormal, el problema reproductivo se identifica y está claramente relacionado con la generación de embriones anormales, por lo que el problema se soluciona con el análisis cromosómico embrionario. Sin embargo, en los ciclos de DGP con FISH de espermatozoides normal, el origen del fracaso reproductivo en algunas parejas podría ser diferente. Se ha descrito que otros factores relacionados con la receptividad endometrial, como el grosor endometrial insuficiente, alteración de la expresión de moléculas de adhesión, y factores inmunológicos pueden estar implicados los fallos de implantación y las pérdidas gestacionales (Margalioth et al., 2006).

Por otro lado, hemos observado una correlación positiva de la tasa de implantación tras DGP con el incremento en la incidencia de disomías gonosómicas y de aneuploidías

totales (AneuT) en los espermatozoides. De hecho, el análisis de regresión logística muestra que la posibilidad de obtener gestación e implantación  $\geq 50\%$  tras DGP incrementa en 1,4 veces por cada 1% de incremento de AneuT en los espermatozoides.

Sin embargo, el pronóstico no parece ser tan bueno cuando lo que tenemos es un incremento de espermatozoides diploides, ya que el análisis de regresión logística muestra que la posibilidad de obtener gestación e implantación  $\geq 50\%$  tras DGP disminuye en 0,6 veces por cada 1% de incremento de espermatozoides diploides. Una posible explicación para la ausencia de beneficio con DGP cuando se analizan 9 cromosomas, sería la posibilidad de que los espermatozoides diploides generaran además otro tipo de anomalías en los embriones que no podríamos detectar por la técnica de FISH, como las anomalías parciales, o anomalías numéricas para cromosomas no analizados en el FISH. En este grupo de pacientes las nuevas tecnologías emergentes, como los arrays de CGH para el análisis de 24 cromosomas, permitirían seleccionar embriones presumiblemente con mayor potencial reproductivo (Rubio et al., 2013), lo que podría cambiar estos resultados.

Con todo esto, valorando la incidencia de espermatozoides anormales observada con el FISH, no es de extrañar que los varones que presentan las mayores tasas de espermatozoides anormales (superiores a 0,73%) sean los que hayan conseguido mejores resultados reproductivos tras DGP, con mayor número de ciclos con gestación (el 42%), mayor número de ciclos con tasa de implantación  $\geq 50\%$  (el 41%), menor número de ciclos finalizados en aborto (el 20,2%) y por tanto con mayor porcentaje de ciclos con RNV (el 24,3%). Y que por otro lado, cuando en este mismo grupo de pacientes, con anomalías en espermatozoides superiores al 0,73%, se realizaban ciclos de FIV/ICSI convencional, de forma significativa se obtenía un menor porcentaje de ciclos con una tasa de implantación  $\geq 50\%$  (el 25,2%). Para las otras variables analizadas, porcentaje de ciclos con gestación, con aborto y con RNV, no se encontraron diferencias

significativas, pero sí se observó una tendencia hacia peores resultados a medida que se incrementa el porcentaje de espermatozoides anormales.

#### **5.2.4. Riesgo genético de los diferentes tipos de anomalías observadas en espermatozoides**

Es importante mencionar además, que el riesgo genético que presentan los varones con FISH anormal por incremento de espermatozoides con disomías sexuales no es el mismo que el de los varones con un incremento de espermatozoides diploides. Recientemente, publicamos una serie de 73 ciclos de DGP en pacientes con FISH anormal de espermatozoides, en la que observamos que los pacientes que presentaban un **incremento aislado de espermatozoides con disomías sexuales** generaban principalmente embriones aneuploides tanto de autosomas como de cromosomas sexuales, potencialmente viables. Sin embargo, los varones con **incremento aislado de espermatozoides diploides** generaban mayor proporción de embriones triploides y con aneuploidías para los cromosomas 16 y 22, más relacionados con abortos (Rodrigo et al., 2010). En esta tesis hemos incrementado la serie a 131 ciclos de DGP, confirmando los mismos resultados, y hemos añadido un tercer grupo de varones con **incremento tanto de espermatozoides diploides como con disomías sexuales**. En este grupo hemos observado un comportamiento intermedio, generando embriones aneuploides para prácticamente todos los cromosomas analizados incluidos los sexuales, y una cantidad de embriones triploides intermedia a la que generan los grupos de disomía sexual y diploidía aislada. Sin embargo, de los tres grupos es el que mayor riesgo presenta de dar lugar a embriones aneuploides potencialmente viables, con anomalías principalmente de cromosomas sexuales, siendo este riesgo 2 veces superior al que presenta la población fértil.

Aunque la mayoría de las anomalías embrionarias terminan en fallos de gestación o abortos espontáneos, se han reportado casos de gestaciones anormales evolutivas, en

las que se ha relacionado el origen de la cromosomopatía con el incremento de espermatozoides aneuploides en el padre. Así, en un trabajo realizado en dos padres de niños con síndrome de Down en los que se había determinado el origen paterno del cromosoma 21 extra, se reportaron tasas de espermatozoides con disomía 21 de 0,75% y 0,78% (Blanco et al., 1998). Estudios similares en parejas con abortos o niños con anomalías para los cromosomas sexuales (síndrome de Turner o síndrome de Klinefelter) han descrito elevadas incidencias de espermatozoides con aneuploidías para los cromosomas sexuales, comprendidas entre 0,20% y 24,7% (Moosani et al., 1999; Martínez-Pasarell et al., 1999a,b; Lowe et al., 2001; Eskenazi et al., 2002; Tang et al., 2004). En esta tesis, en el grupo de varones en los que el FISH fue anormal por un incremento de disomías sexuales y ningún otro tipo de anomalía, la incidencia de espermatozoides con disomías sexuales fue de 0,89%. En los pacientes en los que el FISH fue anormal por incremento tanto de espermatozoides con disomías sexuales como diploides, este porcentaje subió al 1,04%. A pesar de parecer porcentajes bajos, el hecho es que, como acabamos de ver, generan 2 y 4 veces más respectivamente de embriones potencialmente viables con anomalías para los cromosomas sexuales que la población fértil. Para poder entender el impacto clínico de estas tasas tan bajas de espermatozoides aneuploides en los varones oligozoospermicos y azoospermicos, hemos de tener en cuenta que sólo estamos evaluando un panel de cromosomas muy reducido. De esta manera, la tasa total de aneuploidías en varones oligozoospermicos considerando los 24 cromosomas se ha estimado entre el 33%-74%, comparada con el 4,1%-7,7% reportado en donantes de fertilidad probada, y la tasa de espermatozoides diploides se ha estimado entre el 0,4%-9,6% comparado con el 0,04% en donantes fértiles (Pang et al., 1999).

Así pues, los resultados del análisis del FISH en espermatozoides permiten valorar el riesgo de transmitir anomalías cromosómicas a los embriones obtenidos tras un FIV/ICSI. Como hemos visto, la presencia de una incidencia elevada de anomalías



cromosómicas en los espermatozoides afecta negativamente al éxito reproductivo de la pareja. Sin embargo, la selección de embriones cromosómicamente normales nos permite mejorar sus resultados reproductivos. Los resultados de DGP presentados en esta tesis corresponden al estudio de aneuploidías de 9 cromosomas. En la actualidad, nuevas tecnologías como los arrays de CGH para el análisis de 24 cromosomas, permitirían una mejor selección de los embriones, presumiblemente resultando en mayor potencial reproductivo (Rubio et al., 2013).



## 6. CONCLUSIONES



1. La incidencia de espermatozoides anormales observada en el grupo control de testículo fue del orden de 2 veces superior a la observada en nuestro grupo control de eyaculado de varones fértiles normozoospermicos. Este hallazgo justifica el uso del control de testículo para identificar con más rigor los varones azoospermicos con peor pronóstico reproductivo.
2. El 14,6% de las muestras procedentes de eyaculado de varones infértiles mostró un resultado de FISH anormal en espermatozoides comparado con el grupo control de clínica. En azoospermias secretoras este porcentaje subió al 42,1% cuando se comparó con el control de testículo y fue sólo del 6,3% en varones con azoospermia obstructiva.
3. La concentración espermática resultó ser el único parámetro seminal asociado con el resultado del FISH. El porcentaje de varones con un resultado de FISH anormal aumentó de forma gradual a medida que disminuyó la concentración de espermatozoides en el eyaculado.
4. Ninguna de las indicaciones por las que se solicitó el estudio de FISH en espermatozoides presentó una probabilidad superior a las restantes de por sí sola asociarse a un resultado de FISH anormal.
5. La presencia de una incidencia elevada de anomalías cromosómicas en los espermatozoides afectó negativamente al éxito reproductivo de la pareja tras ciclos de FIV/ICSI convencional. La selección de embriones cromosómicamente normales mediante DGP permitió mejorar los resultados reproductivos en parejas con FISH anormal en espermatozoides.



## 7. BIBLIOGRAFÍA





**A**

- Al-Asmar N, Peinado V, Vera M, *et al.* Chromosomal abnormalities in embryos from couples with a previous aneuploid miscarriage. *Fertil Steril* 2012; 98:145-150.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, *et al.* 1994. *Biología Molecular de La Célula* (2ª ed.). Barcelona: Ediciones Omega, S.A, pp. 895-936.
- Al-Hassan S, Hellani A, Al-Shahrani A, *et al.* Sperm chromosomal abnormalities in patients with unexplained recurrent abortions. *Arch Androl* 2005; 51:69-76.
- Antón E, Blanco J, Egozcue J, *et al.* Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod* 2004; 19:1345-1351.
- Antón E, Blanco J, Egozcue J, *et al.* Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111:297-304.
- Antón E, Vidal F, Blanco J. Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod* 2007; 22:2088-2092.
- Antón E, Vidal F, Blanco J. Interchromosomal effect analyses by sperm FISH: incidence and distribution among reorganization carriers. *Syst Biol Reprod Med* 2011; 57:268-278.
- Arán B, Blanco J, Vidal F, *et al.* Screening for abnormalities of chromosomes X,Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril* 1999; 72:696-701.
- Arán B, Veiga A, Vidal F, *et al.* Preimplantation genetic diagnosis in patients with male meiotic abnormalities. *Reprod Biomed Online* 2004; 8:470-476.
- Asada H, Sueoka K, Hashiba T, *et al.* The effects of age and abnormal sperm count on the nondisjunction of spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17:51-59.

**B**

- Baccetti B, Strehler E, Capitani S, *et al.* The effect of follicle stimulating hormone therapy on human sperm structure (Notulae sminologicae 11). *Hum Reprod* 1997; 12:1955-1968.
- Barlow P, Vosa CG. The Y chromosome in human spermatozoa. *Nature* 1970; 226:961-962.
- Bellver J, Ayllón Y, Ferrando M, *et al.* Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertil Steril* 2010; 93:447-54.
- Benzacken B, Gavelle FM, Martin-Pont B, *et al.* Familial sperm polyploidy induced by genetic spermatogenesis failure: case report. *Hum Reprod* 2001; 16:2646-2651.
- Bernardini L, Borini A, Preti S, *et al.* Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. *Hum Reprod* 1998; 13:3406-3413.
- Bernardini LM, Costa M, Bottazzi C, *et al.* Sperm aneuploidy and recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2004;9:312-320.
- Bernardini L, Gianaroli L, Fortini D, *et al.* Frequency of hyper-, hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients. *Hum Reprod* 2000; 15:2165-2172.

- Bernicot I, Dechanet C, Mace A, *et al.* Predictive value of sperm-FISH analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis (PGD) for a pericentric inversion inv5(p15.3q11.2) carrier. *Hum Reprod* 2010; 25:1818-1823.
- Bielanska M, Tan SL, Ao A. Fluorescence in-situ hybridization of sex chromosomes in spermatozoa and spare preimplantation embryos of Klinefelter 46,XY/47,XXY male. *Hum Reprod* 2000; 15:440-444.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47,XXY, mosaic 46,XY/47,XXY and 47,XXY) assessed by fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2001; 16:887-892.
- Blanco J, Gabau E, Gómez D, *et al.* 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* 1998; 63:1067-72.
- Blanco J, Rubio C, Simón C, *et al.* Increased incidence of disomic sperm in a 47,XXY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Hum Genet* 1997; 99:413-416.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1996; 11:722-726.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 2000; 106: 500-05.
- Bonduelle M, Aytoz A, Van Assche E, *et al.* Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13:781-782.
- Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, *et al.* Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 2002; 17:2600-14.
- Bosch M, Rajmil O, Martínez-Pasarell O, *et al.* Linear increase of diploidy in human sperm with age: a four-colour FISH study. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:533-538.
- Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, *et al.* Study of aneuploidy rate and sperm DNA fragmentation in large-headed, multiple-tailed spermatozoa. *Andrologia* 2012; 44:130-135.
- Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, *et al.* The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28:425-432.
- Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definición y causas de la infertilidad. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2003; 54:227-248.
- Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Turner JM. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat Rev Genet* 2009; 10:207-216.
- Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, *et al.* Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum Reprod* 2004; 19:2298-2302.
- Burrello N, Calogero AE, De Palma A, *et al.* Chromosome analysis of epididymal and testicular spermatozoa in patients with azoospermia. *Eur J Hum Genet* 2002; 10:362-366.

Burrello N, Vicari E, Shin P, *et al.* Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes. *Hum Reprod* 2003; 18:1371-1376.

## C

Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, *et al.* High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. *Hum Reprod* 2001; 16:1433-1439.

Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, *et al.* Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2003; 101:1229-1235.

Carrell DT, Emery BR, Liu L. Characterization of aneuploidy rates, protamine levels, ultrastructure, and functional ability of round-headed sperm from two siblings and implications for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999; 71:511-516.

Carrell DT, Emery BR, Wilcox AL, *et al.* Sperm chromosome aneuploidy as related to male factor infertility and some ultrastructure defects. *Arch Androl* 2004; 50:181-185.

Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, *et al.* Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod* 2004; 19:2052-2059.

Chatzimeletiou K, Morrison EE, Prapas N, *et al.* The centrosome and early embryogenesis: clinical insights. *Reprod Biomed Online* 2008; 16:485-491. Review.

Cohen J, Wells D, Munné S. Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil Steril* 2007; 87:496-503.

Collodel G, Giannerini V, Pascarelli A, *et al.* TEM and FISH studies in sperm from men of couples with recurrent pregnancy loss. *Andrologia* 2009; 41:352-360.

Collodel G, Moretti E. Morphology and meiotic segregation in spermatozoa from men of proven fertility. *J Androl* 2008; 29:106-114.

Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, *et al.* World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010; 16:231-45.

Corrales, JJ. 2001. Testículo e infertilidad masculina. En: Miralles J.M; De Leiva, A. (eds.) *Enfermedades del sistema endocrino y de la nutrición*. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca, pp. 197-219. ISBN: 84-7800-113-1.

## D

De Mas P, Daudin M, Vincent MC, *et al.* Increased aneuploidy in spermatozoa from testicular tumour patients after chemotherapy with cisplatin, etoposide and bleomycin. *Hum Reprod* 2001; 16:1204-1208.

Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R, *et al.* Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum Reprod* 2002; 17:1292-1298.

Ditzel N, El-Danasouri I, Just W, *et al.* Higher aneuploidy rates of chromosomes 13, 16, and 21 in a patient with globozoospermia. *Fertil Steril* 2005; 84:217-218.

- Dohle GR, Diemer T, Giwercman A, et al. Guidelines on Male Infertility. *European Association of Urology*, 2010.
- Durak Aras B, Aras I, Can C, et al. Exploring the relationship between the severity of oligozoospermia and the frequencies of sperm chromosome aneuploidies. *Andrologia* 2012; 44:416-422.
- Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:585-598.

## E

- Eaker S, Pyle A, Cobb J, et al. Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci* 2001; 114:2953-2965.
- Egozcue J, Blanco J, Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 1997; 3:441-452. Review.
- Egozcue J, Templado C, Vidal F, et al. Meiotic Studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum Genet* 1983; 65:185-188.
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, et al. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000a; 6:93-105.
- Egozcue J, Sarrate Z, Codina-Pascual M, et al. Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111:337-342.
- Egozcue S, Vendrell JM, García F, et al. Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 2000b; 17:307-309.
- Emery BR, Carrell DT. The effect of epigenetic sperm abnormalities on early embryogenesis. *Asian J Androl* 2006; 8:131-142. Review.
- Escudero T, Lee M, Carrel D, et al. Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13 ;14)(q10 ;q10) carriers. *Prenat Diagn* 2000; 20:599-602.
- Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M, et al. Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertil Steril* 2003; 79:1528-1534.
- Eskenazi B, Wyrobek AJ, Kidd SA, et al. Sperm aneuploidy in fathers of children with paternally and maternally inherited Klinefelter syndrome. *Hum Reprod* 2002; 17:576-583.

## F

- Fait G, Yogev L, Botchan A, et al. Sex chromosome aneuploidy in sperm cells obtained from Hodgkin's lymphoma patients before therapy. *Fertil Steril* 2001; 75:828-829.
- Ferguson KA, Chan Wong E, Chow V, et al. Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum Mol Genet* 2007; 16:2870-2879.

- Ferlin A, Raicu F, Gatta V, *et al.* Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online* 2007; 14:734-745.
- Fragouli E, Wells D, Thornhill A, *et al.* Comparative genomic hybridization análisis of human oocytes and polar bodies. *Hum Reprod* 2006; 21:2319-2328.
- Frias S, Van Hummelen P, Meistrich ML, *et al.* NOVP Chemotherapy for Hodgkin's disease transiently induces sperm aneuploidies associated with the major clinical aneuploidy syndromes involving chromosomes X, Y, 18, and 21. *Cancer Res* 2003; 63:44-51.

## G

- García-Quevedo L, Blanco J, Serrate Z, *et al.* Hidden mosaicism in patients with Klinefelter's syndrome: implications for genetic reproductive counselling. *Hum Reprod* 2011; 26:3486-3493.
- Ghoreaian P, Mozdarani H, Aleyasin A, *et al.* Frequency of sex chromosomal disomy in spermatozoa of normal and oligozoospermic Iranian patients and its effects on fertilisation and implantation rates after ICSI. *Andrologia* 2013; 45:46-55.
- Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, *et al.* Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum Reprod* 2005a; 20:2140-2152.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferrareti AP. Sperm and blastomere aneuploidy detection in reproductive genetics and medicine. *J Histochem Cytochem* 2005b; 53:261-267.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, *et al.* Preimplantation diagnosis after assisted reproduction techniques for genetically-determined male infertility. *J Endocrinol Invest* 2000; 23:711-716.
- Gil-Salom M, Bellver J, Romero JL, *et al.* 2002. Espermatogénesis: conceptos básicos. En: Remohí J, Pellicer A, Simón C, Navarro J (Eds.) *Reproducción Humana*. 2ª Edición. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U., pp. 273-278. ISBN: 84-486-0462-8.
- Giorlandino C, Calugi G, Iaconianni L, *et al.* Spermatozoa with chromosomal abnormalities may result in a higher rate of recurrent abortion. *Fertil Steril* 1998; 70:576-577.
- Gole LA, Wong PF, Ng PL, *et al.* Does sperm morphology play a significant role in increased sex chromosomal disomy? A comparison between patients with teratozoospermia and OAT by FISH. *J Androl* 2001; 22:759-763.
- Gonsalves J, Sun F, Schlegel PN, *et al.* Defective recombination in infertile men. *Hum Mol Genet* 2004; 13:2875-2883.
- González-Merino E, Hans C, Abramowicz M, *et al.* Aneuploidy study in sperm and preimplantation embryos from nonmosaic 47,XY men. *Fertil Steril* 2007; 88:600-606.
- Guttenbach M, Schmid M. Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization. *Am J Hum Gebet* 1990; 46:553-558.

## H

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

- Hamer G, Novak I, Kouznetsova A, *et al.* Disruption of pairing and synapsis of chromosomes causes stage-specific apoptosis of male meiotic cells. *Theriogenology* 2008; 69:333-339.
- Handel MA, Schimenti JC. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet* 2010; 11:124-136.
- Hardy K, Martin KL, Leese HJ, *et al.* Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990; 5:708-714.
- Härkönen K, Suominen J, Lähdetie J. Aneuploidy in spermatozoa of infertile men with teratozoospermia. *Int J Androl* 2001; 24:197-205.
- Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet* 2007; 16 Spec No. 2:R203-208.
- Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001; 2:280-291.
- Hennebicq S, Pelletier R, Bergues U, *et al.* Risk of trisomy 21 in offspring of patients with Klinefelter's syndrome. *Lancet* 2001; 30; 357:2104-2105.
- Hristova R, Ko E, Greene C, *et al.* Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with asthenoteratozoospermia. *Biol Reprod* 2002; 66:1781-1783.
- Huynh T, Mollard R, Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod Update* 2002; 8:183-198.

**I**

- In't Veld PA, Broekmans FJ, de France HF, *et al.* Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. *Hum Reprod* 1997; 12:752-754.
- In't Veld P, Branderburg H, Verhoeff A, *et al.* Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1995; 346:773.

**J**

- Johnson MD. Genetics risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counselling and screening. *Fertil Steril* 1998; 70:397-411.
- Joseph AM, Gosden JR, Chandley AC. Estimation of aneuploidy levels in human spermatozoa using chromosome-specific probes and in situ hybridization. *Hum Genet* 1984; 66:234-238.
- Jozwiak EA, Ulug U, Mesut A, *et al.* Prenatal karyotypes of fetuses conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2004; 82:628-633.

**K**

- Kovanci E, Kovacs T, Moretti E, *et al.* FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. *Hum Reprod* 2001; 16:1209-1217.

## L

- Lachaud C, Tesarik J, CanAadas ML, *et al.* Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 2004; 19:607-610.
- Lähdetie J, Saari N, Ajosenpää-Saari M, *et al.* Incidence of aneuploid spermatozoa among infertile men studied by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Am J Med genet* 1997; 71:115-121.
- Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A, *et al.* Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet* 1996; 14:400-405.
- Lazaros LA, Vartholomatos GA, Hatzi EG, *et al.* Assessment of sperm chromatin condensation and ploidy status using flow cytometry correlates to fertilization, embryo quality and pregnancy following in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28:885-891.
- Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, *et al.* Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001; 76:479-484.
- Lewis-Jones I, Aziz N, Seshadri S, *et al.* Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. *Fertil Steril* 2003; 79:212-215.
- Lowe X, Eskenazi B, Nelson DO, *et al.* Frequency of XY Sperm Increases with Age in Fathers of Boys with Klinefelter Syndrome. *Am J Hum Genet* 2001; 69:1046-1054.
- Luetjens CM, Rolf C, Gassner P, *et al.* Sperm aneuploidy rates in younger and older men. *Hum Reprod* 2002; 17:1826-1832.

## M

- Ma S, Ferguson KA, Arsovska S, *et al.* Reduced recombination associated with the production of aneuploid sperm in an infertile man: a case report. *Hum Reprod* 2006; 21:980-985.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, *et al.* Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos. *Reprod Biomed Online* 2009; 18:536-542.
- Mahfouz RZ, Sharma RK, Said TM, *et al.* Association of sperm apoptosis and DNA ploidy with sperm chromatin quality in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2009; 91:1110-1118.
- Malmanche N, Maia A, Sunkel CE. The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett* 2006; 580:2888-2895.
- Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, *et al.* Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod* 2006; 21:3036-3043.
- Martin RH. Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. *Reprod Toxicol* 2006; 22:142-147.
- Martin RH, Balkan W, Burns K, *et al.* Direct chromosomal analysis of human spermatozoa. *Am J Hum Genet* 1982; 34:459-468.
- Martin RH, Ernst S, Rademaker A, *et al.* Analysis of sperm chromosome complements before, during, and after chemotherapy. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 108:133-136.
- Martin RH, Greene C, Rademaker AW. Sperm chromosome aneuploidy analysis in a man with globozoospermia. *Fertil Steril* 2003c; 79:1662-1664.

- Martin RH, Rademaker AW, Greene C, *et al.* A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate and severe oligozoospermia. *Biol Reprod* 2003a; 69:535-539.
- Martin RH, Rademaker AW, Leonard NJ. Analysis of chromosomal abnormalities in human sperm after chemotherapy by karyotyping and fluorescence in situ hybridization (FISH). *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 80:29-32.
- Martin RH, Ernst S, Rademaker A, *et al.* Chromosomal abnormalities in sperm from testicular cancer patients before and after chemotherapy. *Hum Genet* 1997; 99:214-218.
- Martin RH, Greene C, Rademaker AW, *et al.* Analysis of aneuploidy in spermatozoa from testicular biopsies from men with nonobstructive azoospermia. *J Androl* 2003b; 24:100-103.
- Martínez-Pasarell O, Nogués C, Bosch M, *et al.* Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 1999a; 104:345-49.
- Martínez-Pasarell O, Templado C, Vicens-Calvet E, *et al.* Paternal sex chromosome aneuploidy as a possible origin of Turner syndrome in monozygotic twins: case report. *Hum Reprod* 1999b; 14: 2735-2738.
- Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, *et al.* Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update* 2011; 17:454-466.
- Mateizel I, Verheyen G, Van Assche E, *et al.* FISH analysis of chromosome X, Y and 18 abnormalities in testicular sperm from azoospermic patients. *Hum Reprod* 2002; 17:2249-2257.
- Mateu E, Rodrigo L, Prados N, *et al.* High incidence of chromosomal abnormalities in large-headed and multiple-tailed spermatozoa. *J Androl* 2006; 27: 6-10.
- Mateu E, Rodrigo L, Martínez MC, *et al.* Aneuploidies in embryos and spermatozoa from patients with Y chromosome microdeletions. *Fertil Steril* 2010; 94:2874-2877.
- Meeker JD, Godfrey-Bailey L, Hauser R. Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic. *J Androl* 2007; 28:397-406.
- Mehdi M, Gmidène A, Brahem S, *et al.* Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with severe teratozoospermia. *Andrologia* 2012; 44:139-143.
- Mínguez Y, Romero JL, Rubio C, *et al.* 2000. Obtención, preparación y congelación de espermatozoides para ICSI. En: Remohí J, Romero JL, Pellicer A, Simón C, Navarro J (Eds.) *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U., pp. 269-278. ISBN: 84-486-0278-1.
- Mir P, Rodrigo L, Mateu E, *et al.* Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. *Hum Reprod* 2010; 25:1812-77.
- Mokánszki A, Molnár Z, Ujfalusi A, *et al.* Correlation study between sperm concentration, hyaluronic acid-binding capacity and sperm aneuploidy in Hungarian patients. *Reprod Biomed Online* 2012; 25:620-626.
- Moosani N, Chernos J, Lowry RB, *et al.* A 47,XXY fetus resulting from ICSI in a man with an elevated frequency of 24,XY spermatozoa. *Hum Reprod* 1999; 14:1137-1138.
- Moosani N, Pattinson HA, Carter MD, *et al.* Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 1995; 64:811-817.



- Morel F, Douet-Guilbert N, Moerman A, *et al.* Chromosome aneuploidy in the spermatozoa of two men with globozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:835–838.
- Morel F, Mercier S, Roux C, *et al.* Interindividual variations in the disomy frequencies of human spermatozoa and their correlation with nuclear maturity as evaluated by aniline blue staining. *Fertil Steril* 1998; 69:1122-1127.
- Moretti E, Pascarelli NA, Giannerini V, *et al.* 18,X,Y aneuploidies and transmission electron microscopy in spermatozoa from five carriers of different reciprocal translocations. *Asian J Androl* 2009; 11:325-332.
- Mougou-Zerelli S, Brahem S, Kammoun M, *et al.* Detection of aneuploidy rate for chromosomes X, Y and 8 by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from patients with severe non-obstructive oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28:971-977.
- Mroz K, Hassold TJ, Hunt PA. Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic error. *Hum Reprod* 1998; 14:1151–1156.
- Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, *et al.* Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J Androl* 2007; 28:38-49.
- Myers GM, Lambert-Messerlian GM, Sigman M. Inhibin B reference data for fertile and infertile men in Northeast America. *Fertil Steril* 2009; 92:1920-1923.

## N

- Nagvenkar P, Zaveri K, Hinduja I. Comparison of the sperm aneuploidy rate in severe oligozoospermic and oligozoospermic men and its relation to intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 2005; 84:925-931.
- Nicklas RB. How cells get the right chromosomes. *Science* 1997; 275:632-637. Review.
- Nicopoulos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, *et al.* The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? *Hum Reprod* 2008; 23:240-250.
- Nishikawa N, Murakami I, Ikuta K, *et al.* Sex chromosomal analysis of spermatozoa from infertile men using fluorescence in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17:97-102.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, *et al.* 2005. *Thompson & Thompson Genética en medicina* (5a ed.). Barcelona: Masson, pp. 5-16. ISBN: 84-458-1225-4

## O

- Oliver-Bonet M, Liehr T, Nietzel A, *et al.* Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *Eur J Hum Genet* 2003; 11:879-883.
- Odorisio T, Rodriguez TA, Evans EP, *et al.* The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nature Genet* 1998; 18:257–261.
- Ohashi Y, Miharu N, Honda H, *et al.* High frequency of XY disomy in spermatozoa of severe oligozoospermic men. *Hum Reprod* 2001; 16:703-708.

Ovari L, Sati L, Stronk J, *et al.* Double probing individual human spermatozoa: aniline blue staining for persistent histones and fluorescence in situ hybridization for aneuploidies. *Fertil Steril* 2010; 93:2255-2261.

## P

Palermo GD, Colombero LT, Hariprashad JJ, *et al.* Chromosome analysis of epididymal and testicular sperm in azoospermic patients undergoing ICSI. *Hum Reprod* 2002; 17:570-575.

Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, *et al.* Detection of aneuploidy for chromosomes 4,6,7,8,9,10,11,12,13,17,18,21,X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999; 14:1266-1273.

Pang MG, Kim YJ, Lee SH, *et al.* The high incidence of meiotic errors increases with decreased sperm count in severe male factor infertilities. *Hum Reprod* 2005; 20:1688-1694.

Pareek TK, Joshi AR, Sanyal A, *et al.* Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists. *Apoptosis* 2007; 12:1085-1100.

Pawlowitski IH, Pearson PL. Chromosomal aneuploidy in human spermatozoa. *Humangenetik* 1972; 16:119-122.

Pearson PL, Bobrow M. Fluorescent staining of the Y chromosome in meiotic stages of the human male. *J Reprod Fertil* 1970; 22:177-179.

Perrin A, Coat C, Nguyen MH, *et al.* Molecular cytogenetic and genetic aspects of globozoospermia: a review. *Andrologia* 2013; 45:1-9.

Petit FM, Frydman N, Benkhalifa M, *et al.* Could sperm aneuploidy rate determination be used as a predictive test before intracytoplasmic sperm injection?. *J Androl* 2005; 26:235-241.

Pfeffer J, Pang MG, Hoegerman SF, *et al.* Aneuploidy frequencies in semen fractions from ten oligoasthenoazoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999; 72:472-478.

Platteau P, Staessen C, Michiels A, *et al.* Comparison of the aneuploidy frequency in embryos derived from testicular sperm extraction in obstructive and non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod* 2004; 19:1570-1574.

Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 2000; 22:423-430.

## Q

Qiu Y, Wang L, Zhang L, *et al.* Analysis of sperm chromosomal abnormalities and sperm DNA fragmentation in infertile males. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2008; 25:681-685.

## R

Rives N, Joly G, Machy A, *et al.* Assessment of sex chromosome aneuploidy in sperm nuclei from 47,XXY and 46,XY/47,XXY males: comparison with fertile and infertile males with normal karyotype. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:107-112.

- Rives N, Langlois G, Bordes A, *et al.* Cytogenetic analysis of spermatozoa from males aged between 47 and 71 years. *J Med Genet* 2002; 39(10):E63.
- Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, *et al.* Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet* 1999; 105:266-272.
- Robbins WA, Meistrich ML, Moore D, *et al.* Chemotherapy induces transient sex chromosomal and autosomal aneuploidy in human sperm. *Nat Genet* 1997; 16:74-78.
- Rodrigo L, Rubio C, Mateu E, *et al.* Analysis of chromosomal abnormalities in testicular and epididymal spermatozoa from azoospermic ICSI patients, by fluorescence *in-situ* hybridisation (FISH). *Hum Reprod* 2004; 19:118-123.
- Rodrigo L, Peinado V, Mateu E, *et al.* Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2010; 94:1380-1386.
- Rodríguez I, Ody C, Araki K, *et al.* An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J* 1997; 16:2262-2270.
- Roeder GS, Bailis JM. The pachytene checkpoint. *Trends Genet* 2000; 16:395-403.
- Rosenbusch B. Somatic chromosomal abnormalities in couples undergoing infertility treatment by intracytoplasmic sperm injection. *J Genet* 2010; 89:105-108.
- Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, *et al.* Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. *Fertil Steril* 2013; 99:1400-1407.
- Rubio C, Buendía P, Rodrigo L, *et al.* Prognostic factors for preimplantation genetic screening in repeated pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2009; 18:687-693.
- Rubio C, Gil-Salom M, Simón C, *et al.* Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001; 16:2084-2092.
- Rubio C, Giménez C, Fernández E, *et al.*; Spanish Interest Group in Preimplantation Genetics, Spanish Society for the study of the biology of reproduction. The importance of good practice in preimplantation genetic screening: critical viewpoints. *Hum Reprod* 2009; 24:2045-2047.
- Rubio C, Rodrigo L, Mir P, *et al.* Use of array comparative genomic hybridization (array-CGH) for embryo assessment: clinical results. *Fertil Steril* 2013; 99:1044-1048.
- Rubio C, Rodrigo L, Pérez-Cano I, *et al.* FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 2005; 11:497-506.
- Rubio C, Simón C, Blanco J, *et al.* Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16:253-258.
- Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi R. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 1978; 274:911-913.
- Ruwanpura SM, McLachlan RI, Matthiesson KL, *et al.* Gonadotrophins regulate germ cell survival, not proliferation, in normal adult men. *Hum Reprod* 2008; 23:403-411.

**S**

- Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fasmediated pathway. *Exp Cell Res* 1999; 251:350–355.
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, *et al.* Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002; 66:1061–1067.
- Samura O, Miharu N, He H, *et al.* Assessment of sex chromosome ratio and aneuploidy rate in motile spermatozoa selected by three different methods. *Hum Reprod* 1997; 12:2437–2442.
- Sánchez-Castro M, Jiménez-Macedo AR, Sandalinas M, *et al.* Prognostic value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis over PGD. *Hum Reprod* 2009; 24:1516–1521.
- Sarrate Z, Blanco J, Egozcue S, *et al.* Identification of meiotic anomalies with multiplex fluorescence in situ hybridization: Preliminary results. *Fertil Steril* 2004; 82:712–717.
- Sarrate Z, Vidal F, Blanco J. Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. *Fertil Steril* 2010; 93:1892–1902.
- Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, *et al.* The genetic basis of infertility. *Reproduction* 2003; 26:13–25.
- Shaha C, Tripathi R, Mishra DP. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365:1501–1515.
- Shi Q, Spriggs E, Field LL, *et al.* Single sperm typing demonstrated that reduced recombination is associated with the production of aneuploid 24, XY human sperm. *Am J Med Genet* 2001; 99:34–38.
- Silber S, Escudero T, Lenahan K, *et al.* Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2003; 79:30–38.
- Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testes. *Rev Reprod* 1999; 4:38–47.
- Stiblar-Martincic D. Morphometrical evaluation of germ cell apoptosis in infertile men. *Folia Biol* 2009; 55:233–237.
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, *et al.* Variation in MLHI distribution in recombination maps for individual chromosomes from human males. *Hum Mol Genet* 2006; 15:2376–2391.
- Sun F, Greene C, Turek PJ, *et al.* Immunofluorescent synaptonemal complex analysis in azoospermic men. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111:366–370.
- Sun F, Mikhaail-Philips M, Oliver-Bonet M, *et al.* The relationship between meiotic recombination in human spermatocytes and aneuploidy in sperm. *Hum Reprod* 2008a; 23:1691–1697.
- Sun F, Mikhaail-Philips M, Oliver-Bonet M, *et al.* Reduced meiotic recombination on the XY bivalent is correlated with an increased incidence of sex chromosome aneuploidy in men with nonobstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 2008b; 14:399–404.

**T**

- Tang SS, Gao H, Robinson WP, *et al.* 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* 2004; 19:147–151.

- Tang SS, Gao H, Zhao Y, *et al.* Aneuploidy and DNA fragmentation in morphologically abnormal sperm. *Int J Androl* 2010; 33:e163-179.
- Tempest HG, Homa ST, Dalakiouridou M, *et al.* The association between male infertility and sperm disomy: evidence for variation in disomy levels among individuals and a correlation between particular semen parameters and disomy of specific chromosome pairs. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2:82.
- Tempest HG, Ko E, Chan P, *et al.* Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients. *Hum Reprod* 2008; 23:251-258.
- Templado C, Donate A, Giraldo J, *et al.* Advanced age increases chromosome structural abnormalities in human spermatozoa. *Eur J Hum Genet* 2011; 19:145-151.
- Templado C, Marina S, Egozcue J. Three cases of low chiasmata frequency associated with infertility in man. *Andrologia* 1976; 8:285-289.
- Thomas NS, Collins AR, Hassold TJ, *et al.* A reinvestigation of non-disjunction resulting in 47,XXY males of paternal origin. *Eur J Hum Genet* 2000; 8:805-809.
- Thomas C, Cans C, Pelletier R, *et al.* No long-term increase in sperm aneuploidy rates after anticancer therapy: sperm fluorescence in situ hybridization analysis in 26 patients treated for testicular cancer or lymphoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6535-6543.

## U

- Uroz L, Liehr T, Mrasek K, *et al.* Centromere-specific multicolour fluorescence in situ hybridization on human spermatocyte I and II metaphases. *Hum Reprod* 2009; 24:2029-2033.
- Uroz L, Rajmil O, Templado C. Premature separation of sister chromatids in human male meiosis. *Hum Reprod* 2008; 23:982-987.
- Ushijima C, Kumasako Y, Kihai PE, *et al.* Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2000; 15:1107-1111.

## V

- ValoresNormales.com[2011]. *ValoresNormales.com* [sitio web]. Valores normales de análisis clínicos y de laboratorio. [Consulta: 8 octubre 2012]. Disponible en: <http://valoresnormales.com>
- Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, *et al.* Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in-situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Mol Hum Reprod* 1999; 5:682-690.
- Van Steirteghem A, Bonduelle M, Devroey P, *et al.* Follow-up of children born after ICSI. *Hum Reprod Update* 2002; 8:111-116.
- Vegetti W, Van Assche E, Frias A, *et al.* Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridisation in infertile men. *Hum Reprod* 2000; 15:351-365.

- Vendrell JM, García F, Veiga A, *et al.* Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Hum Reprod* 1999; 14:375-378.
- Vendrell JM. Estudios meióticos en la era del ICSI. *Cuad Med Reprod* 2005; 11:51-60.
- Vernaev V, Bonduelle M, Tournaye H, *et al.* Pregnancy outcome and neonatal data of children born after ICSI using testicular sperm in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2003; 18:2093-2097.
- Vialard F, Bailly M, Bouazzi H, *et al.* The high frequency of sperm aneuploidy in Klinefelter patients and in non-obstructive azoospermia is due to meiotic errors in euploid spermatocytes. *J Androl* 2012; 33:1352-1359.
- Vialard F, Hammoud I, Molina-Gomes D, *et al.* Gamete cytogenetic study in couples with implantation failure: aneuploidy rate is increased in both couple members. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25:539-545.
- Vicari E, de Palma A, Burrello N, *et al.* Absolute polymorphic teratozoospermia in patients with oligo-asthenozoospermia is associated with an elevated sperm aneuploidy rate. *J Androl* 2003; 24:598-603.
- Vicari E, Perdichizzi A, De Palma A, *et al.* Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: case report. *Hum Reprod* 2002; 17:2128-2133.
- Viville S, Mollard R, Bach ML, *et al.* Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies?: case report. *Hum Reprod* 2000; 15:2563-2566.
- Vogt PH. Molecular genetics of human male infertility: from genes to new therapeutic perspectives. *Curr Pharm Des* 2004; 10:471-500.

## W

- Wiland E, Hobel CJ, Hill D, *et al.* Successful pregnancy after preimplantation genetic diagnosis for carrier of t(2;7)(p11.2;q22) with high rates of unbalanced sperm and embryos: a case report. *Prenat Diagn* 2008; 28:36-41.
- Wong EC, Ferguson KA, Chow V, *et al.* Sperm aneuploidy and meiotic sex chromosome configurations in an infertile XYY male. *Hum Reprod* 2008; 23:374-378.
- World Health Organization. WHO technical report series 820. Recent advances in medically assisted conception. Geneva: 1992.
- Wyrobek AJ, Alhorn T, Balhorn R, *et al.* Fluorescence in situ hybridization to Y chromosome in decandensed human sperm nuclei. *Mol Reprod Dev* 1990; 27:200-208.
- Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, *et al.* Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:9601-9606.

## Y

- Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. The use of zona free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1976; 15:471-476.

---

Yang Z, Liu J, Collins GS, *et al.* Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet* 2012; 5:24-29.

## Z

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, *et al.* International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology; World Health Organization. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril* 2009a; 92:1520-1524.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, *et al.* International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology; World Health Organization. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum Reprod* 2009b; 24:2683-2687.

Zeyneloglu HB, Baltaci V, Ege S, *et al.* Detection of chromosomal abnormalities by fluorescent in-situ hybridization in immotile viable spermatozoa determined by hypo-osmotic sperm swelling test. *Hum Reprod* 2000; 15:853-856.





## 8. APÉNDICE DOCUMENTAL



Parte de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral han sido publicados en revistas con índice de impacto científico:

- Analysis of chromosomal abnormalities in testicular and epididymal spermatozoa from azoospermic ICSI patients by fluorescence in-situ hybridization. **Rodrigo L**, Rubio C, Mateu E, Simón C, Remohí J, Pellicer A, Gil-Salom M. *Human Reproduction* 2004 Jan;19(1):118-123.
- Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos. **Rodrigo L**, Peinado V, Mateu E, Remohí J, Pellicer A, Simón C, Gil-Salom M, Rubio C. *Fertility and Sterility* 2010 Sep;94(4):1380-1386.
- Testicular sperm from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia: aneuploidy risk and reproductive prognosis using testicular sperm from fertile donors as control samples. **Rodrigo L**, Rubio C, Peinado V, Villamón R, Al-Asmar N, Remohí J, Pellicer A, Simón C, Gil-Salom M. *Fertility and Sterility* 2011 Mar 1;95(3):1005-1012.

El siguiente trabajo ha sido presentado como póster en la 29 edición del congreso anual de la ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) celebrado los días 7-10 Julio de 2013 en Londres. Se encuentra entre los 10 póster que fueron pre-seleccionados para el "Clinical Science Award":

- FISH on sperm to identify infertile male patients with higher aneuploidy risk. **Rodrigo L**, Rubio C, Mateu E, Peinado V, Milán M, Vilorio T, Al-Asmar N, Mercader A, Buendía P, Delgado A, Escrich L, Martínez-Jabaloyas JM, Simón C, Gil-Salom M. *Human Reproduction* Volume 28 Number S1 June 2013. Abstract: P-458.



## 9. SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS



---

AB	Aborto
aCGH	Comparative Genomic Hybridization Array
ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
AnT	Anomalías totales
AneuT	Aneuploidías totales
AO	Azoospermia Obstructiva
AR	Aborto de Repetición
ARN	Ácido RiboNucleico
AS	Azoospermia Secretora
AZF	Azoospermic Factor
“c”	cromátida hermana
CC	Grupo control clínico
CE	Control de eyaculado
CenM-FISH	Centromere-specific Multicolor Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
CEP	Chromosome Enumeration Probes
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CT	Control de testículo
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DGP	Diagnóstico Genético Preimplantacional
Dipl	Diploidía
Dissex	Disomía de cromosomas sexuales
DS	Desviación estándar
DTT	Dithiothreitol
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
FI	Fallo repetido de Implantación
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FM	Factor Masculino
FISH	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
FIV	Fecundación <i>In Vitro</i>
GC	Gestación clínica
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas

HTF-HSA	Human Tubal Fluid – Human Serum Albumin
ICMART	Comité Internacional de Seguimiento en Tecnología de Reproducción Asistida
ICSI	Intracitoplasmic Sperm Injection
IVI	Instituto Valenciano de Infertilidad
LH	Hormona Luteinizante
LSI	Locus-Specific Identifier probes
M-FISH	Multiplex Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
MIX	Causas mixtas
“n”	cromosoma homólogo
NP-40	Nonyl Phenoxy polyethoxylethanol 40
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RNV	Recién nacido vivo
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SSC	Saline Sodium Citrate
T	Testosterona
TEL	Sonda telomérica
TESA	Testicular Sperm Aspiration
TI	Tasa de implantación



## **10. AGRADECIMIENTOS**



### ***Así empezó la historia que en estos días termina...***

*Necesitaba aprender a hacer ELISAS para mi estancia de ese verano en Londres, y mi profesor de inmunología me presentó a Carlos Simón de casualidad, en la lectura de la tesis de uno de sus doctorandos... Pasé un par de semanas con Carmela, por entonces también doctoranda suya, quien me acogió y me enseñó todo lo que necesitaba saber antes de partir...*

*Y a la vuelta, revisando el Diario Laboral que se publicaba los martes, encontré un anuncio de una beca que ofrecía la Fundación y, de nuevo de casualidad, fui a parar al despacho de Carlos Simón. Recordaba que había estado allí unos meses antes, y tras la entrevista, me dijo que esa beca no era para mí, pero que me iba a presentar a una persona “que me iba a encantar”, que junto con el urólogo de la clínica estaban buscando a alguien para hacer un proyecto de anomalías cromosómicas en espermatozoides... “les diré que te llamen” me dijo.*

*Y ese día llegó, recibí una llamada de una voz femenina que preguntó “¿Lorena Rodríguez?...” eh... “RO-DRI-GO” respondí... ¿y esta es la persona “que me iba a encantar”? pensé... De la conversación que mantuvimos no recuerdo nada... lo próximo ya fue la entrevista con “la voz” y “el urólogo”.*

*Y así conocí a M<sup>a</sup> Carmen Rubio y a Manolo Gil-Salom, las navidades del 99, que me ofrecieron el mejor regalo de ese año, ¡y de los casi 14 años siguientes!*

Agradezco a Carlos la oportunidad que me dio de formar parte de este pequeño equipo, que ha ido creciendo y se ha convertido en una segunda familia para mí. Gracias por ser mi tutor y dejarme ocupar una de tus plazas de doctorando durante tantos años. Por confiar en mí y permitirme cada día disfrutar de lo que hago.

A Manolo, gracias por transmitirme tu entusiasmo por esta tesis a lo largo de todos estos años. Por mostrarme el mundo de la andrología y estar ahí en mis primeros congresos. Por apoyarme cuando tomé la decisión de dedicar más tiempo a la clínica. Y por confiar en que este día llegaría, a pesar de todo. Por ser tan cercano, y por compartir conmigo la ilusión por mi primer informe de FISH de espermatozoides. Ha sido un placer y un honor ser tu doctoranda.

A M<sup>a</sup> Carmen, gracias por ser el motor de esta tesis, y hacer que me sienta orgullosa de ella, al estilo “biólogo”. Por transmitirme tus conocimientos, y darme la oportunidad de crecer tanto personal como profesionalmente a tu lado. Por hacer que trabajar cada día contigo sea un placer. Por enseñarme que, cerrando los ojos muy fuerte y volviéndolos a abrir, podemos ver los puntitos de colores que no vemos a simple vista. Gracias por ser la persona “que me iba a encantar”.

Muchas gracias a Menchín, Reme y Pilar, por recogerme las biopsias de testículo después de buscar y rebuscar espermatozoides, y por enseñarme a diferenciar los “feos” de los “bonitos”. Y a los compañeros de andrología (el LAI), Peque, Paloma, Yoli y Carol, por hacer “unos cuantos” seminogramas al principio... y no tan al principio...

Gracias a Raúl y a Jose M<sup>a</sup>, por compartir la bancada del laboratorio de Guardia Civil con nuestros baños, y por hacerme reír tanto. Y a Jose Luís, por ayudarme a sobrevivir en las clases del doctorado a pesar del sueño que arrastrábamos los sábados por la mañana.

A todos mis compañeros y amigos del DPI, muchas gracias. A Emi, per haver comptat tants espermatozoides amb mi que ja s'hem descomptat; moltíssimes gràcies per haver revisat la tesi amb tant de carinyo... i per no haver-me fet canviar massa coses. No et preocupes que tinc guardat un paquet de Kleenex per plorar tots junts al final de la defensa!. A Asun y Raquel, por vuestra inestimable ayuda técnica, por ayudarme a contar tantos espermatozoides y a revisar esa base de datos "infernál". Raquel, "súbele 2 minutos al DTT". Asun, "¡hay que contar diez mil!"; ¡muchas gracias chicas!. A Vane, pequeña Obi-Wan, por mostrarme tu cara más afable en los momentos más duros, con diecinueve casos de DGP por FISH en nuestras manos, cuando parecía que House ganaba la batalla a Yoda en mi interior. A Pere, per ser el mussol de la sabiduria i ajudar-me a entendre entre altres coses, el món dels arrays; per compartir tant sense demanar res a canvi. A Miguel, por enseñarme a cambiar de objetivo a mi cámara y a ver las cosas desde una perspectiva diferente. A Chiti, por compartir conmigo a tu Edwards en el momento justo, ni antes ni después, como sólo tú sabes hacerlo. A Nasser, por whatsAppear conmigo a altas horas de la madrugada; ahora que Irene duerme toda la noche, ¡ni se te ocurra hacerlo!. A Sandra, por mostrarme la alegría que se siente cuando se termina la tesis, y por animarme cada día a hacerlo, como un auténtico "coacher". A Eva, por compartir conmigo tu paz interior, y cuidarme todos los días.

A Ana, Mila, Julio, Vicente, Peque (otra vez), por ser unos vecinos excelentes, y hacer que sonriamos aunque la lluvia caiga en forma de tormenta. A l@s nuevos compañer@s de Iviomics y FIVI, por mostrarme vuestro apoyo en estos momentos finales.

A María, por hacerme una portada preciosa, mucho más bonita de lo que hubiese imaginado. Tienes un talento especial, ¡muchísimas gracias!.

A los estadísticos. Nico, gràcies per ajudar-me als inicis i presentar-me al senyor Bonferroni!. Marcos, tot el que diga es queda curt per agrair-te la estadística que has fet a aquesta tesi. Disculpes si caben per haver-te fet viure unes quantes vegades "el dia de la marmota...". Un milió de gràcies per la teua ajuda i amistat. A Josean, gracias por quedarte conmigo a investigar el SPSS, ¡no sé cómo hubiera salido de esto sin ti!. Mil gracias por haberme cubierto las guardias para que pudiera acabar de escribir la tesis... ¡Te dedicaré con mucho cariño mis próximas galletas de chocolate!.

A las que formaron parte del mismo equipo cuando estábamos en el IVI, especialmente a Amparo, por escucharme, apoyarme, estar siempre ahí, y mostrarme la realidad en los momentos de turbulencia hormonal. A Pili, Txuqui, Laura, Thamara, Tugce,..., en mi corazón seguimos siendo un equipo, muchas gracias a todas por vuestra amistad.

A los ginecólogos de todos los IVI, por haber contribuido a aumentar la “n” de nuestros estudios. En especial a Carmina, Pepe y Ernesto, por ayudarme además a perder la vergüenza haciéndome pasar muchos momentos roja como un tomate debajo de la mesa del comedor de Guardia Civil... Gracias por eso, ¡y por diagnosticar “tan mal” mi pronóstico reproductivo!.

A Pep, a M<sup>a</sup>José y a Amparo R. por acogerme y cuidarme desde siempre. A los compañeros del FIV de Valencia, y a los compañeros tan especiales que tengo repartidos por el resto de IVIs: Inma, Nico, Marga, Mireia, Raquel, Fernando, Cristina, Marta, M<sup>a</sup> José,... y a los que me dejo por nombrar por formar parte de una lista interminable...; a tod@s, muchas gracias por vuestras muestras constantes de afecto.

A José Remohí y a Antonio Pellicer, por promover desde siempre la ciencia en el IVI.

A Mari, per estar sempre al meu costat quant et necessite, i no deixar que el temps que dediquem als projectes professionals trenquen la nostra amistat. A Bea, por tu apoyo continuo, por tus largas conversaciones y tus buenos consejos, que tanto me han ayudado a dar el salto para terminar de escribir esta tesis.

A Alberto, per no deixar que caiguera quant vaig topetar de cara amb el bussó de la plaça. Per això i per moltes coses més. M’havera agradat compartit també aquest moment amb tu.

A mos pares Lola i Vicent, per ensenyar-me que tot esforç té la seua recompensa, i per animar-me a seguir estudiant a pesar d’haver patit en silenci durant anys cada vegada que trencava un treball “casi” perfecte (segons vosaltres, clar!). Mamà, gràcies per compartir els meus horaris i compatibilitzar-los amb els teus, per fer de mare a més de iaia amb Marc i Irene, i fer-ho tot des del cor. Papà, gràcies per inculcar-me la qualitat de la perfecció... encara que una mica menys tampoc m’havera importat!.

A la meua germana Noelia, per estar sempre tan a prop a pesar de la distancia, i per il.lusionar-te amb tot el que faig. Eres molt gran.

A Toni, el meu company incondicional. Han sigut molts anys d’anades i vingudes en solitari..., però per fi arriba el final d’aquesta etapa. Moltes gràcies per ser tan pacient!. Gràcies per aportar tranquil.litat i equilibri a la meua vida, i per velar cada dia per la nostra família.

Als meus fills, Marc i Irene, gràcies per ser tan carinyosos, i per donar-me cada dia l’alè que es necessita per poder sacrificar el temps que vos pertany en pro d’aquesta tesi.

I finalment, a tota la família i amics que heu patit les meues continues absències, moltes gràcies per la vostra comprensió.



*Enseñarás a volar,  
pero no volarán tu vuelo.*

*Enseñarás a soñar,  
pero no soñarán tu sueño.*

*Enseñarás a vivir,  
pero no vivirán tu vida.*

*Sin embargo...  
en cada vuelo,  
en cada vida,  
en cada sueño,  
perdurará siempre la huella  
del camino enseñado.*

Teresa de Calcuta







