

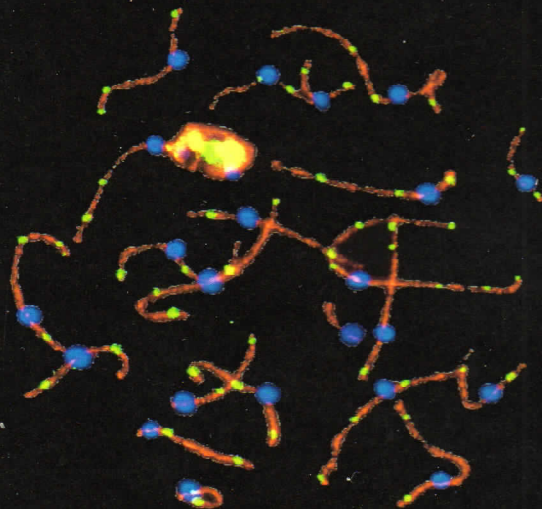


VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

# Estudio de anomalías meióticas y aneuploidías en pacientes con azoospermia secretora



TESIS DOCTORAL

VANESSA PEINADO CERVERA

DIRIGIDA POR:

DRA. CARMEN RUBIO LLUESA

DR. MANUEL GIL SALOM

PROF. JOSÉ REMOHÍ GIMÉNEZ











VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA

---

**ESTUDIO DE ANOMALÍAS MEIÓTICAS Y  
ANEUPLOIDÍAS EN PACIENTES CON  
AZOOSPERMIA SECRETORA.**

---

TESIS DOCTORAL

Memoria realizada por D<sup>a</sup> Vanessa Peinado Cervera  
para optar al Grado de Doctor por  
la Universitat de València

Dirigida por: Dra. Carmen Rubio Lluesa,  
Dr. Manuel Gil-Salom, y Prof. Jose Remohí Giménez



Dra. Carmen Rubio Lluesa, Directora de la Unidad de Diagnóstico Genético Preimplantacional de Igenomix SL.

CERTIFICO:

Que D<sup>a</sup> Vanessa Peinado Cervera ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Estudio de anomalías meióticas y aneuploidías en pacientes con azoospermia secretora”. Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa públicas para optar al grado de doctor.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado

Valencia, 22 de octubre de 2015

Fdo: Dra. Carmen Rubio Lluesa





Dr. Manuel Gil-Salom, Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de Valencia y Jefe de Servicio de Urología del Hospital Universitario Dr. Peset

CERTIFICO:

Que D<sup>a</sup> Vanessa Peinado Cervera ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Estudio de anomalías meióticas y aneuploidías en pacientes con azoospermia secretora”. Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa públicas para optar al grado de doctor.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado

Valencia, 22 de octubre de 2015

Fdo: Dr. Manuel Gil Salom



Prof. José Remohí Giménez, Catedrático de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia y director del Instituto Valenciano de Infertilidad.

CERTIFICO:

Que D<sup>a</sup> Vanessa Peinado Cervera ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Estudio de anomalías meióticas y aneuploidías en pacientes con azoospermia secretora”. Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa públicas para optar al grado de doctor.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado

Valencia, 22 de octubre de 2015

Fdo: Prof. José Alejandro Remohí



*A mi tío, Manolo Gil*



*El éxito no es definitivo, el fracaso no es fatal, es  
el valor para continuar lo que cuenta.*

*Winston Churchill.*





# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Infertilidad masculina	3
1.2. Meiosis masculina: generalidades	6
1.3. Apareamiento y sinapsis	10
1.4. Recombinación meiótica	15
1.5. Estudio de anomalías meióticas en varones infértiles	16
1.6. Técnicas de estudio de la meiosis	20
1.7. Estudio de aneuploidías en espermatozoides	25
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
2.1. Objetivos general	29
2.2. Objetivos específicos	29
<b>3. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>31</b>
3.1. Hipótesis	33
3.2. Diseño	33
3.3. Lugar de ejecución	33
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
4.1. Muestras analizadas	37
4.1.1. Grupo Control	37
4.1.2. Grupos de estudio	37
4.2. Inmunofluorescencia	45
4.2.1. Protocolos de fijación de células meióticas de testículo	45
4.2.2. Protocolo de inmunotinción	46
4.2.3. Descripción de las variables analizadas	49
4.3. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	55
4.3.1. FISH de espermatozoides	55
4.3.1.1. Protocolo de fijación de espermatozoides testiculares	55
4.3.1.2. Protocolo de hibridación <i>in situ</i> fluorescente en preparaciones con espermatozoides testiculares	57
4.3.1.3. Interpretación de las señales de hibridación	59
4.3.1.4. Descripción de las variables analizadas	61
4.3.2. FISH de espermatozoides primarios en estadio de paquitene	61
4.3.2.1. Protocolo de trabajo	64
4.3.2.2. Descripción de las variables analizadas	66
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>67</b>
5.1. Análisis de la progresión meiótica	69
5.2. Medición de la longitud total de los complejos sinaptonémicos (CS)	73
5.3. Análisis de la frecuencia de recombinación meiótica	76
5.4. Estudio de la frecuencia específica de recombinación meiótica por cromosoma	85
5.5. Incidencia de anomalías cromosómicas en espermatozoides testiculares	91

<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>97</b>
6.1. Acerca de la hipótesis de trabajo .....	99
6.2. Acerca del diseño del estudio .....	100
6.2.1. Elección del grupo control de pacientes con azoospermia obstructiva post-vasectomizados .....	101
6.2.2. Selección de los grupos de estudio.....	102
6.3. Acerca de la metodología utilizada .....	103
6.3.1. Lo que nos han enseñado las técnicas de inmunocitogenética sobre la meiosis masculina .....	103
6.3.2. El FISH como técnica de estudio de aneuploidías en espermatozoides.....	108
6.4. Acerca de la relación entre las variables analizadas .....	110
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>113</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>117</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>135</b>
Anexo I. Informe del Comité ético de investigación clínica .....	137
Anexo II. Hoja de información y consentimiento informado.....	138
Anexo III. Aportaciones a congresos derivadas de los datos obtenidos en la presente tesis doctoral.....	143
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>147</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>149</b>

# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1. INFERTILIDAD MASCULINA

El término “infertilidad” ha sido definido, según el Comité Internacional de Reproducción Asistida (ICMART) y la Organización mundial de la Salud (OMS), como la enfermedad del sistema reproductivo que determina la incapacidad de una pareja para conseguir un embarazo después de mantener relaciones sexuales regulares no protegidas durante un año o más (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009a, 2009b).

La infertilidad es un problema que afecta al 15% de las parejas en edad reproductiva (De Kretser *et al.*, 1997; revisado por O'Brien *et al.*, 2010). Durante muchos años se ha asumido que gran parte de los problemas reproductivos se podían atribuir a la mujer, pero la experiencia acumulada en las investigaciones de los últimos años ha demostrado que entre el 30 y el 50% de los casos de infertilidad están causados por un factor masculino (Lipshultz and Howards, 1997; revisado por Stahl *et al.*, 2012), muchas veces con origen genético (~15% de los varones infértiles).

El origen de la infertilidad masculina ha sido motivo de muchos estudios utilizando diferentes aproximaciones. Desde el punto de vista genético se ha estudiado la incidencia de anomalías cromosómicas en espermatozoides mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Se ha descrito en la literatura, que los varones infértiles, sobre todo aquellos con bajo recuento espermático, tienen una frecuencia aumentada de aneuploidías en sus espermatozoides, lo que conlleva un riesgo incrementado de tener abortos y descendencia con anomalías cromosómicas (Egozcue *et al.*, 2000a).

El 5,8% de los varones infértiles que son oligozoospermicos o azoospermicos presentan alteraciones cromosómicas en el cariotipo 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). Estas alteraciones pueden ser anomalías numéricas o bien anomalías estructurales. 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).

La contribución de las anomalías meióticas a la infertilidad masculina humana ha sido reconocida desde hace tiempo. En 1959, se describió la asociación entre las anomalías numéricas de los cromosomas sexuales (p. ej. 47, XXY) y el fallo para producir espermatozoides. Posteriormente, análisis citogenéticos de varones atendidos en clínicas de infertilidad demostraron que las anomalías cromosómicas estructurales, eran un importante factor a tener en cuenta en la infertilidad masculina. Específicamente, se encontró que las células germinales con cromosomas adicionales o con alteraciones estructurales tenían defectos severos en la orientación y el movimiento durante las primeras etapas de la meiosis, acabando frecuentemente en bloqueo meiótico y apoptosis de la célula germinal.

Además, se describieron individuos infértiles con constituciones cromosómicas aparentemente normales, pero con defectos en el apareamiento o la sinapsis de los cromosomas homólogos, sugiriendo que mutaciones génicas, así como anomalías cromosómicas, podrían contribuir al bloqueo en la meiosis I (Topping *et al.*, 2006).

El complejo proceso madurativo de la espermatogénesis puede detenerse en cualquier estadio madurativo de la línea germinal (espermatogonia, espermatocono primario, espermatocono secundario, espermátide inmadura o espermátide madura), afectando a todas las líneas celulares germinales, situación que nos haría encontrarnos con un

bloqueo completo (azoospermia), o solo a algunas, teniendo en tal caso un bloqueo parcial (oligozoospermia).

La presencia de microdeleciones en el brazo largo del cromosoma (Yq11) también ha sido objeto de estudio. Genes localizados en la región eucromatínica de Yq como el Factor Azoospermico (AZF) juegan un papel esencial en la regulación de la espermatogénesis. Se han identificado tres regiones AZF diferentes: AZFa, AZFb y AZFc, y se cuestiona la existencia de una cuarta (AZFd) (Sadeghi-Nejad *et al.*, 2007; Krausz *et al.*; 2014). Pequeñas deleciones en estas regiones, detectables por PCR, dan lugar a alteraciones severas de la espermatogénesis (Martínez *et al.*; 2000; Foresta *et al.*; 2001; Liz *et al.*; 2008), desde síndrome de sólo células de Sertoli o la detención de la espermatogénesis si las regiones AZFa y AZFb son las afectadas, y fenotipo variable desde oligozoospermia severa hasta azoospermia, en el caso de que lo fuera la región AZFc (hasta un 60% de las microdeleciones Y se circunscriben a esta región). Aunque la existencia de estas microdeleciones no tiene otros efectos aparte de la esterilidad, su trascendencia clínica estriba en que los pacientes portadores de la microdelección con suficientes espermatozoides para realizar ICSI tienen una probabilidad del 100% de riesgo de transmitir esta alteración a sus hijos varones, ya que necesariamente heredarán el cromosoma Y del padre. En principio, sólo causa esterilidad, sin que haya ningún otro tipo de repercusión (Page *et al.*; 1999; Cram *et al.*; 2000; Lee *et al.*; 2006). No obstante, se han publicado algunos casos de microdeleciones asociadas a un incremento de mosaicismo 45, X/46, XY en la descendencia, lo cual sugiere que, en ocasiones, los portadores podrían transmitir a sus hijos varones no sólo esterilidad, sino otras anomalías cromosómicas (Yogev *et al.*; 2004; Patsalis *et al.*; 2005; Mateu *et al.*; 2010).

Hay algunos grupos que postulan la importancia de los estudios en la línea germinal para entender los mecanismos que conducen a problemas cromosómicos en la descendencia en varones con infertilidad masculina severa y cariotipos normales. Los estudios de meiosis en varones infértiles con cariotipo normal en sangre periférica 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).

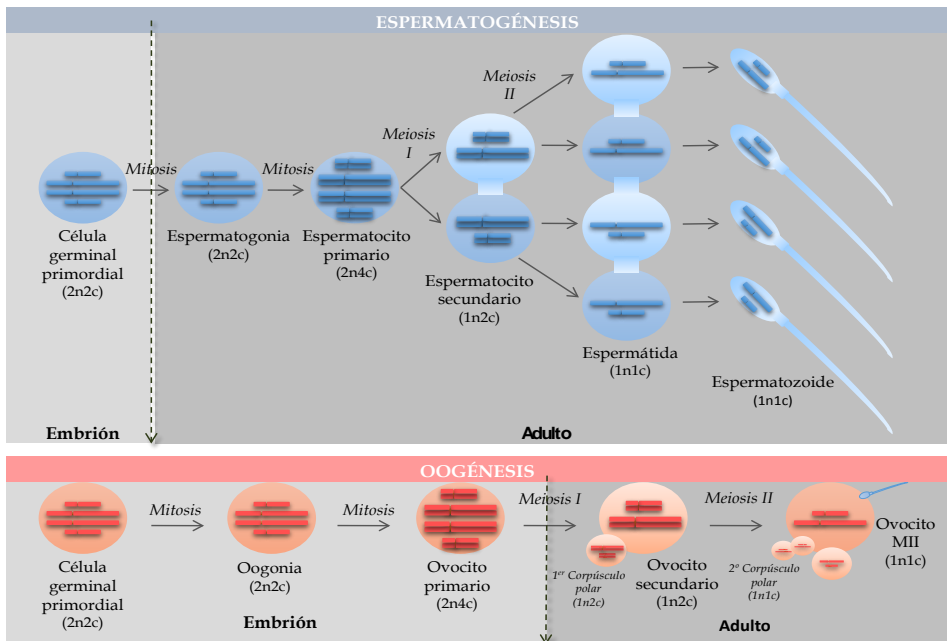
En casos de espermatogénesis anormal, las técnicas de inmunocitogenética aplicadas al estudio de la línea germinal en biopsias testiculares, han proporcionado un nuevo enfoque al estudio de la infertilidad masculina idiopática. El estudio de la meiosis a nivel testicular podría ayudar a conocer los mecanismos de la infertilidad en aproximadamente un 10% de todos los casos de azoospermia secretora (Topping *et al.*, 2007).

## 1.2. MEIOSIS MASCULINA: GENERALIDADES

La meiosis es un proceso de división celular por el cual las células germinales pasan a tener una dotación cromosómica haploide ( $1n$ ) a diferencia del resto de células del organismo que poseen una dotación cromosómica diploide ( $2n$ ).

Consiste en una ronda de síntesis de ADN seguida de dos rondas de segregación cromosómica y división celular llamadas meiosis I (MI) y meiosis II (MII). Ambas comprenden profase, metafase, anafase y telofase. En la MI se produce una división reduccional y la segregación de los cromosomas homólogos, y en la MII se produce una división ecuacional y en ella se produce la segregación de las cromátidas hermanas.

La formación de gametos masculinos y femeninos en humanos difiere considerablemente, aunque la secuencia de acontecimientos es la misma, su cronología es muy distinta. (Ver Figura I-1)



**Figura I-1.** Formación de gametos masculinos (espermatogénesis) y femeninos (oogénesis). Dotación haploide (1n); dotación diploide (2n); una cromátida (1c); dos cromátidas (2c).

En la meiosis masculina, la espermatogonia fetal derivada de las células germinales primordiales, está en los cordones testiculares, rodeada por células de Sertoli. A diferencia de lo que ocurre con las femeninas, las células germinales masculinas no comienzan la división meiótica hasta la pubertad y una vez iniciada no cesa, manteniendo además la proliferación mitótica a nivel de las espermatogonias. Otra de las diferencias entre la meiosis femenina y masculina es que en esta última, como resultado final se producen 4 células haploides (espermátidas) de cada célula diploide (espermatocito primario), mientras que en la femenina sólo una de ellas se desarrolla dando lugar a un gameto maduro, el ovocito y los corpúsculos polares degeneran durante el desarrollo posterior. De forma general, la meiosis comienza con la Profase I, etapa de especial importancia ya que se producen dos eventos críticos: la sinapsis, en la que cada pareja de cromosomas homólogos se encuentran y se aproximan, y la recombinación, proceso de intercambio de material genético entre cromosomas

homólogos, destinado a aumentar la variabilidad genética de la descendencia. Se divide en cuatro estadios: leptotene, zigotene, paquitene, diplotene y diacinesis.

**Leptotene:** los cromosomas homólogos comienzan a condensarse y a aproximarse para alinearse sin llegar a emparejarse todavía. Con la ayuda de cohesinas (como REC8 y SMC1B) y de proteínas específicas del complejo sinaptonémico, cada par de cromátidas hermanas empieza a ensamblar los elementos axiales. 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 núcleos de recombinación a lo largo de los elementos axiales en formación.

**Zigotene:** la condensación de los cromosomas homólogos, continúa y comienzan a emparejarse a lo largo de toda su longitud mediante el proceso llamado sinapsis (revisado por Handel and Schimenti, 2010), gracias a una estructura proteica dispuesta longitudinalmente a lo largo de cada bivalente, llamada complejo sinaptonémico.

**Paquitene:** los cromosomas homólogos 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 el 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 disocian y las cohesinas que mantienen unidas 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 opuestos. En anafase I, los dos miembros de cada bivalente se separan y se produce el fenómeno de disyunción, en el que los centrómeros con sus dos cromátidas hermanas se dirigen hacia polos opuestos de la célula.

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 primera división celular. El espermatocito primario se divide en dos espermatocitos secundarios haploides, con 23 cromosomas y cada uno con dos cromátidas hermanas (1n, 2c).

En la Meiosis II, los espermatocitos secundarios sufren una segunda división meiótica, similar a una mitosis, pero sin replicación del ADN. Se divide también en cuatro fases: profase II, metafase II, anafase II y telofase II. Así, en la segunda división celular, las cohesinas existentes entre las cromátidas hermanas son eliminadas y cada espermatocito secundario se divide en dos espermátidas haploides, con 23 cromosomas, con una cromátida hermana cada uno (1n, 1c).

Las espermátidas 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.

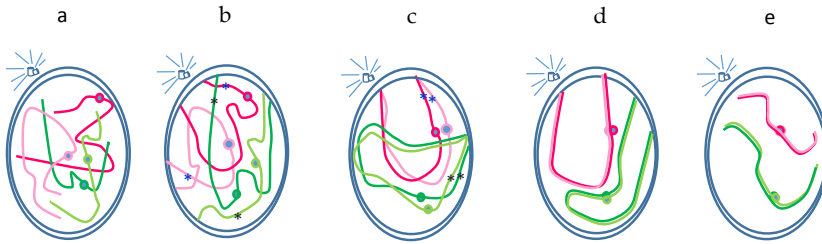
### 1.3. APAREAMIENTO Y SINAPSIS

El apareamiento entre cromosomas homólogos se inicia en el estadio de Leptotene y consiste en el reconocimiento de homología y el alineamiento de cada par de cromosomas homólogos.

Se desconoce el mecanismo por el que los cromosomas pueden encontrar a sus parejas homólogas. Considerando el enorme tamaño del genoma es poco probable que las secuencias de ADN se comparen directamente sobre la totalidad del genoma en el núcleo como en una búsqueda de coincidencias en una base de datos. Algunos autores proponen, que el reconocimiento de los cromosomas homólogos podría implicar identificadores específicos que pudieran reconocer la homología a primera vista sin comparar las secuencias de nucleótidos en detalle, como por ejemplo características estructurales específicas para cada cromosoma (Da-Qiao Ding *et al.*; 2010).

En cuanto al alineamiento de los cromosomas, la disposición en bouquet es la más común en todos los organismos. Los telómeros quedan anclados a un área restringida de la envoltura nuclear, generando una disposición polarizada de los cromosomas. (Ver Figura I-2).

A continuación, la sinapsis se inicia en el estadio de Zigotene, y consiste en la unión física de los cromosomas homólogos apareados, mediante la formación del complejo sinaptonémico.



**Figura I-2. Reconocimiento y sinapsis de los cromosomas homólogos en la profase meiótica.** (a) Durante la interfase pre-meiótica, los cromosomas homólogos desparejados se distribuyen dentro del núcleo. (b) los identificadores cromosómicos putativos (\*/\*) se forman a lo largo de cada cromosoma al inicio de la profase meiótica. (c-d) Después del alineamiento de los cromosomas por la disposición en bouquet, los identificadores cromosómicos putativos reconocen su pareja homóloga. (e) las parejas de cromosomas homólogos están en sinapsis al final de la profase (A partir de Da-Qiao Ding et al.; 2010).

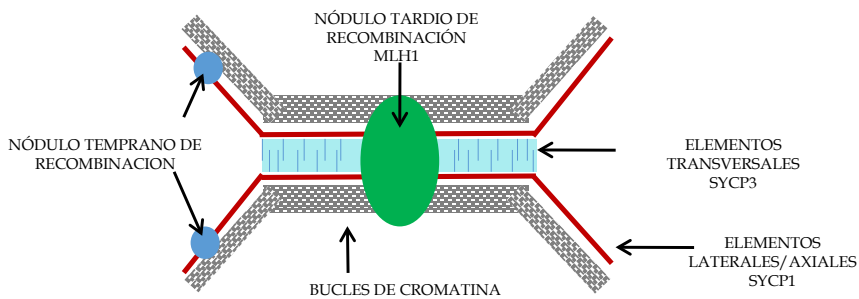
El complejo sinaptonémico (CS) es el entramado proteico que va a mantener a los cromosomas homólogos en sinapsis, y que está dispuesto longitudinalmente a lo largo de cada bivalente. Es una estructura estrictamente meiótica, que fue descrita por primera vez en 1956 por Moses y Fawcett. Está compuesto por un grupo triple de bandas en paralelo: los *elementos laterales* – adherido cada uno a un cromosoma homólogo – y un *elemento axial central* unido por filamentos transversales. Los elementos laterales están dispuestos en paralelo y de forma equidistante al elemento axial. Los filamentos transversales están localizados entre los elementos laterales y el elemento axial de forma perpendicular.

Además de mantener a los cromosomas homólogos en sinapsis, el CS proporciona una localización favorable para anclar la maquinaria proteica de la recombinación. Se observan dos tipos diferentes de estructuras densas en la región central llamadas *nódulos*. Aquellos que se observan en zigotene son los *nódulos tempranos*, que son generalmente pequeños y de forma irregular, mientras que los *nódulos presentes en paquitene*, denominados, *nódulos de recombinación* o *nódulos tardíos*, son más largos y

## INTRODUCCIÓN

a menudo están localizados en la parte superior de la región central del CS (Zickler and Kleckner, 1999). (Ver Figura I-3).

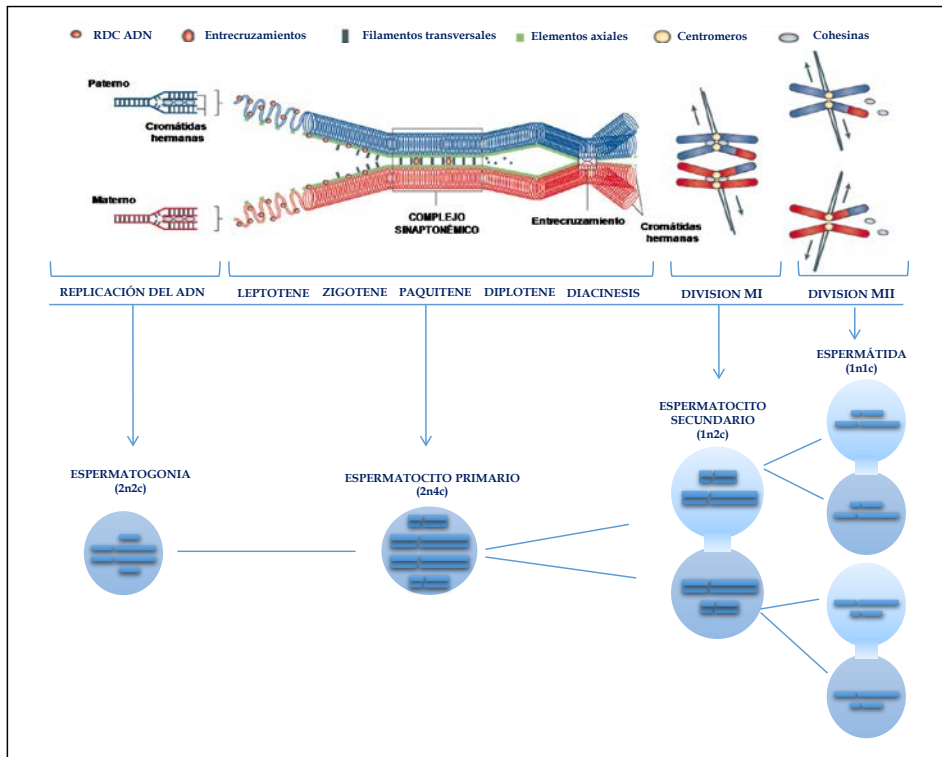
Se han identificado tres componentes proteicos del complejo sinaptonémico: SYCP1 (Synaptonemal Complex Protein 1), SYCP2 y SYCP3. SYCP1 es el componente mayoritario de los elementos transversales, mientras que SYCP2 y SYCP3 forman los elementos axiales y los laterales (Revisado por Handel Schimenti, 2010).



**Figura I-3:** Esquema de la disposición y los componentes del Complejo Sinaptonémico (A partir de capítulo "The Genetics of Male Infertility" en el libro *The Immunocytogenetics of Human Male Meiosis*).

Estas estructuras se han visualizado utilizando anticuerpos monoclonales. De estos, los anticuerpos monoclonales frente a SYCP3 son los más utilizados en estudios inmunocitogenéticos porque se localiza en los primeros componentes que se forman del complejo sinaptonémico (elementos axiales) y por tanto, se puede utilizar para monitorizar el ensamblaje y desensamblaje del CS durante la profase I de la meiosis. De hecho, la distribución de SYCP3 varía enormemente a lo largo de la profase I: en Leptotene SYCP3 aparece como pequeños fragmentos lineales, en Zigotene los elementos axiales empiezan a elongarse y a comenzar la sinapsis, en Paquitene la sinapsis es completa, observándose 22 estructuras (1 por cada bivalente) y una vesícula sexual

(bivalente XY), y por último en Diplotene, cada par de cromátidas hermanas empieza a separarse, visualizándose como horquillas en el CS. (Ver Figura I-5).



**Figura I-4:** Esquema del complejo sinaptonémico en las distintas etapas de la profase I (A partir de Burgoyne *et al.*; 2009).

La distribución del SYCP3 en las células meióticas nos permite detectar problemas en la sinápsis, especialmente en el estadio de Paquitene de la Profase I, donde se completa el proceso de sinapsis.

Mediante el uso de anticuerpos monoclonales, se ha observado que la iniciación sináptica se produce en regiones subtelo méricas y no en teloméricas como se pensaba en un principio. Además, se ha descrito que los centrómeros evitan la propagación de la sinapsis desde el brazo q al brazo p y viceversa (Brown *et al.*, 2005) y se han evidenciado diferentes patrones de alteraciones sinápticas (Sun *et al.*, 2005, 2007).



Los trabajos de secuenciación génica, que se han realizado en varones infértiles, han permitido identificar mutaciones para algunas de las proteínas implicadas en la meiosis, entre ellas, para SYCP3 (Sanderson *et al.*, 2008).

Se ha descrito que los ratones macho homocigotos con la mutación nula para el gen SYCP3 (SYCP3<sup>-/-</sup>/SYCP3<sup>-/-</sup>) son estériles, como resultado de una muerte celular masiva por apoptosis en los testículos durante la profase I. En estos ratones SYCP3 deficientes, los elementos axiales ó laterales no se generan y por tanto no se forma el CS. Los cromosomas de los espermatozoides de ratones mutantes no entran en sinapsis y se detiene la meiosis. Por el contrario, los mutantes heterocigotos son fértiles (Miyamoto *et al.*, 2003). Las hembras SYCP3 deficientes son fértiles y producen descendencia sana aunque ha descrito un incremento de muerte intaruterina por la generación de ovocitos con aneuploidias por una segregación cromosómica defectuosa.

La presencia de mutaciones en el gen SYCP3 en mujeres con aborto de repetición, se ha asociado con incremento de aneuploidías en los embriones de estas pacientes. Se ha sugerido que estas mutaciones darían lugar a un complejo sinaptonémico aberrante, resultando en una segregación cromosómica anómala y por tanto generando aneuploidías y aborto de repetición (Bolor *et al.*, 2009). También se ha sugerido una relación entre el polimorfismo T657C de SYCP3, y un mayor riesgo de aborto recurrente en la población (Sazegari *et al.*, 2014).

## 1.4. RECOMBINACIÓN MEIÓTICA

La recombinación meiótica entre cromosomas homólogos es esencial para que se produzca una correcta segregación de los cromosomas durante la meiosis. Se inicia en el estadio de Zigotene pero no se visualiza hasta el estadio de Paquitene.

En leptotene se inicia la formación de las dobles roturas de cadena (Double Strand Breaks, DSB). Alrededor de los DSB aparecen complejos proteicos que contienen la maquinaria necesaria para modificar los extremos de ADN generados, preparándolos para la invasión de una cromátida homóloga. En Zigotene, se inicia la reparación de los DSB mediante la recombinación homóloga. Esto comporta la formación de dobles uniones tipo Holliday entre cromosomas homólogos (double Holliday junction) (Svetlanov and Cohen, 2004). En la mayoría de los casos, no se producirá intercambio de material genético, hecho conocido como fenómenos de conversión génica (non-crossover, NCO), mientras que una minoría generarán puntos de entrecruzamiento (crossover, CO) (Baudat and de Massy, 2007). Los quiasmas, que son las estructuras físicas que corresponden a los puntos de entrecruzamiento, mantienen unidos a los cromosomas homólogos hasta la anafase I. La distribución de estos puntos no se produce al azar, hay regiones genómicas que presentan una elevada frecuencia de recombinación y son conocidas como “puntos calientes” y otras, que raramente presentan eventos de recombinación, llamadas “puntos fríos”. Los centrómeros parecen ser puntos fríos, mientras que las regiones subtelo méricas se consideran puntos calientes. Diversos estudios en humanos describen que tiene que producirse un punto de recombinación en cada brazo del cromosoma, excepto en los brazos p de los cromosomas acrocéntricos, donde los entrecruzamientos se producen rara vez. Además, la presencia de un entrecruzamiento inhibe la formación de otro en una región cercana, fenómeno conocido como interferencia (Brown *et al.*, 2005; revisado por Lynn *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004a).

Se especula con la causa que determina la aparición de un punto de recombinación en un sitio en particular. Puede ser debido a una secuencia específica de ADN, a un set de

proteínas en concreto o quizá a la combinación de ambos factores (revisado por Lynn *et al.*, 2004).

Para el estudio de la recombinación meiótica se pueden utilizar anticuerpos frente a MutL protein homolog 1 (MLH1), proteína reparadora de ADN, que se co-localiza con los puntos de recombinación. Aplicando este método, diferentes grupos han descrito una variación en la frecuencia de MLH1 inter-individual (Lynn *et al.*, 2002; Hassold *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2005, 2006).

También se ha descrito que las tasas de recombinación varían significativamente entre sexos y que tienen un fuerte componente hereditario (Reynolds *et al.*; 2013; Gruhn *et al.*; 2013).

## 1.5. ESTUDIO DE ANOMALÍAS MEIÓTICAS EN VARONES INFÉRTILES

Entre el 2-17% de los varones infértiles que tienen cariotipo normal en sangre periférica presentan anomalías meióticas que pueden dar como resultado alteraciones cromosómicas restringidas a la línea germinal (Vendrell *et al.*, 1999; Egozcue *et al.*, 2000b).

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) ó las cromátidas hermanas (meiosis II) y generar espermatozoides portadores de alteraciones cromosómicas numéricas (aneuploides o diploides).

La anomalía meiótica más frecuente es la detención madurativa de la espermatogénesis. Se produce cuando la espermatogénesis se detiene en alguno de los estadios de maduración de la línea germinal (espermatogonia, espermatocito primario, espermatocito secundario ó espermátida). Se debe principalmente, al hecho de que existen puntos de control (“checkpoints”) a lo largo de la meiosis que regulan el proceso intentando eliminar las células germinales defectuosas para asegurar la formación de espermatozoides con la dotación cromosómica correcta. Como ya se ha mencionado, el

bloqueo puede ser parcial, afectando sólo a algunas de las líneas celulares germinales, cursando clínicamente con una oligozoospermia, o bien, un bloqueo completo afectando a todas las líneas celulares germinales, cursando clínicamente con una azoospermia.

En el 74% de los casos, los bloqueos meióticos están causados por defectos sinápticos, que hacen que disminuya el número de entrecruzamientos (quiasmas) entre cromosomas homólogos en la profase I. Los entrecruzamientos son necesarios para mantener la estabilidad de los bivalentes y su alineación en el plano ecuatorial del huso meiótico (revisado en Hassold and Hunt, 2001). Esto puede inducir a una segregación incorrecta en MI por una separación precoz de los cromosomas homólogos dando como resultado espermatoцитos secundarios con dotación cromosómica alterada (revisado por Egozcue *et al.*, 2005).

Se distinguen dos tipos de defectos sinápticos: la asinapsis, y la desinapsis. La asinapsis, ó error total de sinapsis, es un fenómeno poco frecuente que consiste en la ausencia total de apareamiento ó un apareamiento muy incompleto de los cromosomas homólogos en profase I. La desinapsis, ó 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, ó 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, produciéndose una entrada prematura a metafase I y anafase I, dando lugar a una separación precoz de bivalentes.

Existe un punto de control en el estadio de paquitene (Pachytene checkpoint) que 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 paquitenes I estos dos procesos no han finalizado correctamente, se detiene la división meiótica (Roeder and Bailis, 2000).

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, 1997).

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).

Otros mecanismos que pueden estar implicados en la segregación anómala de los cromosomas durante la meiosis, son los mecanismos de no disyunción meiótica producidos por un fallo en la resolución de los quiasmas o puntos de recombinación entre los cromosomas homólogos en anafase I dando lugar a una 'verdadera' no disyunción de los cromosomas homólogos en la meiosis I, donde 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.

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). 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).

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.

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 espermatocito primario puede progresar la meiosis sin dividirse y dar lugar a espermatocitos secundarios diploides, que culminarán en dos gametos diploides tras la segunda división meiótica (Egozcue *et al.*, 2000a; Vendrell *et al.*; 2005).

Estos espermatozoides pueden tener la capacidad de fecundar al ovocito generando embriones aneuploides y triploides, dando como resultado abortos y descendencia con recién nacidos vivos con anomalías (Eskenazi *et al.*; 2002; Blanco *et al.*; 1998).

## 1.6. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA MEIOSIS

El estudio de la meiosis masculina se puede abordar utilizando distintas aproximaciones, bien mediante análisis indirectos, como son los mapas de ligamiento, o estudios directos utilizando técnicas citogenéticas e inmunocitogenéticas.

Los mapas de ligamiento, también llamados mapas meióticos, consisten en el estudio del genotipo en familias examinando la herencia de pequeñas secuencias repetidas en tándem, polimorfismos, para detectar todos los eventos de recombinación por meiosis. Este tipo de estudios tienen una alta resolución, pero una de las desventajas es que se necesita estudiar al menos tres generaciones y que sólo se puede observar la mitad de los eventos de recombinación, ya que sólo dos de las cuatro cromátidas están implicadas en el proceso de intercambio (revisado por Lynn *et al.*, 2004).

Los estudios meióticos directos se basan en el análisis de las tres fases más representativas del proceso de meiosis: Profase I, Metafase I y Metafase II.

- Profase I. Su valoración permite determinar la presencia o no de anomalías de apareamiento de los autosomas (sinapsis) y del par de cromosomas sexuales (XY).
- Metafase I. Su análisis permite valorar las anomalías sinápticas, que se ponen de manifiesto por una baja frecuencia de quiasmas entre bivalentes, la presencia de univalentes y otras alteraciones del patrón esperado.
- Metafase II. Es una fase de corta duración y, por lo tanto, su número suele ser escaso. Aunque su valoración es compleja, permite determinar la presencia de asinapsis y aneuploidías.

En varones, se produce un espectro muy variado de células al mismo tiempo durante la espermatogénesis, por lo que del material obtenido de una biopsia de testículo se pueden analizar la profase I, metafase I y metafase II.

Técnicas utilizadas:

El **estudio de la meiosis clásico**, se basa en el estudio de células meióticas obtenidas tras biopsia testicular. Incluye el estudio de los cromosomas meióticos a nivel de paquitene, metafase I y metafase II. Para todo ello se utiliza el microscopio óptico y la tinción de Leishman (20%) según el protocolo de Evans. Este tipo de estudio permite detectar alteraciones a nivel de meiosis I y meiosis II, pero si se detecta alguna anomalía, no puede identificar a qué cromosoma corresponde, solamente informa del grupo cromosómico al que puede pertenecer por el tamaño. Además, se centra en el estudio de espermatoцитos primarios y secundarios, pero no permite estudiar el producto final de la meiosis, el espermatozoide.

**La técnica de M-FISH o Multiplex-FISH** combina los estudios de meiosis clásicos con la hibridación in situ fluorescente (FISH, del Inglés, Fluorescence in situ hybridization). Utiliza 24 librerías de ADN, cada una de ellas marcada con una combinación de fluorocromos diferentes, lo que permite la identificación de la totalidad de los cromosomas meióticos en metafase II, y la identificación individual de los bivalentes en metafase I y paquitene (Sarrate *et al.*, 2004). Hay que destacar su elevado coste y laboriosidad, lo que no permite que se pueda aplicar clínicamente de forma rutinaria. Sin embargo, a nivel de investigación, aplicada a los estudios en varones infértiles puede ayudar a identificar si en esta patología hay algún cromosoma en concreto que pueda verse más afectado, por lo que se podría realizar un estudio cromosómico más dirigido con posterioridad, a nivel de espermatozoide maduro en eyaculado o a nivel embrionario.

**La técnica de CenM-FISH ó FISH multicolor** (centromere-specific multicolour FISH technique). Combina, bien los estudios clásicos ó las técnicas inmunocitogenéticas, con la FISH. Esta técnica permite identificar todos los centrómeros utilizando sondas de ADN centroméricas alpha- satélite marcadas con diferentes fluorocromos. (Oliver-Bonet *et al.*, 2003).



## INTRODUCCIÓN

Los avances en **inmuncitogenética** se han aplicado también al estudio de la meiosis. Esta técnica se basa en la utilización de anticuerpos que detectan proteínas que forman parte del CS y proteínas implicadas en la recombinación. Permiten el estudio de la progresión meiótica, defectos en la sinapsis entre cromosomas homólogos y estudios de la tasa de recombinación meiótica. La mayor parte de los estudios utilizan las proteínas SYCP3, CREST y MLH1.

A continuación en la tabla I-1 se muestra una relación de proteínas implicadas en la meiosis.

**Tabla I-1:** Proteínas implicadas en la meiosis. A partir de Sanderson et al.; 2008 y Llano et al.; 2014.

Proteína	Función conocida	Estudios moleculares en animales	Estudios de infertilidad en humanos
<i>Spo11</i>	Formación de roturas de doble cadena de ADN.	En ratones nulos: apoptosis de espermatocitos antes de paquítene y apoptosis de ovocitos en estadio de diplotene.	Se han identificado 2 pacientes con azoospermia obstructiva con mutaciones de cambio de sentido en exones 1 y 9 y 16SNPs en regiones intrónicas de este gen.
<i>SMC1a</i>	Complejo cohesinas. Cohesión de cromátidas hermanas.	Ninguna.	Mutaciones asociadas al síndrome de Cornelia de Lange.
<i>SMC1β</i>	Complejo cohesinas. Cohesión de cromátidas hermanas específica de meiosis.	Machos y hembras de ratones nulos viables pero estériles con bloqueo meiótico en paquítene en machos y en metafase II en hembras.	Ninguno.
<i>SMC3</i>	Complejo cohesinas. Cohesión de cromátidas hermanas.	La reducción de su actividad en pez cebra y ratón conduce a un aumento de aneuploidías, inestabilidad genómica.	Ninguno.
<i>Rad21</i>	Complejo cohesinas. Cohesión de cromátidas hermanas.	Asociado a la activación del punto de control de ensamblaje del huso mitótico	Ninguno.
<i>Rec8</i>	Complejo cohesinas. Cohesión de cromátidas hermanas específica de meiosis.	Ratones knockout: conduce a la sinapsis de cromátidas hermanas y pérdida de focos de <i>MLH1</i> .	Ninguno.
<i>Stag3</i>	Cohesión de cromátidas hermanas. Específica de meiosis.	En hembras de ratón <i>Stag3</i> deficientes se observa disgenesia ovárica, en machos <i>Stag</i> <sup>-/-</sup> ausencia de espermatozoides y talla reducida de los testículos.	Fallo ovárico precoz en mujeres con la mutación del gen en homocigosis.
<i>SMC2</i>	Complejo Condensina. Condensación de los cromosomas.	Knockdown en <i>C.elegans</i> : origina uniones de cromosomas en anafase en mitosis.	Ninguno.
<i>SMC4</i>	Complejo Condensina. Condensación de los cromosomas.	Knockdown en <i>C.elegans</i> : origina uniones de cromosomas en anafase en mitosis.	Ninguno.

## INTRODUCCIÓN

Proteína	Función conocida	Estudios moleculares en animales	Estudios infertilidad en humanos
<u>SYCP3</u>	Elementos laterales del CS necesarios para la sinapsis de los cromosomas homólogos.	En ratones knockout, en macho: bloqueo meiótico en zigotene, en ovocitos: mayor tasa de aneuploidías.	Deleciones en 1 par de bases → proteína truncada C-terminal. Se observó ausencia de expresión de SCP3 en el 43% de los varones con azoospermia.
<u>SYCP2</u>	Elementos laterales del CS necesarios para la sinapsis de los cromosomas homólogos.	En ratones knockout: bloqueo meiótico en zigotene en machos. Hembras subfértiles comparadas con el genotipo salvaje.	Ninguno.
<u>SYCP1</u>	Elementos centrales del CS necesarios para la sinapsis de los cromosomas homólogos.	En ratones knockout: infertilidad en hembras y machos. Persistencia de doble rotura de cadena (DRC) e incapacidad para completar sinapsis.	Ninguno.
<u>Rad51</u>	Estabilidad genómica. Fase de invasión en la recombinación entre homólogos.	En ratones knockout causa muerte embrionaria temprana.	Ninguno.
<u>Dmc1</u>	Específica de meiosis. Fase de invasión en la recombinación entre homólogos.	En ratones knockout: bloqueo meiótico y apoptosis en zigotene/paquitene en machos y durante paquitene en hembras	Ninguno.
<u>Rad54</u>	Implicada en búsqueda de homología en la fase de invasión. Estabiliza filamento de cadena simple de <i>Rad51</i> .	En ratones: reducción de la recombinación pero fértiles.	Mutaciones y splicing aberrante asociado con varios cánceres primarios.
<u>MSH4</u>	<i>MutS Homolog</i> . Se une a lo largo con <i>MSH5</i> para duplicar <i>Holliday Junctions</i> . Expresado exclusivamente en células meióticas.	En ratones knockout pérdida de recombinación e infertilidad en machos y hembras.	Ninguno.
<u>MSH5</u>	<i>MutS Homolog</i> . Se une a lo largo con <i>MSH4</i> para duplicar <i>Holliday Junctions</i> .	En ratones knockout conlleva formación aberrante del CS e infertilidad en machos y hembras.	Expresión de una variante en carcinomas de mama y de pulmón.
<u>MLH3</u>	MutL Homolog. Colocaliza, junto con <i>MLH1</i> , con los puntos de recombinación después de <i>MSH4/MSH5</i> .	En ratones knockout machos: pérdida de quiasmas durante paquitene y son estériles. En hembras, fallo completo de meiosis I y son estériles.	Mutaciones asociadas a Síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis.
<u>MLH1</u>	MutL Homolog. Colocaliza, junto con <i>MLH3</i> , con los puntos de entrecruzamiento.	En ratones knockout produce bloqueo meiótico. El desarrollo de los ovocitos falla después de la meiosis I.	Mutaciones asociadas a Síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis.

## 1.7. ESTUDIO DE ANEUPLOIDIAS EN ESPERMATOZOIDES

El uso de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) ha mejorado significativamente el pronóstico de embarazo en parejas infértiles con oligozoospermia severa (Palermo *et al.*, 1992; Van Steirteghem *et al.*, 1993) y con azoospermia. En este último caso utilizando espermatozoides obtenidos mediante aspiración de epidídimo (Tournaye *et al.*, 1994) o bien mediante biopsia testicular (Devroey *et al.*, 1995; Gil-Salom *et al.*, 1995, 1996, 2000). El uso del ICSI supone un salto de las barreras naturales a la hora de seleccionar espermatozoides. El diagnóstico prenatal en estas parejas muestra un incremento significativo de anomalías cromosómicas “de novo” para los cromosomas sexuales que tienen que ver más con la calidad espermática, que con la técnica en sí (Bonduelle *et al.*, 2002; Van Steirteghem *et al.*, 2002; Mesvhede *et al.*, 1998; Van Opstal *et al.*, 1997). Este hecho pone de manifiesto la importancia de la evaluación genética de los varones candidatos a ICSI.

Los primeros estudios cromosómicos en espermatozoides se desarrollaron en 1970, con la tinción diferencial de regiones concretas de los cromosomas (Barlow and Vosa., 1970; Pearson and Bobrow., 1970). Estos trabajos reportaban un 1,4% de espermatozoides con aneuploidías para los cromosomas sexuales. Otros autores publicaron una frecuencia de aneuploidias individual del 2% y global del 38% (Pawlowitzki and Pearson., 1972). Sin embargo, más tarde, se demostró que este método no era específico y sobrediagnosticaba aneuploidías.

En la década de los 1990 se desarrollaron los primeros estudios mediante FISH ofreciendo en humanos un método de detección de aneuploidías en espermatozoides rápido y fácil (revisado por Martin, 2008). La principal ventaja de esta técnica es que se pueden analizar un número elevado de espermatozoides en una misma muestra (revisado por Carrell, 2008). La desventaja que presenta, es que no se pueden analizar todos los cromosomas a la vez en un mismo espermatozoide debido al tamaño de la cabeza de éste, ya que se solaparían las señales y sería imposible evaluarlas correctamente. Por eso, el FISH generalmente analiza 5 cromosomas: 13, 18, 21, X e Y, por

ser estos los implicados en gestaciones que potencialmente dan lugar a recién nacidos vivos con síndromes (Síndrome de Patau, Síndrome de Edwards, Síndrome de Down, Síndrome de Turner, Síndrome de Klinefelter y Síndromes de 47,XXX ó 47,XYY).

Los estudios de FISH de espermatozoides revelan un incremento significativo de la incidencia de anomalías cromosómicas en varones infértiles, principalmente para los cromosomas sexuales y especialmente, en pacientes con oligoastenoteratozoospermia (OAT) (Moosani *et al.*, 1995; Bernardini *et al.*, 1998, 2000; Arán *et al.*, 1999; Colombero *et al.*, 1999; Pang *et al.*, 1999; Pfeffer *et al.*, 1999; Nishikawa *et al.*, 2000; Ushijima *et al.*, 2000; Vegetti *et al.*, 2000; Calogero *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2003 a,b).

Se ha observado que el mayor incremento en las tasas de aneuploidías es en varones con una concentración  $< 1 \times 10^6$  espermatozoides/ml (oligozoospermia severa), entre los que un 31,4% de ellos presentan un FISH de espermatozoides alterado (Rubio *et al.*, 2001; Tesis doctoral Lorena Rodrigo, 2013).

Hay estudios que señalan la existencia de un incremento de anomalías cromosómicas en muestras obtenidas a partir de biopsias de testículo procedentes de pacientes con azoospermia obstructiva y azoospermia secretora al compararlos con muestras de espermatozoides procedentes de eyaculado de donantes fértiles normozoospermicos (Rodrigo *et al.*, 2004; Bernardini *et al.*; 2000; Levron *et al.*, 2001; Burrello *et al.*, 2002; Mateizel *et al.*, 2002; Palermo *et al.*, 2002; Rodrigo *et al.*, 2011). Siendo el incremento de aneuploidías y diploidías mayor en el grupo de azoospermia secretora. Otros autores por el contrario no encuentran diferencias estadísticamente significativas entre espermatozoides procedentes de eyaculado y procedentes de testículo (Martin *et al.*; 2003c; Viville *et al.*, 2000).

## 2. OBJETIVOS



## 2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de la presente tesis doctoral fue estudiar las diferencias en el proceso de la meiosis entre varones de fertilidad probada y varones infértiles con azoospermia secretora idiopática, diferenciando dentro de este grupo aquellos que inicialmente fueron criptozoospermicos y evolucionaron a azoospermicos.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la frecuencia media de recombinación meiótica en el grupo de estudio y el grupo control formado por varones fértiles post-vasectomizados.
2. Analizar la frecuencia de recombinación específica por cromosoma en el grupo de estudio y el grupo control.
3. Evaluar las diferencias en la progresión meiótica entre pacientes con azoospermia secretora y el grupo control.
4. Comparar las longitudes medias de la longitud total de los complejos sinaptonémicos en cada uno de los grupos y valorar su posible relación con los niveles de recombinación.
5. Establecer la incidencia de disomías y diploidías para los cromosomas analizados.
6. Correlacionar el efecto de la disminución en la recombinación con la incidencia de disomías y diploidías en espermatozoides testiculares.





### 3. DISEÑO EXPERIMENTAL



### **3.1. HIPÓTESIS**

Los varones con infertilidad masculina idiopática, sobre todo aquellos con azoospermia secretora, presentan una elevada incidencia de aneuploidías en los espermatozoides. Este incremento de aneuploidías podría estar relacionado con una disminución en la recombinación meiótica entre cromosomas homólogos.

### **3.2. DISEÑO**

Se ha realizado un estudio prospectivo de cohortes. Se realizó una selección controlada de pacientes azoospermicos que se distribuyeron en función de si la azoospermia era obstructiva post-vasectomía o si era secretora. Dentro de las azoospermias secretoras se segregó un grupo de pacientes que ocasionalmente presentaron espermatozoides en eyaculado, y este grupo se denominó como grupo de pacientes criptoazoospermicos.

### **3.3. LUGAR DE EJECUCIÓN**

El presente trabajo de tesis doctoral se ha realizado en las instalaciones del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). Clínica IVI-Valencia, y en las instalaciones de Igenomix SL.(España).

El comité de Proyectos de Investigación Clínica y el Comité ético del IVI aprobaron el estudio antes de ser iniciado (véase anexo I).

Fue dado de alta en la base de datos de ensayos clínicos ClinicalTrials.gov (<http://clinicaltrials.gov>).El número de registro asignado fue NCT02339272.

El estudio ha sido parcialmente financiado por el Instituto de Pequeña y Mediana Industria Valenciana mediante la concesión de dos becas con número de expediente IMDTZ/20087106 y IMDTG/2008/25, y por el Ministerio de Sanidad con una beca FIS con nº de expediente: PS09/01725.



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS



## 4.1. MUESTRAS ANALIZADAS

En el presente estudio se utilizó tejido testicular procedente de biopsias realizadas a pacientes infértiles para la obtención y congelación de espermatozoides previos a un ciclo de inyección intracitoplasmática (ICSI).

La biopsia de testículo se llevó a cabo realizando una incisión 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 un placa Petri con medio de cultivo para espermatozoides.

Tras el aislamiento y congelación de los espermatozoides obtenidos, el resto de tejido testicular, que en condiciones normales se desecha, se utilizó por un lado para obtener las células meióticas, y por otro lado, para recuperar espermatozoides testiculares remanentes en la suspensión celular. Todo ello con previo consentimiento informado de los pacientes (ver Anexo I y II).

### 4.1.1. Grupo control: varones con azoospermia obstructiva post- vasectomía (AO)

Se incluyeron en este grupo un total de 10 varones con edad media de  $47,10 \pm 6,93$  años que se sometieron a una vasectomía y tras una media de  $13,60 \pm 6,15$  años presentaron deseo genésico. A estos varones no se les realizó el cariotipo, ni estudio de microdeleciones del cromosoma Y, ni determinaciones hormonales, ya que presentaban fertilidad probada con una media de  $2 \pm 0,94$  hijos previos y acudieron a la clínica para subsanar el hecho de haberse realizado una vasectomía (ver tabla M-1).

### 4.1.2. Grupos de estudio

#### 4.1.2.1. Varones con azoospermia secretora de origen idiopático (AS)

Inicialmente se obtuvo consentimiento y muestras de un total de 53 varones, en dos de las cuales la calidad de la muestra recibida no permitió realizar ningún tipo de estudio (AS-6 y AS-36). En los 51 pacientes restantes la edad media fue de  $35,60 \pm 5,49$  años, todos ellos presentaron cariotipo normal y estudio de microdeleciones del cromosoma Y



negativo. En todo ellos se realizaron determinaciones hormonales de hormona foliculo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), testosterona libre (T) y prolactina (PR) (ver tabla M-2).

Tras el estudio de anatomía patológica se concluyó que 26 de los 51 pacientes de este grupo no tenían células meióticas y otros dos presentaron detención de la maduración en leptotene (AS-12) y zygotene (AS-16). De los 26 varones con ausencia de células meióticas, el examen de anatomía patológica de 23, los clasificó como síndrome de sólo Sertoli, que se caracteriza por túbulos seminíferos con ausencia de epitelio germinal y sólo presencia de células de Sertoli. La anatomía patológica de los 3 varones restantes confirmó ausencia de línea germinal en el caso de AS-40, hiperplasia de células de Leydig en el caso de AS-11, hipoespermatogénesis asociada a descamación de espermatoцитos primarios en el caso del paciente AS-32 e hialinización tubular en AS-46 (ver tabla M-2).

Así pues, del total de 51 pacientes de los que se obtuvieron muestras inicialmente, sólo se consideraron como grupo de estudio 23 pacientes, en los cuales se pudieron completar los estudios correspondientes en espermatoцитos primarios y espermatozoides, objeto de la presente tesis doctoral. En dos de estos pacientes (AS-20 y AS-49) no se realizó estudio de la anatomía patológica, pero se encontraron espermatoцитos primarios para los estudios inmucitogenéticos. En 19 pacientes se informó de espermatogénesis conservada en algún área tubular con o sin hialinización. Y en los dos pacientes restantes (AS-2 y AS-52), la anatomía patológica mostró un bloqueo a nivel de espermatoцитo primario lo que explica que sólo se pudieran analizar 12 y 15 células para la progresión meiótica respectivamente (ver tabla M-2).

#### **4.1.2.2. Varones con criptozoospermia (Cripto)**

Se incluyeron en este grupo un total de 5 varones, con una edad media de  $35,2 \pm 2,38$  años. Estos varones, en tratamientos reproductivos anteriores habían sido diagnosticados como criptozoospermicos, pero en el momento del tratamiento asociado al estudio fueron diagnosticados como varones con azoospermia secretora, por lo que también se les realizó biopsia testicular con objeto de recuperar espermatozoides para su tratamiento

reproductivo. Todos ellos con cariotipo normal y estudio de microdeleciones del cromosoma Y negativo. En todos ellos se realizaron determinaciones hormonales de FSH, LH, T y PR (ver tabla M-3).

Los valores séricos hormonales de referencia en varones adultos que se utilizaron fueron:

- Hormona folículo estimulante (FSH): 1 - 8 mUI/ml
- Hormona luteinizante (LH): 2 - 12 mUI/ml
- Testosterona (T): 9,5 - 33,7 nmol/L
- Prolactina (PR): 2 - 18 ng/ml

**Tabla M-1:** Descriptiva grupo control (AO: Azoospermia Obstruccion post-vasectomía)

	Edad(Años)	Tiempo post-vasectomía (Años)	Nº hijos previos
AO-16	42	14	2
AO-19	46	4	1
AO-22	45	8	1
AO-23	47	15	2
AO-24	53	18	2
AO-25	45	20	2
AO-26	50	16	3
AO-31	40	12	4
AO-32	63	23	2
AO-34	40	6	1
<b>MEDIA ± DS</b>	<b>47,10 ± 6,93</b>	<b>13,60 ± 6,15</b>	<b>2,00 ± 0,94</b>

MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla M-2.** Tabla descriptiva grupo de estudio: pacientes con azoospermia secretora de origen idiopático (AS). Los códigos de pacientes en **negrita** señalan a aquellos pacientes en los que se pudieron completar todos los estudios

Código	Edad (años)	FSH (mUI/ml)	LH (mUI/ml)	T (nmol/L)	PR (ng/ml)	Cariotipo	Microdeleciones cromosoma Y	Diagnóstico Anatomopatológico
<b>AS-1</b>	33	9,4	4,1	5,1	-	46,XY	Normal	90% túbulos seminíferos solo células Sertoli, 10% descamación de espermatocitos de 1 <sup>er</sup> orden.
<b>AS-2</b>	36	2,0	0,2	27,0	47,7	46,XY	Normal	90% túbulos seminíferos solo células Sertoli, 10% descamación de espermatocitos de 1 <sup>er</sup> orden.
AS-3	29	10,0	5,7	3,4	28,0	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
AS-4	42	16,0	-	2,8	-	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
AS-5	35	26,4	11,5	4,1	13,8	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
AS-7	28	23,7	8,8	1,9	-	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
AS-8	31	52,0	15,3	1,3	21,9	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli .
AS-9	32	12,0	5,4	29,7	-	46,XY	Normal	Hipoespermatogénesis con descamación de espermatocitos de 1 <sup>er</sup> orden.
AS-10	26	16,4	5,4	4,6	-	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
AS-11	31	24,3	14,3	2,9	5,3	46,XY	Normal	Hialinización tubular. Hiperplasia de células de Leydig.
AS-12	34	3,0	-	17,3	-	46,XY	Normal	Hipoespermatogénesis con descamación de espermatocitos de 1 <sup>er</sup> orden.
<b>AS-13</b>	36	4,4	-	3,5	-	46,XY	Normal	Hipoespermatogénesis con descamación de espermatocitos de 1 <sup>er</sup> orden.
AS-14	37	30,0	7,2	5,7	-	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
AS-15	31	34,3	-	224,0	7,3	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
AS-16	36	29	7,0	17,3	13	46,XY	Normal	Hipoespermatogénesis con descamación de espermatocitos de 1 <sup>er</sup> orden.
AS-17	34	8,9	6,5	2,4	21,5	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
AS-18	32 39	-	-	-	-	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
<b>AS-19</b>	36	23,0	5,8	4,6	-	46,XY	Normal	Hipoespermatogénesis con descamación de espermatocitos de 1er orden.

Código	Edad (años)	FSH (mUI/ml)	LH (mUI/ml)	T (nmol/L)	PR (ng/ml)	Cariotipo	Microdeleciones cromosoma Y	Diagnóstico Anatomopatológico
AS-20	31	39,9	12,3	4,6	-	46,XY	Normal	No informe de anatomía patológica.
AS-21	39	25,0	-	511,0	-	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
AS-22	46	35,2	14,1	0,9	8,9	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli. Hialinización tubular.
AS-23	30	28,1	4,6	4,6	6,6	46,XY	Normal	90% túbulos seminíferos solo células Sertoli, 10% descamación de espermatoцитos de 1 <sup>er</sup> orden.
AS-24	33	6,91	8,1	8,4	17,0	46,XY	Normal	Hipoespermatogénesis asociada a descamación de espermatoцитos de 1 <sup>er</sup> orden
AS-25	31	40,6	6,3	-	-	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
AS-26	38	21,3	-	-	-	46,XY	Normal	Hialinización tubular.
AS-27	42	7,0	4,6	375,0	19,3	46,XY	Normal	Hipoespermatogénesis asociada a descamación de espermatoцитos de 1 <sup>er</sup> orden.
AS-28	35	-	-	-	-	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli. Atrofia y pseudohiperplasia de células de Leydig.
AS-29	30	13,5	3,6	3,0	-	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
AS-30	48	22,8	9,4	2,7	-	46,XY	Normal	Hialinización tubular.
AS-31	32	5,4	6,2	-	-	46,XY	Normal	Hipoespermatogénesis asociada a descamación de espermatoцитos de 1 <sup>er</sup> orden.
AS-32	39	31,0	7,4	3,9	-	46,XY	Normal	Hipoespermatogénesis asociada a descamación de espermatoцитos de 1 <sup>er</sup> orden.
AS-33	45	30,7	8,6	5,8	-	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
AS-34	33	7,0	3,5	3,2	-	46,XY	Normal	Hipoplasia ligera de células germinales con áreas de espermatogénesis completa.
AS-35	33	11,0	-	15	-	46,XY	Normal	Hipoespermatogénesis asociada a descamación de espermatoцитos de 1 <sup>er</sup> orden.

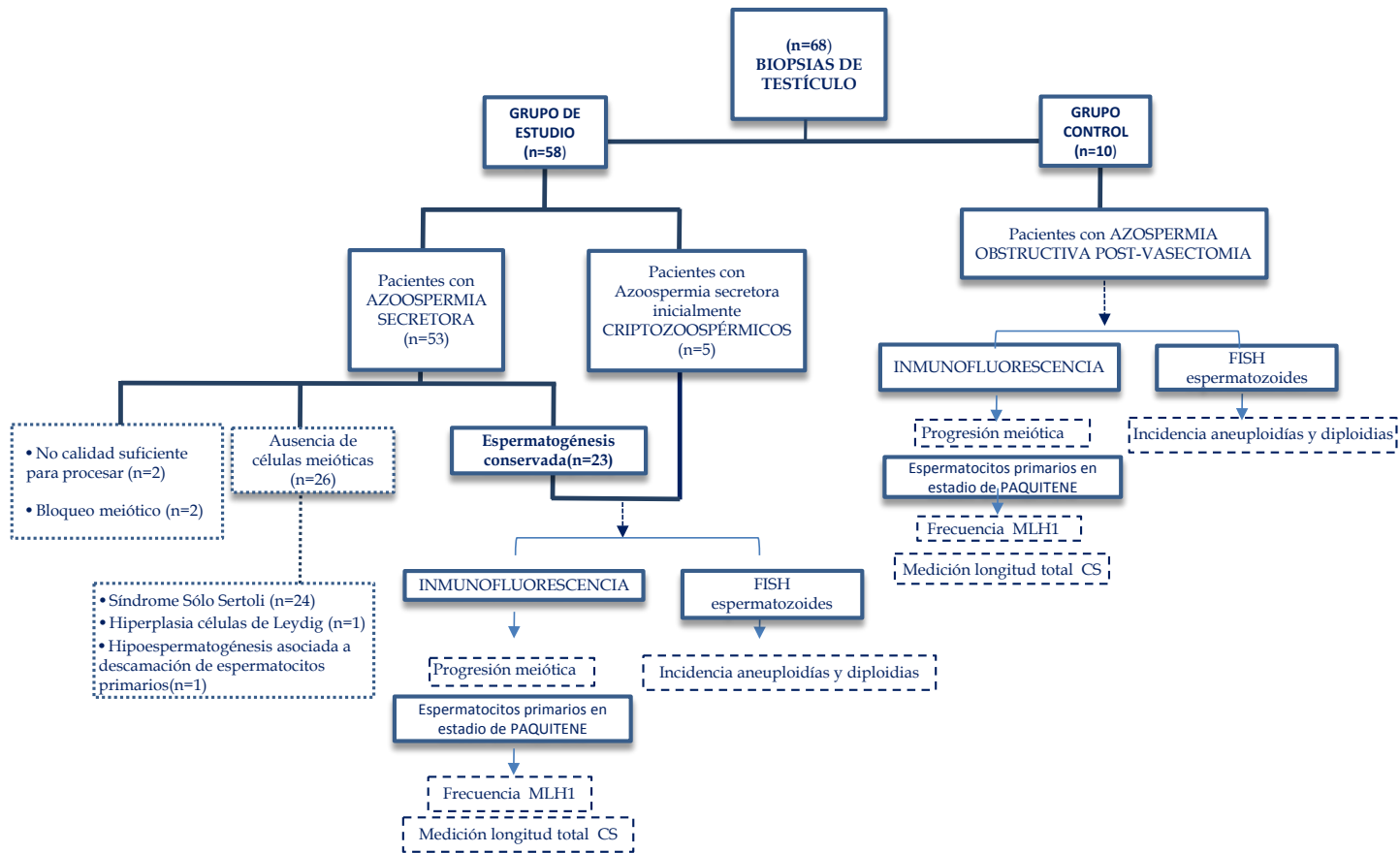
MATERIAL Y MÉTODOS

Código	Edad (años)	FSH (mUI/ml)	LH (mUI/ml)	T (nmol/L)	PR (ng/ml)	Cariotipo	Microdeleciones cromosoma Y	Diagnóstico Anatomopatológico
AS-37	42	10,9	3,1	3,4	6,5	46,XY	Normal	Hipoespermatogénesis asociada a descamación de espermatoцитos de 1 <sup>er</sup> orden.
AS-38	28	10,8	3,3	2,3	6,7	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
AS-39	38	8,9	5,2	14,5	9,2	46XY	Normal	Hipoespermatogénesis asociada a descamación de espermatoцитos de primer orden.
AS-40	35	61,0	-	1,4	-	46,XY	Normal	Ausencia completa de línea germinal .Hialinización tubular. El intersticio muestra Hiperplasia células de Leydig.
AS-41	33	21,1	6,9	6,1	14,5	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli
AS-42	37	16,5	5,6	2,5	17,6	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli. Hialinización tubular.
AS-43	35	17,4	3,3	3,5	0,9	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
AS-44	36	3,2	2,3	3,8	-	46,XY	Normal	Espermatogénesis completa con desorganización de la línea germinal.
AS-45	35	1,1	1,7	7,1	5,6	46,XY	Normal	Hialinización tubular.
AS-46	30	10,2	3,1	-	6,7	46,XY	Normal	Hialinización tubular.
AS-47	34	22,3	8,0	2,4	-	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
AS-48	44	4,5	3,4	7,3	-	46,XY	Normal	Hipoplasia moderada de células germinales.
AS-49	51	4,9	2,5	4,5	-	46,XY	Normal	No informe de anatomía patológica.
AS-50	31	12,1	6,3	4,4	-	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.
AS-51	33	9,40	4,1	5,1	-	46,XY	Normal	90% túbulos seminíferos solo células Sertoli 10% descamación de espermatoцитos de 1 <sup>er</sup> orden.
AS-52	36	2,0	0,2	27,0	47,7	46,XY	Normal	90% túbulos seminíferos solo células Sertoli, 10% descamación de espermatoцитos de 1 <sup>er</sup> orden.
AS-53	29	10,0	5,7	3,4	28,0	46,XY	Normal	Síndrome de Sólo células de Sertoli.

**Tabla M-3:** *Tabla descriptiva de pacientes que inicialmente fueron criptozoospermicos y posteriormente cursaron con azoospermia secretora*

Código	Edad (años)	FSH (mUI/ml)	LH (mUI/ml)	T (nmol/L)	PR (ng/ml)	Cariotipo	Microdeleciones cromosoma Y	Diagnóstico Anatomopatológico
<b>Cripto-1</b>	34	2,8	3,4	6,1	-	46,XY	Normal	Hipoespermatogénesis asociada a descamación de espermatoцитos de 1 <sup>er</sup> orden.
<b>Cripto-2</b>	37	14,9	6,7	4,4	-	46,XY	Normal	Hipoespermatogénesis asociada a descamación de espermatoцитos de 1 <sup>er</sup> orden.
<b>Cripto-3</b>	32	8,2	10,3	4,5	14,5	46,XY	Normal	No informe de anatomía patológica.
<b>Cripto-4</b>	38	11,4	6,9	4,7	13,0	46,XY	Normal	Hipoespermatogénesis asociada a descamación de espermatoцитos de primer orden.
<b>Cripto-5</b>	35	16,8	5,8	5,7	11,2	46,XY	Normal	90% túbulos seminíferos solo células Sertoli, 10% espermatoцитos de 1 <sup>er</sup> orden. Hiperplasia de células de Leydig.

Figura M-1: Diseño del protocolo de trabajo del estudio



## 4.2. INMUNOFLUORESCENCIA

La técnica de inmunofluorescencia se basa en la utilización de anticuerpos específicos frente a determinadas proteínas presentes en una muestra para su visualización en un microscopio de epifluorescencia. Los anticuerpos frente a la proteína de interés (anticuerpos primarios) pueden estar directamente marcados con fluorocromos de un determinado color, aunque la aproximación más extendida se basa en la detección del anticuerpo primario no marcado mediante la utilización de otros anticuerpos marcados con fluorocromos (anticuerpos secundarios).

Para la fijación de las figuras meióticas procedentes de muestras de tejido testicular y para la inmunotinción de las mismas se aplicaron los protocolos que se describen a continuación (ver figura M-2).

### 4.2.1. Protocolo de fijación de células meióticas de testículo

SOLUCIONES
<p>- <b>Solución hiposmótica:</b> 500µl de tampón TRIS clorhidrato (600mM)(Roche, Mainnheim, Alemania) 1ml sacarosa (500mM) (Sigma-Aldrich, Steinnheim, Alemania) , 1ml de ácido cítrico (170 mM) (Sigma-Aldrich), 100 µl de ácido etilén diamín tetracético (EDTA) (Sigma-Aldrich), 25 µl Ditiotreitól 1 M (DTT)* (Roche), 50 µl de PMSF* (del inglés, phenylmethylsulfonyl fluoride)(100mM)(Sigma-Aldrich) ,7,3 ml de agua destilada*. Ajustar el PH a 8,2-8,4.</p> <p><i>*añadir como máximo una hora antes de usar la solución.</i></p> <p>- <b>Solución de fijación:</b> 0,25g de paraformaldehído (PFA) 1% (Sigma-Aldrich), 40ml de agua destilada, 0,5 ml NaOH (1N) (Sigma-Aldrich). Incubar a 37°C-60°C para disolverlo durante 20 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Ajustar el PH a 9,2 con ácido bórico (50 mM) (Sigma-Aldrich) . Añadir 50 µl de Triton X-100 (Sigma-Aldrich).</p> <p>- <b>Solución de sacarosa:</b> 200 µl de sacarosa (500 mM) (Sigma-Aldrich), 800 µl de agua destilada.</p>

- Colocar la muestra de tejido testicular en un vidrio de reloj con 2 ml de solución hiposmótica durante 65 minutos a temperatura ambiente, exponiendo los túbulos seminíferos al medio hiposmótico.
- Colocar el tejido en un portaobjetos y dilacerar el tejido con las pinzas en una gota de 30 µl de la solución de sacarosa.



- Aspirar 10 µl de la solución y depositarla en el extremo de un portaobjetos (Superfrost Cole-Parmer, USA) con paraformaldehído al 1% (PFA). Extender a lo largo y a lo ancho del portaobjetos en zig - zag hasta que desaparezca.
- Colocar el portaobjetos rápidamente en una cámara humedad a 37°Cy dejarlo durante 12 horas.

#### 4.2.2. Protocolo de inmunotinción

<p><b>SOLUCIONES</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Solución de deshidratación:</b> 200 µl de Photoflo (Kodak, Alemania), 500 ml de agua destilada.</li> <li>- <b>Solución de 10x ADB:</b> 2,5 ml de Donkey Serum (Sigma-Aldrich), 12,5 µl de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 0,75 g de Albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) , 22,5 ml de 1x buffer fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich) . Filtrar con filtros de poro de 0,45µm de diámetro (Millex HA Filters-Millipore, Irlanda). Añadir 250 µl de Azida sódica (Sigma-Aldrich).</li> <li>- <b>Solución de 1x ADB:</b> 5 ml de ADB 10x, 45 ml de PBS.</li> </ul>
<p><b>ANTICUERPOS MONOCLONALES</b></p>
<p><b>PRIMARIOS</b></p> <p><b>MLH1</b> (proteína de reparación del DNA MutL homolog1): Anti - MLH1 purificado procedente de ratón (BD Pharmingen, San Diego, USA).  <b>CREST:</b> Proteína Humana anti-centrómero (Fisher, USA).  <b>SYCP3:</b> Antisera purificada procedente de ratón (Novus Biologicals, Littleton, USA).</p>
<p><b>SECUNDARIOS</b></p> <p>Para MLH1- <b>FDAM</b> (antiratón)(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore, USA).          Para CREST - <b>ADAH</b> (antihumano) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.).          Para SYCP3- <b>RDAR</b> (anticonejo) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.).</p>

#### Día 1

- Retirar los portaobjetos de la cámara de humedad y secar a temperatura ambiente.
- Sumergirlos portaobjetos durante 2 minutos en la solución de deshidratación (Photoflo).
- Dejar secar los portaobjetos totalmente a temperatura ambiente.
- Sumergir los portaobjetos en una solución de 1 x ADB (del inglés, Antibody Dilution Buffer) durante 45 minutos.

- Diluir los anticuerpos MLH1 y CREST con 1 x ADB en proporción 1:75 y 1:1000 respectivamente.
- Colocar 70 µl de la dilución de los anticuerpos repartiéndolos por el portaobjetos y cubrir con cubreobjetos de 24 x 50 mm.
- Incubar un mínimo de 8 horas a 37°C en una cámara de humedad.

### *Día 2*

- Sumergirlos portaobjetos en una solución de 1xADB para retirar los cubreobjetos.
- Añadir 70 µl de anticuerpo SYCP3 (dilución 1:75 en 1xADB).
- Cubrir con parafilm (Sigma-Aldrich) e incubar a 37°C en una cámara de humedad durante 2 horas y media.
- Retirar el parafilm y realizar dos lavados de 20 minutos en 1xADB en agitación.
- Añadir 70 µl de anticuerpos secundarios para MLH1 (FDAM) y para el CREST (ADAH) en proporción 1:75 y 1:100 respectivamente y cubrir con cubreobjetos de 24x50 mm (Marinfield, Alemania).
- Incubar durante toda la noche a 37°C en una cámara de humedad.

### *Día 3*

- Retirar los cubreobjetos en una solución de 1xADB
- Añadir 70 µl de anticuerpo secundario para SCP3 (RDAR) en proporción 1:100 y cubrir con parafilm a modo de cubreobjetos.
- Incubar en una cámara de humedad a 37°C durante 1 hora.
- Retirar los cubreobjetos de parafilm sumergiendo los portaobjetos en una solución de 1xPBS.
- Realizar dos lavados de 10 minutos en 1xPBS.
- Añadir antifade (Biorad, USA) y colocar un cubreobjetos de 24x50 mm.
- Eliminar el exceso de antifade.
- Sellar con cola y almacenar a 4°C.

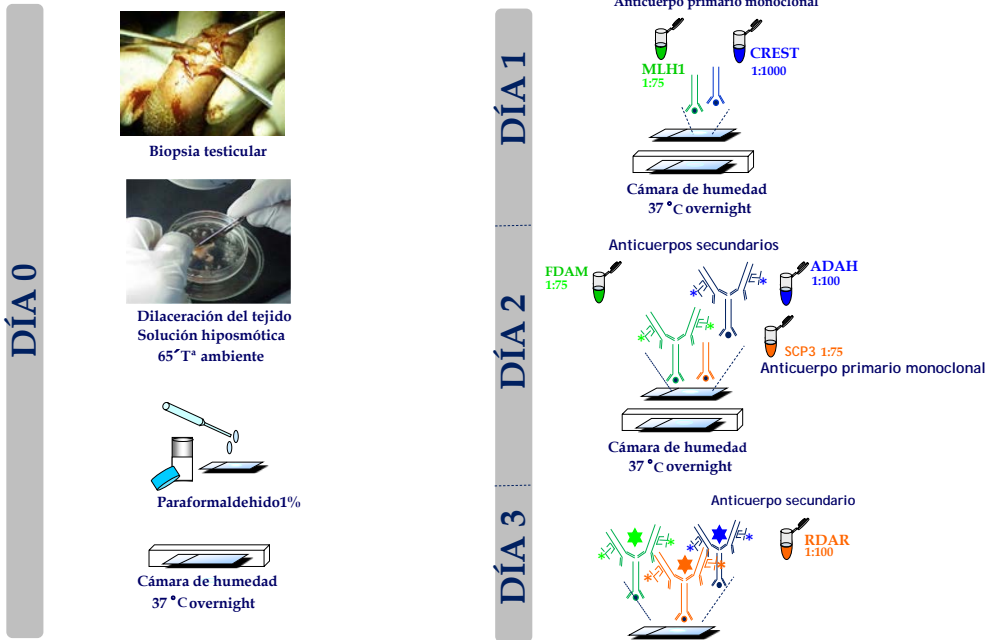


Figura M-2: Esquema del proceso de fijación e inmunofluorescencia de las células meióticas obtenidas a partir del tejido testicular.

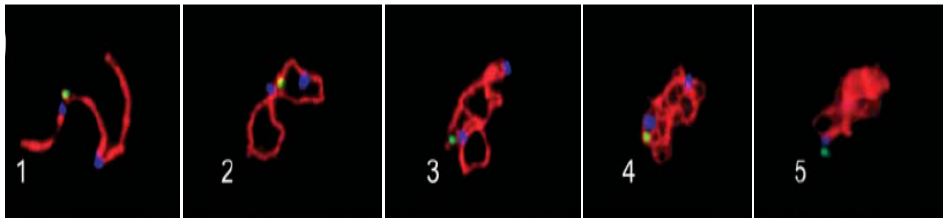
### 4.2.3. Descripción de las variables analizadas

- **Análisis de la progresión meiótica**

Se analizaron una media de 100 células meióticas por paciente. Se seleccionaron las células localizadas en el centro del campo con objetivo de 40X y se analizaron con el objetivo 100X. Cuando se encontraron grupos de células en un campo, con límites claros entre ellas, sólo se capturó y analizó la célula localizada en el centro del campo. Las imágenes se capturaron con el microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Imager Z.1 dotado de cámara AxioCam MRm, y AxioVision como software de procesamiento de imagen digital.

Las células meióticas se clasificaron según sus características en los distintos estadios de la Profase I de la meiosis: Leptotene, Zigotene, Paquitene y Diplotene.

Según la morfología de la vesícula sexual (XY) durante el estadio de paquitene, se diferenció entre paquitene temprano y paquitene tardío siguiendo los criterios de Codina-Pascual, 2005. (Ver Figura M-3)



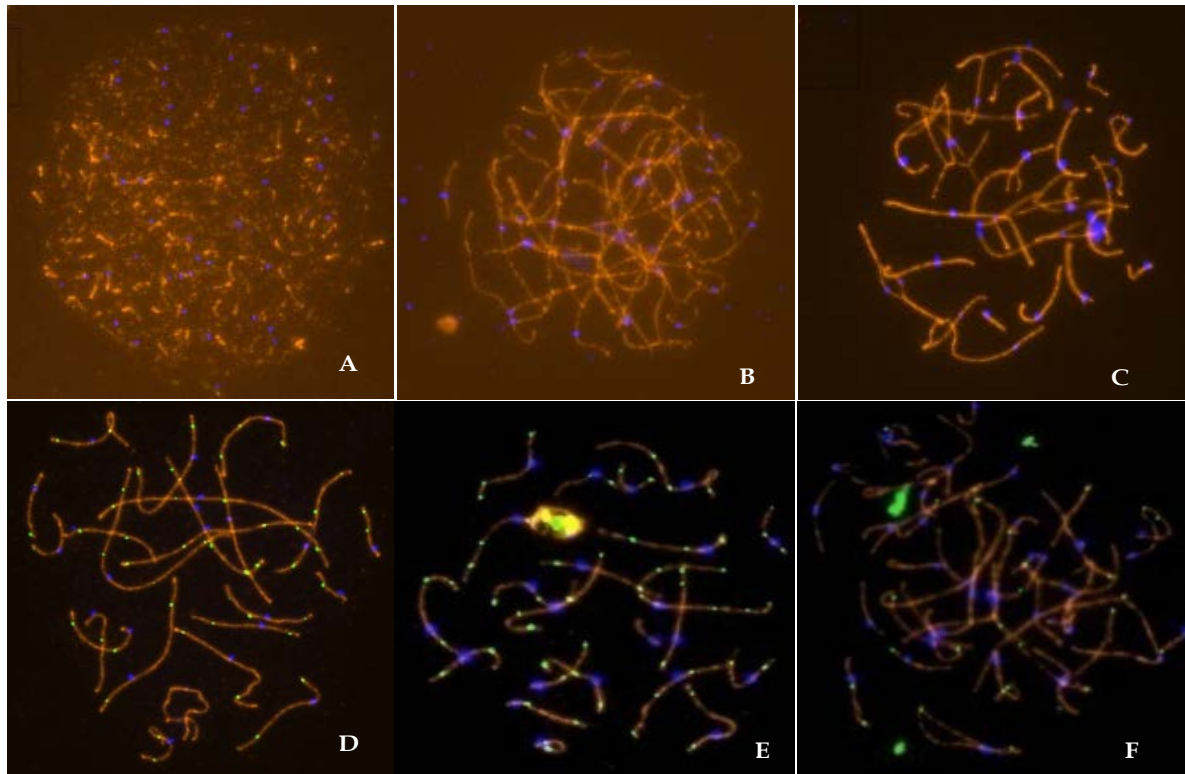
*Figura M-3: Morfología de la vesícula sexual de espermatoцитos primarios en estadio de paquitene. Imágenes 1-2 corresponden a un espermatoцитo primario en estadio de paquitene temprano. Imágenes 3-5 corresponden a un espermatoцитo primario en estadio de paquitene tardío. Imagen modificada de Codina-Pascual, 2005.*

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se estimó el porcentaje de células en cada uno de los estadios de la profase I para cada individuo, y se comparó el grupo de estudio con el grupo control utilizando como test estadístico Chi-cuadrado ( $p < 0,05$ ).

Para el análisis se utilizó el programa Graphpad Instat v.2.05a (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

A continuación, en la figura M-4 se muestra un ejemplo de progresión meiótica:



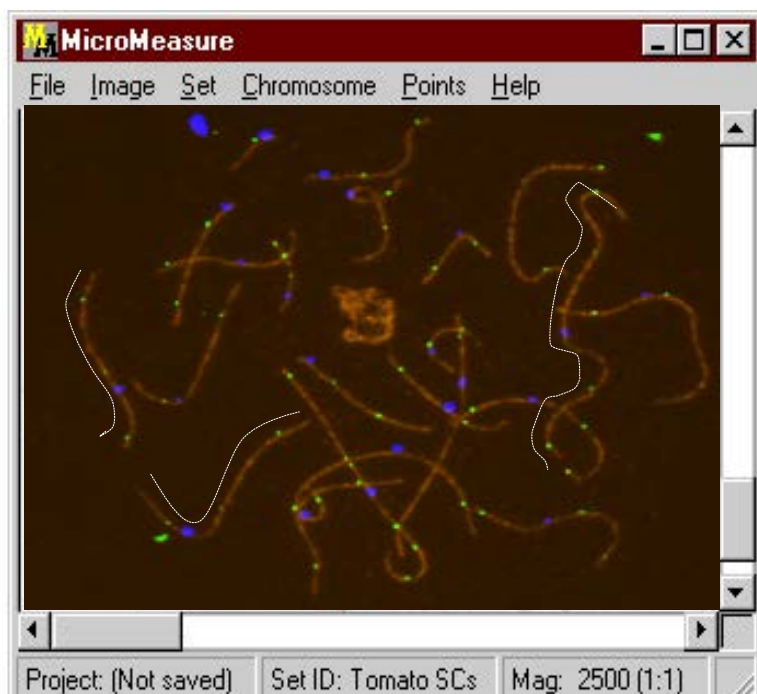
**Figura M-4:** MLH1: verde (puntos recombinación); CREST: azul (centrómicos); SCP3: naranja (Complejo sinaptonémico). A: Leptotene; B: Zigotene temprano; C: Zigotene tardío; D: Paquitene temprano; E: Paquitene tardío; F: Diplotene.

- **Medición de la longitud total de los complejos sinaptonémicos (CS)**

El análisis se realizó mediante el programa de medición Micromasure, disponible en la web de la Universidad de Colorado: <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/Micromasure>.

Este programa es una aplicación que permite realizar mediciones a partir de imágenes capturadas en el microscopio. En este estudio, se utilizó para medir la longitud total de los CS de los espermatozoides primarios en estadio de paquitene tomando como referencia el marcaje con SCP3 (ver figura M-5). La unidad de medida es  $\mu\text{m}$ .

Para el análisis comparativo de las longitudes de CS entre el grupo de estudio y el grupo control se utilizó el t-test (equivalencia de desviaciones típicas) ( $p < 0,05$ ) mediante el programa Graphpad InStat v.2.05a (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).



*Figura M-5: Programa Micromasure*

- **Análisis de la frecuencia de recombinación**

Para estimar el número de quiasmas en los espermatocitos primarios se utilizó como marcador de los eventos de recombinación entre cromosomas homólogos la tinción con anticuerpos frente a MLH1.

Se capturaron con el microscopio de fluorescencia las imágenes de aquellas figuras meióticas en estadio de paquitene, tomando las coordenadas de localización de cada una de ellas.

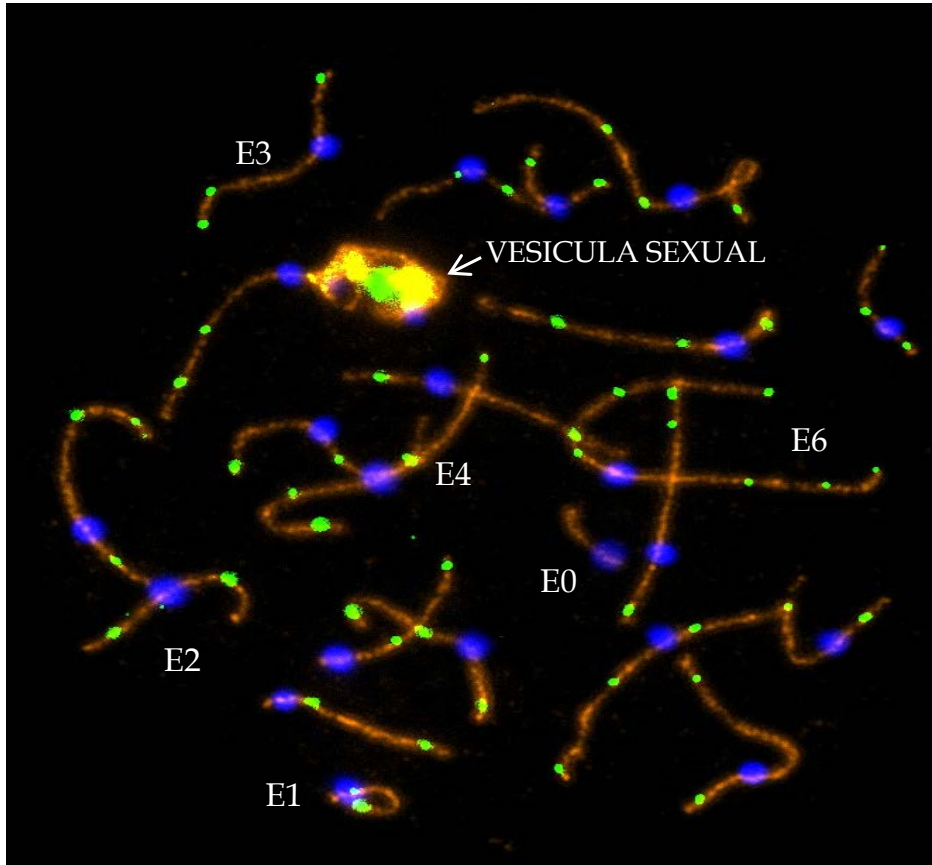
Se calculó la frecuencia de recombinación media y la desviación típica del grupo de estudio y del grupo control. Para la comparación de medias entre grupos se utilizó el test de t-student en aquellos casos en los que la variable analizada seguía una distribución normal. Cuando las variables analizadas no seguían una distribución normal se utilizó el test U-Mann Whitney ( $p < 0,05$ ) mediante el software Statistical Package for Social Sciences v17.0 (SPSS Inc.).

Se analizó en ambos grupos el número de bivalentes que no presentaban ningún entrecruzamiento (E0), y los que presentaban uno (E1), dos entrecruzamientos (E2), tres (E3), cuatro (E4), cinco (E5) y seis entrecruzamientos (E6) (ver figura M-6). Para la comparación de las frecuencias de estas variables entre grupos se utilizó el test t-student ( $p < 0,05$ ).

Criterios de exclusión:

- Figuras meióticas en las que no se contabilizaban 22 complejos sináptonémicos.
- Figuras meióticas en estadio de paquitene en las que se contaron menos de 39 puntos de recombinación.
- Los puntos de recombinación en zonas donde se superponían complejos.
- Figuras tridimensionales.
- Figuras superpuestas.
- Puntos de recombinación distales en los que tras ellos no continuaba complejo sináptonémico.





*Figura M-6: Inmunofluorescencia de un espermatozocito primario en estadio de paquitene. MLH1: verde (puntos recombinación); CREST: azul (centrómeros); SYCP3: naranja (Complejo sinaptonémico). C: nº de bivalentes; E0: nº de bivalentes con cero entrecruzamientos o puntos de recombinación; E1: nº de bivalentes con un entrecruzamiento o punto de recombinación; E2: nº de bivalentes con dos entrecruzamientos o puntos de recombinación; E3: nº de bivalentes con tres entrecruzamientos o puntos de recombinación; E4: nº de bivalentes con cuatro entrecruzamientos o puntos de recombinación; E5: nº de bivalentes con cinco entrecruzamientos o puntos de recombinación; E6: nº de bivalentes con seis entrecruzamientos o puntos de recombinación. Análisis correspondiente a esta figura: C: 22 bivalentes E0: 1; E1: 1; E2:9; E3:9; E4:1; E5:0; E6: 1*

### 4.3. HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

Esta técnica utiliza sondas de ADN marcadas con moléculas fluorescentes que se unen específicamente a secuencias de ácidos nucleicos de un cromosoma. De este modo, se pueden enumerar las copias de un determinado cromosoma presente en el núcleo de una célula.

#### 4.3.1. FISH de espermatozoides

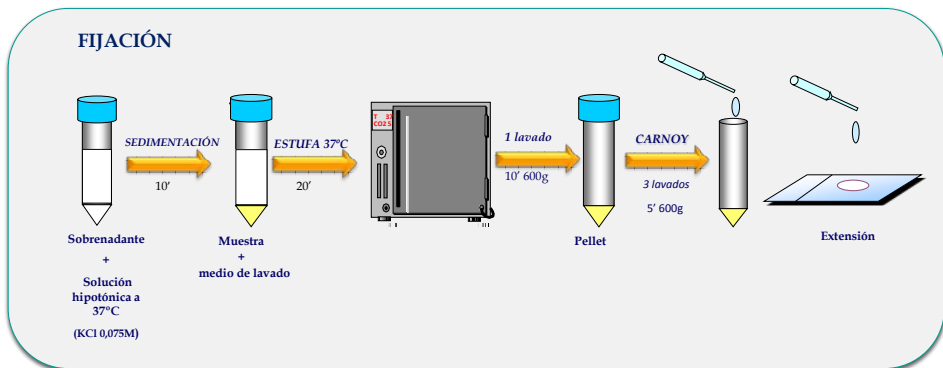
El FISH de espermatozoides consiste en la hibridación de cromosomas específicos en el núcleo de los espermatozoides en estadio de interfase, para poder determinar si presentan o no un número de copias correcto. La valoración de las señales de hibridación se realiza bajo microscopio de fluorescencia. Se evalúa la incidencia de espermatozoides haploides, diploides y disómicos en cada una de las muestras.

##### 4.3.1.1 Protocolo de fijación de espermatozoides testiculares

SOLUCIONES
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b><u>Solución de fijación "Carnoy"</u></b>: metanol:ácido acético en proporción 3:1 (Merk, Alemania).</li> <li>- <b><u>Solución hipotónica</u></b>: 0,05g de KCl (0,075 M) (Sigma-Aldrich), 10 ml de agua destilada.</li> <li>- <b><u>Soluciones de lavado</u></b>: medio de lavado de espermatozoides, 20xSSC (Citrato sódico salino) (Vysis, Inc. IL.USA ); 2xSSC, 2xSSC/0,1%NP-40 (Vysis) y 0,4xSSC .</li> </ul>

- Colocar la muestra de la biopsia en una placa Petri con 1 ml de medio de cultivo para espermatozoides y dilacerarla con la ayuda de dos bisturís a modo de cuchilla.
- Depositar el tejido en un tubo cónico de 10 ml y dejar sedimentar durante 10 minutos.
- Recoger el sobrenadante y depositarlo en un tubo cónico de 10 ml. Añadir 10 ml de solución hipotónica, previamente atemperada a 37°C durante 30 minutos, y mantener en estufa a 37°C durante 20 minutos.
- Centrifugar 10 minutos a 600g.

- Descartar el sobrenadante y proceder a la fijación del pellet con la solución “Carnoy”, añadiéndolo gota a gota lentamente y agitando con el vórtex para evitar la formación de grumos, hasta un volumen final de 3-4 ml de solución de fijación.
- Centrifugar 5 minutos a 600g. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet con el fijador del mismo modo que antes.
- Centrifugar 5 minutos a 600g. Descartar el sobrenadante y añadir gota a gota el fijador hasta conseguir una dilución semitransparente
- Extender los espermatozoides en portaobjetos (Superfrost Cole-Parmer, USA) previamente desengrasados, y almacenar a -20°C hasta la hibridación (ver figura M-7).



*Figura M-7: Esquema de la metodología de fijación de los espermatozoides procedentes de biopsia de testículo.*

### 4.3.1.2. Protocolo de Hibridación *in situ* fluorescente en preparaciones con espermatozoides testiculares

<b>SOLUCIONES</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b><u>Solución de descondensación:</u></b> 0,0386g de 1,4- Ditiotreitól (DTT) 5 mM (Roche, Mainnheim, Alemania),0,302g de TRIS Base (Roche), 500µl de Tritón X-100 (Roche), 50 ml de agua destilada. PH: 7,4</li> <li>- <b><u>Solución de desnaturalización:</u></b> 28ml de Formamida 70%(Roche),4ml de 20xSSC (Vysis, Inc. IL.USA ),agua destilada. PH: 7,3</li> <li>- <b><u>Soluciones de deshidratación:</u></b> Etanol de 70%, 85%, 90% y 100%(Merk, Darmstad, Alemania)</li> </ul>
<b>SONDAS DE ADN MARCADAS CON MOLÉCULAS FLUORESCENTES</b> (Vysis Inc. Downers Grove, IL., USA.)
<b>SONDAS CENTROMÉRICAS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>•CEP X Spectrum Green (locus DXZ1)</li> <li>•CEP Y Spectrum Orange (locus DYZ3)</li> <li>•CEP 18 Spectrum Aqua (locus D18Z1)</li> </ul>
<b>SONDAS LOCUS ESPECÍFICAS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>•LSI 13 Spectrum Green (locus RB)</li> <li>•LSI 21 Spectrum Orange (locus D21S259)</li> </ul>
<b><u>Contratinción:</u></b> DAPI II (Vysis)

Es importante mencionar que el reducido tamaño de la cabeza de los espermatozoides y la compactación de la cromatina del núcleo por la formación de puentes disulfuro entre protaminas, limita el acceso de las sondas de ADN a su secuencia diana. Por ello, muchos protocolos de FISH de espermatozoides incluyen un tratamiento previo de descondensación del núcleo con agentes reductores de puentes disulfuro (Wyrobek y cols., 1990; Vidal y cols., 1993) (Ver figura M-8).

#### Descondensación:

- Marcar con un lápiz de diamante un área de 15x15 mm que recoja el centro de la gota donde tenemos extendidos los espermatozoides en el portaobjetos.
- Realizar 1 lavado de 5 minutos en 2xSSC a temperatura ambiente.

- Deshidratar las muestras en una serie creciente de alcoholes (etanol 70%, 90%, 100%), durante 2 minutos en cada alcohol, y dejar secar.
- Incubar las muestras durante 5-7 minutos a 37°C en una cubeta coplin con DTT (atemperado en estufa a 37°C durante 30 minutos).
- Realizar un lavado de 5 minutos en 2xSSC a temperatura ambiente.
- Deshidratar las muestras en una serie creciente de alcoholes (etanol 70%, 90%, 100%), durante 2 minutos en cada alcohol, y dejar secar.

Desnaturalización:

- Incubar las muestras durante 5 minutos a  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  en Formamida al 70% (atemperada en un baño de agua a  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 30 minutos).
- Deshidratar las muestras en una serie creciente de alcoholes (etanol 70%, 85%, 100%), durante 2 minutos en cada alcohol y dejar secar.

Hibridación:

- Aplicar 5  $\mu\text{l}$  de las sondas de ADN previamente desnaturalizada a  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  en dos portaobjetos, uno de ellos para los cromosomas X, Y y 18, y el otro para los cromosomas 13,21. Cubrir con cubreobjetos de 15x15 mm (Marinfield, Alemania) y sellar con cola.
- Incubar las muestras en una placa calefactora (Hybrite, Vysis Inc. IL,USA) a 37 °C durante un mínimo de 8 horas.

Detección:

- Eliminar la cola y retirar el cubreobjetos deslizándolo suavemente.
- Lavar las muestras un minuto y medio a  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  en 0.4xSSC (atemperado en un baño térmico a  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 30 minutos).
- Lavar las muestras 30 segundos en 2xSSC/NP-40, a temperatura ambiente.  
Dejar secar, aplicar 5  $\mu\text{l}$  de una contratinción de DAPI II (Vysis Inc.), colocar un cubreobjetos, sellar con esmalte de uñas y mirar al microscopio de fluorescencia.



*Figura M-8: Esquema de la metodología de hibridación de los espermatozoides procedentes de biopsia de testículo.*

#### 4.3.1.3. Interpretación de las señales de hibridación

La visualización de las señales de hibridación se realiza con un microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados para los fluorocromos utilizados. Cada uno de los espermatozoides analizados se evalúa 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.

La ausencia de señal para un cromosoma puede ser debida a una nulisomía o a un fallo de hibridación. Por la dificultad para diferenciar entre ambas posibilidades, se considera la incidencia de nulisomías como la misma que de disomías (Egozcue y cols., 1997) y no se contabilizan los espermatozoides con ausencia de señal. (Ver figura M-9).

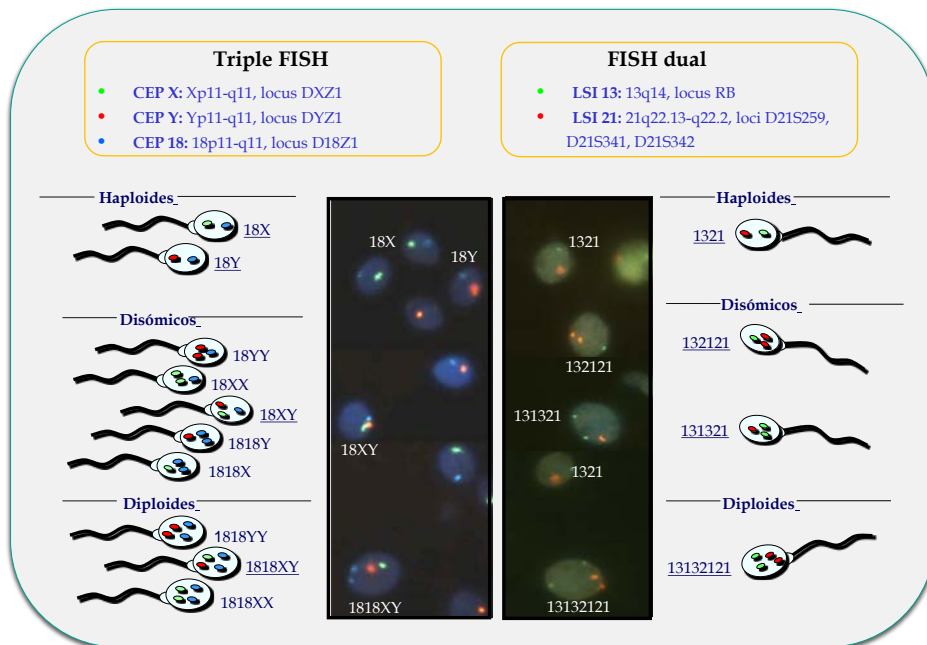


Figura M-9: Interpretación de las señales de hibridación in situ fluorescente para los cromosomas 13,18, 21, X e Y.

La evaluación de los espermatozoides se realiza siguiendo los criterios estrictos descritos por Blanco *et al.*, 1996, con el fin de reducir el margen de error y hacer reproducible la técnica por diferentes observadores. Estos criterios se resumen en tres:

- Evaluar espermatozoides con contorno definido y no superpuestos con otros.
- Evaluar señales de hibridación localizadas claramente en el interior del núcleo.
- En casos de disomía y diploidía ambas señales deben tener la misma intensidad y estar separadas entre sí por una distancia mínima equivalente al diámetro de cada señal.
- Se contabilizan sólo los espermatozoides con disomías, y se estima una incidencia similar a la de nulisomías. No se contabilizan espermatozoides nulisómicos por el riesgo de sobrestimar esta cifra por posibles fallos de hibridación.

Los resultados obtenidos tras el estudio de FISH de espermatozoides de nuestro grupo control se comparan con los valores de referencia de muestras obtenidas de una población control de 10 donantes fértiles normozoospermicos en las que se determinó el valor basal de anomalías cromosómicas numéricas en espermatozoides de testículo (ver tabla M-4). A nivel clínico, consideramos que un resultado de FISH es anormal cuando se observa un incremento significativo de disomías y diploidías para los cromosomas analizados al compararlos con los de la población control.

**Tabla M-4:** Tabla grupo control en espermatozoides de testículo (Rodrigo et al., 2011).

Espermatozoides analizados		DISOMÍAS AUTOSOMAS (%)			DISOMÍAS CROMOSOMAS SEXUALES (%)	DIPLOIDÍA TOTAL (%)
X/Y/18	13/21	Cromosoma 13	Cromosoma 18	Cromosoma 21		
6.821	7.467	12 (0,16)	3 (0,04)	19 (0,25)	23 (0,34)	39 (0,27)

#### 4.3.1.4. Descripción de las variables analizadas

Se analizó la incidencia de disomías y diploidías para los cromosomas 18, X e Y por un lado, y para los cromosomas 13 y 21, por otro, tanto en el grupo de estudio como en el grupo control.

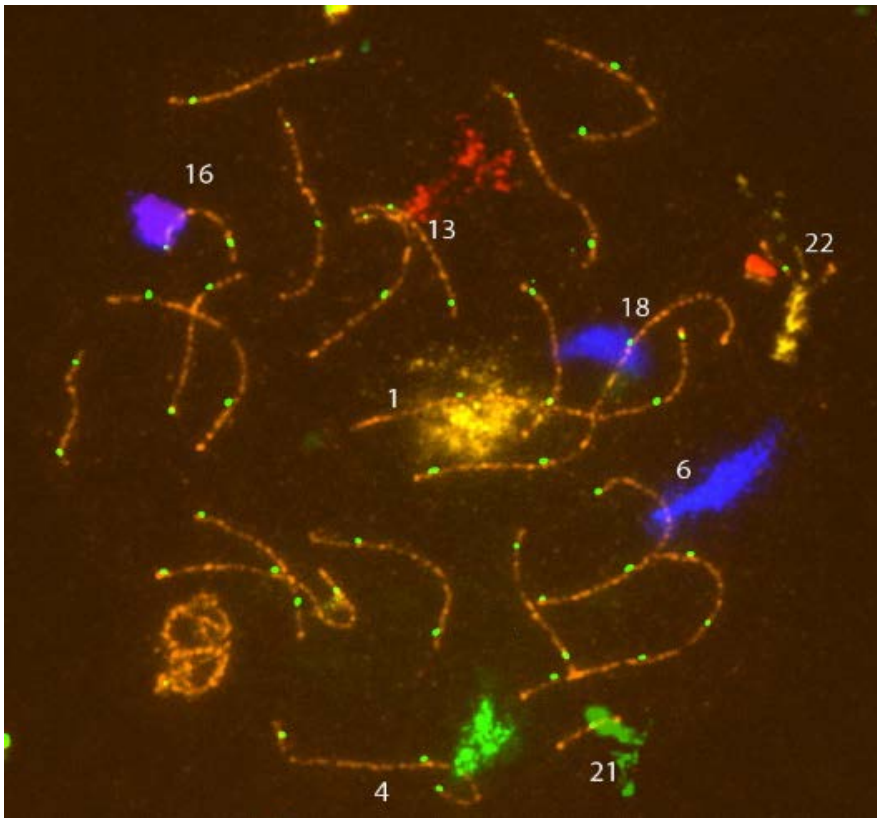
Para analizar los datos del FISH de espermatozoides se utilizó el test Chi-cuadrado con dos colas (con la corrección de Yates) y el test exacto de Fisher. Se consideró un valor estadísticamente significativo con un P valor < 0.05. Para el análisis se utilizó el programa Graphpad Instat v.2.05a (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

#### 4.3.2. FISH de espermatozoides primarios en estadio de paquitene

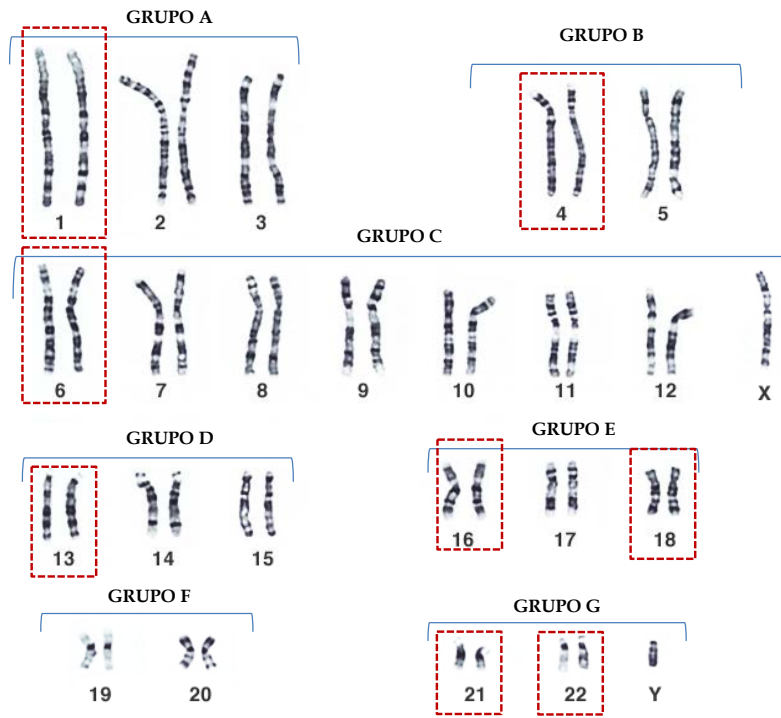
Se realizó FISH secuencial, utilizando sondas dirigidas a los cromosomas 1, 4, 6, 13, 16, 18, 21 y 22 sobre las extensiones de células meióticas fijadas anteriormente con paraformaldehído al 1% y sometidas a inmunotinción marcando SYCP3, MLH1 y CREST (ver figura M-10). El criterio de selección de los cromosomas a analizar se basó en



elegir cromosomas representativos de la mayor parte de grupos cromosómicos, y de entre ellos, aquellos cromosomas implicados en abortos y en recién nacidos vivos (RNV) con anomalías cromosómicas (ver figura M-11). Con el microscopio de fluorescencia Zeiss se re-localizaron las células meióticas en estadio de paquitene y se tomaron las imágenes de las mismas. Posteriormente, utilizando el programa Adobe Photoshop CS se superpusieron estas imágenes sobre las tomadas anteriormente en las que las células meióticas en estadio de paquitene estaban marcadas con los anticuerpos, para identificar los bivalentes de los cromosomas analizados.



**Figura M-10:** Espermatozoida primario en estadio de paquitene hibridado secuencialmente por FISH utilizando sondas dirigidas al cromosoma 1, cromosoma 4, cromosoma 6, cromosoma 13, cromosoma 16, cromosoma 18, cromosoma 21 y cromosoma 22 para identificar los bivalentes de estos cromosomas.



**Figura M-11:** Cariotipo humano. Se identificaron los bivalentes de los cromosomas seleccionados. Imagen modificada página web Abbot Molecular <https://www.abbotmolecular.com/home.ht>

### 4.3.2.1. Protocolo de trabajo

<b>SOLUCIONES</b>
- <b>Soluciones de lavado:</b> 20xSSC (Citrato sódico salino) (Vysis) pH:5,3; 2xSSC/0.1% NP-40 (Vysis) pH:7,0-7,5 y 0.4xSSC pH:7,0-7,5.
- <b>Soluciones de deshidratación:</b> Etanol de 70%, 85% y 100% (Merck).

<b>SONDAS DE ADN MARCADAS CON MOLÉCULAS FLUORESCENTES</b> (Vysis Inc. Downers Grove, IL, USA.)
<b>SONDAS CENTROMÉRICAS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• CEP 1 Spectrum Orange (D1Z5) (1p11-q11)</li> <li>• CEP 4 Spectrum Green (4p11-q11)</li> <li>• CEP 6 Spectrum Aqua (D6Z1) (6p11-q11)</li> </ul>
<b>VYSIS MULTIVYSION PB MULTI-COLOR PROBE KIT</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• LSI 13 Spectrum Red (13q14)</li> <li>• CEP 16 Spectrum Aqua (16q11.2 Satellite II DNA)</li> <li>• CEP 18 Spectrum Blue (18p11.1-q11.1 Alpha satellite DNA)</li> <li>• LSI 21 Spectrum Orange (21q22.13-22.2)</li> <li>• LSI 22 Spectrum Gold (22q11.2)</li> </ul>
<b>Contratinción:</b> DAPI II (Vysis Inc.)

#### Primera ronda de hibridación:

- Realizar un lavado de 2 minutos en 2xSSC/NP-40 a temperatura ambiente.
- Deshidratar las muestras en una serie creciente de alcoholes (etanol 70%, 90%, 100%) (Merck, Darmstadt, Alemania), durante 2 minutos en cada alcohol, y dejar secar.
- Para el análisis simultáneo de los cromosomas 13, 16, 18, 21 y 22, aplicar 40 µl de la sonda preparada (2µl kit MultiVysion PB + 39 µl de Tampón de hibridación LSI/WCP) sobre el área de hibridación, colocar un cubreobjetos de 50x22 mm y sellar con cola.
- Co-desnaturalizarlas sondas y las muestras durante 5 minutos a 73 °Cy posteriormente hibridar a 37 °C durante toda la noche en una placa calefactora (Hybrite, Vysis Inc.).

Detección:

- Lavar las muestras un minuto y medio a  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  en  $0,4\times\text{SSC}$  (atemperado en un baño térmico a  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 30 minutos).
- Lavar las muestras 30 segundos en  $2\times\text{SSC}/\text{NP-40}$ , a temperatura ambiente.
- Dejar secar, aplicar  $40\mu\text{l}$  de una contratinción de DAPI II, colocar un cubreobjetos, sellar con cola y evaluar las señales de hibridación al microscopio de fluorescencia.

Segunda ronda de hibridación:

- Lavar las muestras 2 minutos en  $2\times\text{SSC}/\text{NP-40}$ , a temperatura ambiente.
- Deshidratar las muestras en una serie creciente de alcoholes (etanol 70%, 90%, 100%) (Merck, Darmstadt, Alemania), durante 2 minutos en cada alcohol, y dejar secar.
- Para el análisis simultáneo de los cromosomas 1, 4 y 6, aplicar  $25\mu\text{l}$  de la sonda preparada ( $7\mu\text{l}$  CEP 1 +  $7\mu\text{l}$  CEP 4 +  $7\mu\text{l}$  CEP 6 +  $135\mu\text{l}$  de tampón de hibridación LSI/WCP) sobre el área de hibridación, colocar un cubreobjetos de  $50\times 22\text{ mm}$  y sellar con cola.
- Co-desnaturalizar las sondas y las muestras durante 5 minutos a  $73^\circ\text{C}$  y posteriormente hibridar a  $37^\circ\text{C}$  durante toda la noche.

Detección:

- Lavar las muestras un minuto y medio a  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  en  $0,4\times\text{SSC}$  (atemperado en un baño térmico a  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 30 minutos).
- Lavar las muestras 30 segundos en  $2\times\text{SSC}/\text{NP-40}$ , a temperatura ambiente.
- Dejar secar, aplicar  $40\mu\text{l}$  de una contratinción de DAPI II, colocar un cubreobjetos, sellar con cola y evaluar las señales de hibridación al microscopio de fluorescencia.

#### **4.3.2.2. Descripción de las variables analizadas**

Se identificaron los bivalentes de los cromosomas 1, 4, 6, 13, 16, 18, 21 y 22 y se evaluó la frecuencia de recombinación por cromosoma.

Para analizar los datos se utilizó el test de t-student en los casos en los que la desviación típica era equivalente; y el test de t-Welch en los casos en los que no lo eran.

Para el análisis se utilizó el programa Graphpad InStat v.2.05a (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

## 5. RESULTADOS



### 5.1. Análisis de la progresión meiótica

En la tabla R-1 y en la tabla R-2 se muestran respectivamente los resultados de progresión meiótica estudiada mediante inmunocitogenética de los 23 pacientes con azoospermia secretora (grupo AS) y los 5 pacientes que inicialmente fueron diagnosticados como criptozoospermicos y que en el momento del estudio fueron diagnosticados como azoospermicos (grupo Cripto). Para su análisis se estimó el porcentaje de células en cada uno de los estadios de la profase I para cada individuo, tanto en el grupo de pacientes con azoospermia secretora (ver tabla R-1), como en el grupo de pacientes que inicialmente habían sido criptozoospermicos (ver tabla R-2) y se compararon con el grupo control (ver tabla R-3), utilizando el test estadístico Chi-cuadrado con corrección de Yates ( $p < 0,05$ ).

En el grupo de pacientes con azoospermia secretora se analizaron un total de 2.185 células, de las cuales un 7,5% correspondían al estadio de leptotene, un 50,1% al estadio de zigotene, un 42,1% al estadio de paquitene y un 0,3% al estadio de diplotene. Al compararlo con el grupo control se observó en el grupo de estudio un incremento estadísticamente significativo en cuanto al porcentaje de células en estadio de leptotene (7,5% vs. 11,9%;  $p < 0,0001$ ) y en cuanto al porcentaje de células en estadio de zigotene (50,1% vs. 12,0%;  $p < 0,0001$ ), y una disminución en el porcentaje de células en estadio de paquitene (42,1% vs. 72,6%;  $p < 0,0001$ ). No se observaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de células en estadio de diplotene (0,3% vs. 0%) (ver figura R-1). Para analizar si existían diferencias interindividuales se comparó cada paciente del grupo de estudio de azoospermias secretoras con el grupo control utilizando el test exacto de Fisher. El análisis reveló que todos los pacientes mostraron diferencias significativas con el grupo control en el porcentaje de células en alguno de los distintos estadios (ver tabla R-1).



En el grupo de pacientes inicialmente criptozoospermicos se analizaron un total de 502 células, de las cuales un 5,8% correspondían al estadio de leptotene, un 38,6% al estadio de zigotene y un 55,6% al estadio de paquitene. No se encontró ninguna célula en estadio de diplotene. Al compararlo con el grupo control se observó un incremento estadísticamente significativo en este grupo de estudio en cuanto al porcentaje de células en estadio de leptotene (5,8% vs. 11,9%;  $p=0,0002$ ) y en cuanto al porcentaje de células en estadio de zigotene (36,6% vs. 12,0%;  $p<0,0001$ ) y una disminución en el porcentaje de células en estadio de paquitene (55,6% vs. 72,6%;  $p<0,0001$ ) (ver figura R-1). El análisis individual reveló que todos los pacientes mostraron diferencias significativas con el grupo control en el porcentaje de células en alguno de los distintos estadios (ver tabla R-2).

**Tabla R-1: Análisis de la progresión meiótica en el grupo de azoospermia secretora.**

Código muestra	Nº de células analizadas	Leptotene (%)	Zigotene (%)	Paquitene (%)	Diplotene (%)
AS-1	67	7 (10,4)	29 (43,3)*	30 (44,8)*	1 (1,5)
AS -2	12	2 (16,7)	8(66,6)*	2 (16,7)*	0 (0)
AS-9	100	7 (7)	58 (58)*	34 (34)*	1 (1)
AS -13	101	6 (6)*	82 (82)*	13 (13)*	0 (0)
AS -19	100	2 (2)*	49 (49)*	48 (48)*	1 (1)
AS -20	100	6 (6)	75 (75)*	19 (19)*	0 (0)
AS -23	100	4 (4)*	31 (31)*	65 (65)	0 (0)
AS -24	100	4 (4)*	39 (39)*	56 (56)*	1 (1)
AS -26	100	9 (9)	60 (60)*	31 (31)*	0 (0)
AS-27	100	14 (14)	56 (56)*	30 (30)*	0 (0)
AS-30	100	4 (4)*	37 (37)*	59 (59)*	0 (0)
AS-31	100	2 (2)*	56 (56)*	42 (42)*	0 (0)
AS-34	105	3 (2,8)*	19 (17,9)	83 (79)	0 (0)
AS -35	100	4 (4)*	44 (44)*	49 (49)*	3 (3)*
AS -36	100	1 (1)*	54 (54)*	44 (44)*	1 (1)
AS-37	100	9 (9)	46 (46)*	45 (45)*	0 (0)
AS -39	100	1 (1)*	32 (32)*	67 (67)*	0 (0)
AS-44	100	5 (5)*	50(50)*	45 (45)*	0 (0)
AS-45	100	12 (12)	53 (53)*	35 (35)*	0 (0)
AS-48	100	18 (18)	52 (52)*	30 (30)*	0 (0)
AS-49	100	14 (14)	47 (47) *	39 (39)*	0 (0)
AS -51	100	23 (23)*	60 (60)*	17 (17)*	0 (0)
AS -52	100	6 (6)	58 (58)*	36 (36)*	0 (0)
<b>TOTAL</b>	<b>2.185</b>	<b>163 (7,5)**</b>	<b>1.095 (50,1)**</b>	<b>919 (42,1)**</b>	<b>8 (0,3)</b>

\*Diferencias significativas de cada individuo ( $p<0,05$ ) con el grupo control (tabla R-3).

\*\*Diferencias significativas del total del grupo de estudio ( $p<0,05$ ) con el grupo control (tabla R-3).

**Tabla R-2:** Análisis de la progresión meiótica en el grupo de Criptozoospermicos.

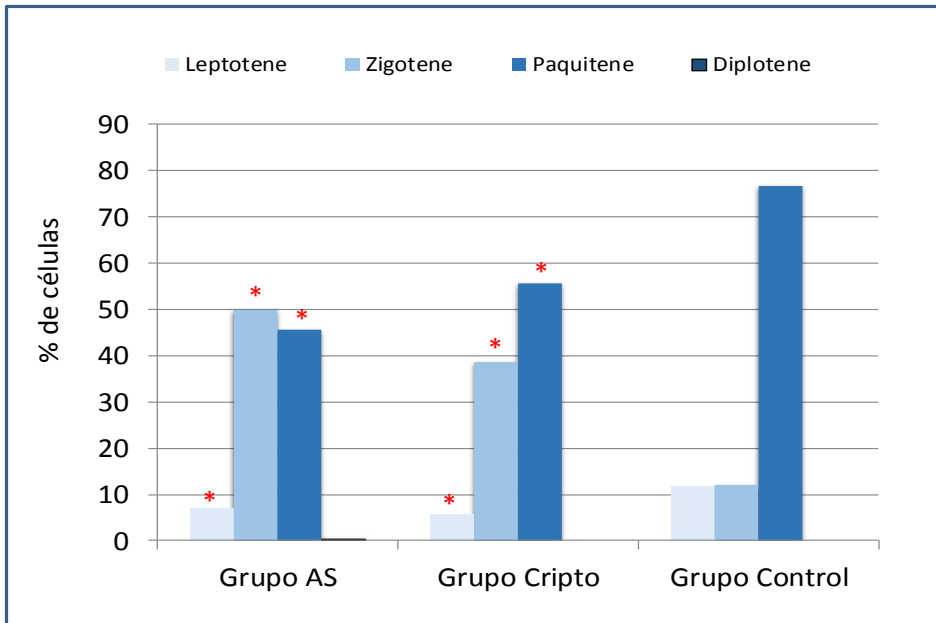
Código muestra	Nº de células analizadas	Leptotene (%)	Zigotene(%)	Paquitene (%)	Diplotene(%)
<b>Cripto-1</b>	100	3 (3)*	32 (32)*	65 (65)	0 (0)
<b>Cripto-2</b>	100	12 (12)	39 (39)*	49 (49)*	0 (0)
<b>Cripto-3</b>	102	6 (5,9)	29 (28,4)*	67 (65,7)	0 (0)
<b>Cripto-4</b>	100	0 (0)	33 (33)*	67(67)	0 (0)
<b>Cripto-5</b>	100	8 (8)	61 (61)*	31(31)*	0 (0)
<b>TOTAL</b>	<b>502</b>	<b>29 (5,8)**</b>	<b>194 (38,6)**</b>	<b>279 (55,6)**</b>	<b>0 (0)</b>

\*Diferencias significativas de cada individuo ( $p<0,05$ ) con el grupo control (tabla R-3).

\*\*Diferencias significativas del grupo de estudio ( $p<0,05$ ) con el grupo control (tabla R-3).

**Tabla R-3:** Análisis de la progresión meiótica en el grupo control.

Código muestra	Nº de células analizadas	Leptotene (%)	Zigotene(%)	Paquitene (%)	Diplotene(%)
<b>AO-16</b>	100	9 (9)	21 (21)	70 (70)	0 (0)
<b>AO-19</b>	100	11 (14)	12 (15)	77 (80)	0 (0)
<b>AO-22</b>	100	9 (9)	8 (8)	83 (83)	0 (0)
<b>AO-23</b>	100	10 (10)	9(9)	81 (81)	0 (0)
<b>AO-24</b>	100	5 (5)	4(4)	91 (91)	0 (0)
<b>AO-25</b>	100	23 (23)	10 (10)	67 (67)	0 (0)
<b>AO-26</b>	100	18 (18)	8 (8)	74 (74)	0 (0)
<b>AO-31</b>	100	10 (10)	13 (13)	77 (77)	0 (0)
<b>AO-32</b>	100	13 (13)	23 (23)	64 (64)	0 (0)
<b>AO-34</b>	100	11 (11)	12 (12)	77(77)	0 (0)
<b>TOTAL</b>	<b>1000</b>	<b>119 (11,8)</b>	<b>120 (12,1)</b>	<b>761 (76,7)</b>	<b>0 (0)</b>



**Figura R-1:** Porcentaje de células en cada estadio en cada uno de los grupos y comparación estadística con el grupo control (\* $p < 0,05$ ).

Además, al comparar el grupo de pacientes azoospermicos con el grupo de pacientes criptozoospermicos se observó que los primeros mostraban un incremento estadísticamente significativo en cuanto al porcentaje de células en estadio de zigotene (50,1% vs. 38,6%;  $p < 0,0001$ ) y una disminución en el porcentaje de células en estadio de paquitene (42,1% vs. 55,6%;  $p < 0,0001$ ). No se observaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de células en estadio de leptotene (7,5% vs. 5,8), ni de diplotene (0,3% vs. 0%).

## 5.2. Medición de la longitud total de los complejos sinaptonémicos (CS)

Se realizó la medición de la longitud de los CS de los espermatozoides primarios en estadio de paquitene. Para el análisis comparativo entre grupos se utilizó el test estadístico t-Welch. El grupo control mostró una longitud de  $276,67 \pm 19,27 \mu\text{m}$  con un rango entre paquitenes analizadas de 201,69 - 411,32. El grupo de pacientes con azoospermia secretora y el grupo de pacientes criptozoospermicos mostraron una longitud de 276,14

$\pm 21,65$  y  $274,73 \pm 7,58$ , respectivamente. Con un rango de 205,19 - 415,78 en el caso del grupo AS y de 218,79 - 369,04 en el caso del grupo Cripto. (Ver tablas R-4, R-5 y R-6).

Ni el grupo de pacientes con azoospermia secretora, ni el grupo de pacientes criptozospermicos mostraron diferencias estadísticamente significativas al compararlos con el grupo control.

**Tabla R-4:** Medición de la longitud total de CS en el grupo control.

Código muestra	Nº paquitenes analizadas	Longitud CS ( $\mu\text{m}$ )	
		Media $\pm$ DS	Rango
AO-16	15	278,40 $\pm$ 34,49	203,23 - 335,87
AO-19	15	295,04 $\pm$ 35,08	247,22 - 366,04
AO-22	15	312,96 $\pm$ 35,01	266,69 - 390,86
AO-23	15	301,73 $\pm$ 41,74	237,92 - 411,32
AO-24	15	259,45 $\pm$ 31,97	225,93 - 334,45
AO-25	9	288,86 $\pm$ 20,07	256,21 - 321,11
AO-26	15	273,96 $\pm$ 27,17	236,76 - 310,44
AO-31	15	282,29 $\pm$ 32,83	223,52 - 368,41
AO-32	15	276,77 $\pm$ 26,27	236,25 - 325,71
AO-34	15	277,46 $\pm$ 31,51	241,18 - 353,99
<b>TOTAL</b>	<b>264</b>	<b>276,67 <math>\pm</math> 19,27</b>	<b>232,73 - 339,69</b>

**Tabla R-5:** Medición de la longitud total de CS en el grupo de pacientes azoospérmicos.

Código muestra	Nº paquitenes analizadas	Longitud CS (µm)	
		Media ± DS	Rango
AS-1	8	266,05 ± 21,40	205,19 - 301,48
AS-2	2	290,61 ± 56,92	250,36 - 330,86
AS-9	3	279,63 ± 19,35	257,95 - 295,16
AS-13	5	265,99 ± 35,32	233,48 - 305,69
AS-19	15	275,50 ± 29,61	236,24 - 349,79
AS-20	15	269,60 ± 29,05	232,86 - 340,11
AS-23	11	272,57 ± 31,86	230,53 - 317,44
AS-24	12	298,95 ± 30,32	259,03 -353,39
AS-26	4	243,81 ± 13,75	231,92 - 262,94
AS-27	3	237,30 ± 25,09	222,07 - 266,26
AS-30	15	296,65 ± 49,40	262,68 - 415,78
AS-31	3	313,12 ± 75,36	232,27 - 381,41
AS-34	15	288,80 ± 37,12	218,38 - 343,45
AS-35	5	319,13 ± 25,74	287,25 - 349,60
AS-36	15	286,74 ± 37,11	251,36 -332,58
AS-37	15	284,69 ± 23,99	254,05-309,39
AS-39	5	258,88 ± 26,55	232,22-294,66
AS-44	4	249,85 ± 22,55	218,29-269,82
AS-45	7	274,35 ± 32,90	240,30-310,90
AS-48	5	248,11 ± 13,83	266,07-245,02
AS-49	4	270,81 ± 11,52	261,02-283,51
AS-51	5	301,70 ± 21,34	312,84-276,24
AS-52	15	258,39 ± 10,18	273,46-250,98
<b>TOTAL</b>	<b>194</b>	<b>276,14 ± 21,65</b>	<b>205,19-415,78</b>

**Tabla R-6:** Medición de la longitud total de CS en el grupo de pacientes criptozoospermicos.

Código muestra	N° paquitenes analizadas	Longitud CS (µm)	
		Media ± DS	Rango
<b>Cripto-1</b>	15	268,00 ± 31,73	303,27 - 218,79
<b>Cripto-2</b>	4	274,64 ± 16,08	260,86 - 296,67
<b>Cripto-3</b>	15	287,47 ± 29,82	251,50 - 369,04
<b>Cripto-4</b>	12	270,21 ± 30,21	229,37 - 327,80
<b>Cripto-5</b>	5	273,32 ± 14,98	298,01 - 259,97
<b>TOTAL</b>	<b>51</b>	<b>274,73 ± 7,58</b>	<b>218,79 - 369,04</b>

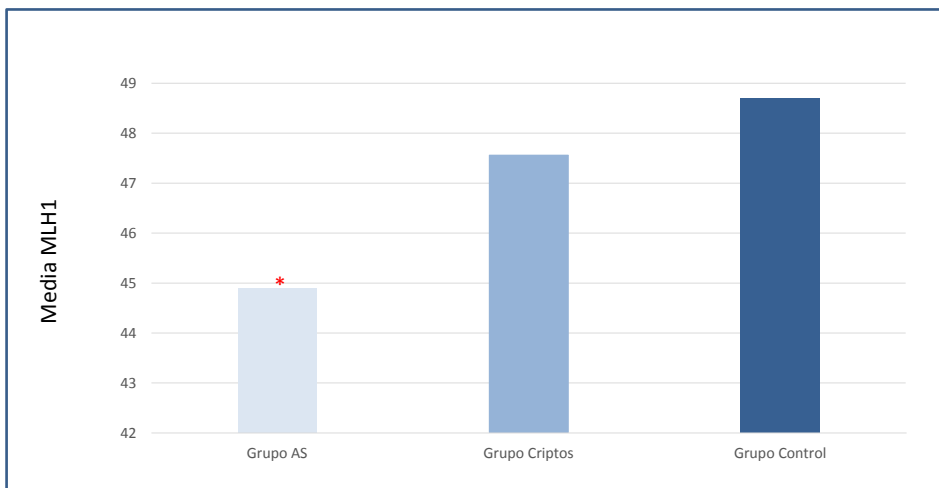
### 5.3. Análisis de la frecuencia de recombinación meiótica

Observamos que nuestro grupo control presentaba una media de la frecuencia de recombinación de  $48,71 \pm 1,55$  con un rango entre individuos de  $47,37 \pm 2,70$  a  $52,90 \pm 3,34$  de media de recombinación por espermatocito en estadio de paquiene. Dentro de este grupo se observaron diferencias entre individuos ( $p < 0,0001$ ; test ANOVA), que no se correlacionaron ni con la edad del varón, ni con el tiempo transcurrido desde la vasectomía.

La media de recombinación del grupo de pacientes con azoospermia secretora fue de  $44,90 \pm 2,41$  con un rango entre individuos de  $41,50 \pm 2,12$  a  $51,58 \pm 4,31$  (ver tabla R-7). La frecuencia de recombinación del grupo de pacientes con azoospermia secretora fue significativamente inferior a la del grupo control ( $48,7 \pm 1,55$ ;  $p < 0,0001$ ) utilizando el test estadístico t-Welch (ver figura R-2). Al comparar los valores de cada individuo con la media del grupo control, utilizando la U de Mann Whitney, se observaron valores significativamente inferiores en la media de MLH1 en 18 de los 23 pacientes: **AS-1** ( $43,00 \pm 1,55$ ;  $p < 0,0001$ ), **AS-2** ( $41,50 \pm 2,12$ ;  $p = 0,017$ ), **AS-13** ( $41,80 \pm 1,30$ ;  $p < 0,0001$ ), **AS-19** ( $42,41 \pm 3,13$ ;  $p < 0,0001$ ), **AS-20** ( $44,68 \pm 3,72$ ;  $p < 0,0001$ ), **AS-23** ( $43,72 \pm 2,72$ ;  $p < 0,0001$ ), **AS-26** ( $42,50 \pm 2,08$ ;  $p = 0,002$ ), **AS-30** ( $47,20 \pm 3,67$ ;  $p = 0,024$ ), **AS-34** ( $45,23 \pm$

2,50;  $p < 0,0001$ ), **AS-35** ( $45,75 \pm 2,76$ ;  $p = 0,012$ ), **AS-36** ( $44,11 \pm 2,55$ ;  $p < 0,0001$ ), **AS-37** ( $44,93 \pm 2,08$ ;  $p < 0,0001$ ), **AS-39** ( $44,39 \pm 2,39$ ;  $p < 0,0001$ ), **AS-44** ( $43,60 \pm 2,70$ ;  $p = 0,002$ ); **AS-45** ( $43,75 \pm 2,22$ ;  $p = 0,005$ ), **AS-48** ( $46,00 \pm 3,91$ ;  $p = 0,041$ ), **AS-49** ( $44,40 \pm 2,30$ ;  $p = 0,005$ ) y **AS-52** ( $42,40 \pm 2,07$ ;  $p < 0,0001$ ).

La media de recombinación del grupo de pacientes criptozoospermicos fue de  $47,56 \pm 4,63$  con un rango de  $42,60 \pm 1,67$  a  $51,00 \pm 4,46$  (ver tabla R-8). No se observaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control utilizando el test estadístico t-Welch (ver figura R-2). Al comparar con la U de Mann Whitney los valores de cada individuo con la media del grupo control, se observaron valores significativamente inferiores en la media de MLH1 en los pacientes Cripto-1 ( $45,66 \pm 3,06$ ;  $p < 0,001$ ) y **Cripto-5** ( $42,60 \pm 1,67$ ;  $p < 0,0001$ ).



**Figura R-2:** Media de la recombinación meiótica en cada uno de los grupos y comparación estadística con el grupo control ( $*p < 0,05$ ).



**Tabla R-7:** Análisis de la recombinación meiótica en el grupo de azoospermias secretoras.

Código muestra	Nº paquitenes analizadas	MLH1±DS	E0 (%)	E1 (%)	E2 (%)	E3 (%)	E4 (%)	E5 (%)	E6(%)
AS-1	8	43,00± 3,11*	1 (0,57)	39 (22,16)	106 (60,23)	27 (15,34)	3 (1,70)	0 (0,00)	0 (0,00)
AS-2	2	41,50 ± 2,12*	1 (2,27)	10 (22,73)	27 (61,36)	5 (11,36)	1 (2,27)	0 (0,00)	0 (0,00)
AS-9	3	49,00 ± 3,60	0 (0,00)	8 (12,12)	38 (57,58)	17 (25,76)	3 (4,54)	0 (0,15)	0 (0,00)
AS-13	5	41,80 ± 1,30*	0 (0,00)	28 (25,45)	69 (62,73)	9 (8,18)	4 (3,64)	1 (0,00)	0 (0,00)
AS-19	29	42,41 ± 3,13*	25 (3,91)	155 (24,29)	328 (51,41)	110 (17,24)	19 (2,97)	1(0,15)	0 (0,00)
AS-20	19	44,68 ± 3,72*	7 (1,67)	95 (22,72)	209 (50,00)	91 (21,72)	15 (3,59)	1 (0,24)	0 (0,00)
AS-23	11	43,72 ± 2,72*	2 (0,82)	56 (23,14)	133 (54,96)	45 (18,60)	6 (2,48)	0 (0,00)	0 (0,00)
AS-24	12	51,58 ± 4,31	1 (0,38)	33 (12,50)	134 (50,76)	76 (28,79)	14 (5,30)	6 (2,27)	0 (0,00)
AS-26	4	42,50 ± 2,08*	0 (0,00)	20 (22,73)	56 (63,64)	10(11,36)	2 (2,27)	0 (0,00)	0 (0,00)
AS-27	3	46,33 ± 6,65	0 (0,00)	14 (21,21)	35 (53,03)	13(19,70)	4 (6,06)	0 (0,00)	0 (0,00)
AS-30	24	47,20 ± 3,67*	1 (0,19)	56 (16,29)	290 (54,92)	120 (22,73)	26 (4,92)	4 (0,76)	1 (0,19)
AS-31	3	47,66 ± 4,72	1 (1,58)	12 (18,18)	32 (48,48)	18(27,27)	2 (3,03)	1 (1,52)	0 (0,00)
AS-34	26	45,23 ± 2,50*	1 (0,17)	119 (20,80)	321 (56,11)	109 (19,05)	22 (3,84)	0 (0,00)	0 (0,00)
AS-35	8	45,75 ± 2,76*	1 (0,56)	34 (19,32)	96 (54,55)	41 (23,29)	3 (1,7)	1 (0,57)	0 (0,00)
AS-36	26	44,11 ± 2,55*	12 (2,1)	125 (21,85)	332 (58,04)	100 (17,48)	3 (0,52)	0 (0,00)	0 (0,00)
AS-37	15	44,93 ± 2,08*	0 (0,00)	54 (16,36)	211 (63,93)	60 (18,18)	5 (1,51)	0 (0,00)	0 (0,00)
AS-39	28	44,39 ± 2,93*	2 (0,32)	121 (19,64)	374 (60,71)	105 (17,04)	14 (2,27)	0 (0,00)	0 (0,00)
AS-44	5	43,60 ± 2,70*	3 (2,73)	22 (20,00)	63 (57,32)	19 (17,27)	3 (2,73)	0 (0,00)	0 (0,00)
AS-45	4	43,75 ± 2,22*	1(1,14)	22 (25,00)	45 (51,14)	17 (9,32)	3 (3,41)	0 (0,00)	0 (0,00)
AS-48	7	46,00 ± 3,91*	0 (0,00)	31 (20,13)	83 (53,89)	35 (22,72)	5(3,25)	0 (0,00)	0 (0,00)
AS-49	5	44,40 ± 2,3*	0 (0,00)	25 (22,72)	62 (56,36)	19 (17,27)	4 (3,63)	0 (0,00)	0 (0,00)
AS-51	4	46,25 ± 2,63	0 (0,00)	17 (19,32)	50 (56,82)	16 (18,18)	5 (5,68)	0 (0,00)	0 (0,00)
AS-52	5	42,40 ± 2,07*	0 (0,00)	30 (27,27)	59 (53,64)	19 (17,27)	2 (1,82)	0 (0,00)	0 (0,00)
<b>TOTAL</b>	<b>256</b>	<b>44,90± 2,41**</b>	<b>59 (1,05)**</b>	<b>1.156 (20,52)**</b>	<b>3.152 (55,98)</b>	<b>1.081 (19,19)**</b>	<b>168 (2,98)**</b>	<b>14 (0,25)**</b>	<b>1 (0,02)</b>

\*Diferencias significativas de cada individuo ( $p<0,05$ ) con el grupo control (tabla R-9).

\*\*Diferencias significativas de la media del grupo de estudio ( $p<0,05$ ) con el grupo control (tabla R-9).

**Tabla R-8:** Análisis de la recombinación meiótica en el grupo de pacientes criptozoospermicos.

Código muestra	Nº paquitenes analizadas	MLH1±DS	E0 (%)	E1 (%)	E2( %)	E3 (%)	E4 (%)	E5 (%)	E6(%)
<b>Cripto-1</b>	15	45,66 ± 3,06*	4 (1,21)	66 (20,00)	179 (54,24)	63 (19,09)	18 (5,45)	0 (0,00)	0 (0,00)
<b>Cripto-2</b>	4	49,75 ± 4,34	0 (0,00)	15 (17,05)	45 (51,14)	18 (20,45)	10 (11,36)	0 (0,00)	0 (0,00)
<b>Cripto-3</b>	15	51,00 ± 4,46	1 (0,30)	38 (11,52)	163 (49,39)	94 (28,48)	28 (8,48)	5 (1,52)	1 (0,30)
<b>Cripto-4</b>	12	48,83 ± 2,62	0 (0,00)	32 (12,12)	155 (58,71)	65 (24,62)	12 (4,55)	0 (0,00)	0 (0,00)
<b>Cripto-5</b>	5	42,60 ± 1,67*	0 (0,00)	27 (24,54)	65 ( 59,09)	16 (14,54)	2 (1,81)	0 (0,00)	0 (0,00)
<b>TOTAL</b>	<b>51</b>	<b>47,56 ± 4,63</b>	<b>5 (0,44)**</b>	<b>178 (15,86)</b>	<b>607 (54,09 )</b>	<b>256 (22,81)</b>	<b>70 (6,23)</b>	<b>5 (0,44 )</b>	<b>1 (0,08)</b>

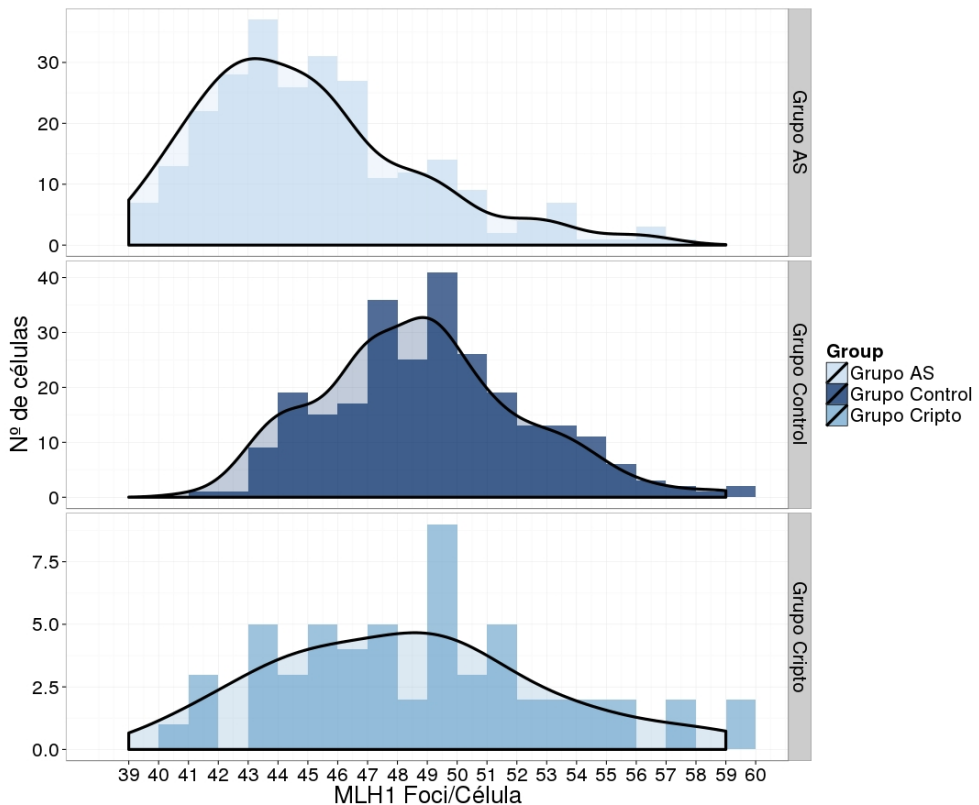
\*Diferencias significativas de cada individuo ( $p < 0,05$ ) con el grupo control (tabla R-9).

\*\*Diferencias significativas de la media del grupo de estudio ( $p < 0,05$ ) con el grupo control (tabla R-9).

**Tabla R-9:** Análisis de la recombinación meiótica en el grupo control.

Código muestra	Nº paquitenes analizadas	MLH1±DS	E0 (%)	E1 (%)	E2 (%)	E3 (%)	E4 (%)	E5 (%)	E6(%)
AO-16	48	48,50 ± 3,20	1 (0,09)	153 (14,56 )	592 (55,94)	257 (24,40)	51 (4,82)	2 (0,19)	0 (0,00)
AO-19	25	47,60 ± 2,75	1 (0,18)	84 (15,27)	299 (54,36)	136 (24,73)	26 (1,09)	4 (0,73)	0 (0,00)
AO-22	23	52,90 ± 3,34	0 (0,00)	56 (11,07 )	252 (49,80)	144 (28,46)	48 (9,49)	6 (1,19 )	0 (0,00)
AO-23	18	49,05 ± 3,26	1 (0,25)	55 (13,89)	223 (56,31)	90 (22,73)	24 (6,06)	3 (0,76)	0 (0,00)
AO-24	18	48,88 ± 4,01	0 (0,00)	59 (14,90)	221 (55,81)	89 (22,47)	22 (5,56)	4 (1,01)	1 (0,25)
AO-25	9	48,44 ± 3,32	1 (0,51)	34 (17,17)	100 (50,51)	55 (27,78)	7 (3,54)	1 (0,51)	0 (0,00)
AO-26	18	48,50 ± 3,27	1 (0,25 )	71 (17,93)	205 (51,77)	91 (22,98)	22 (5,56)	5 (1,26)	1 (0,25)
AO-31	42	47,90 ± 2,98	0 (0,00)	146 (15,80)	478 (51,73)	244 (26,40)	48 (5,19)	8 (0,86)	0 (0,00)
AO-32	33	48,27 ± 2,57	0 (0,00)	103 (14,18)	420 (57,85)	167 (23,00)	31 (4,26)	3 (0,68)	0 (0,00)
AO-34	27	47,37 ± 2,70	0 (0,00)	94 (15,82 )	346 (58,25)	126 (21,21)	25 (4,21)	3 (0,51)	0 (0,00)
<b>TOTAL</b>	<b>261</b>	<b>48,71 ± 1,55</b>	<b>5 (0,09)</b>	<b>855 (14,89)</b>	<b>3.136 (54,61)</b>	<b>1.399 (24,36)</b>	<b>304 (5,29)</b>	<b>41 (0,71)</b>	<b>2 ( 0,03)</b>

En la figura R-3 se muestra la distribución de frecuencias de los MLH1 foci por célula en cada uno de los grupos. Las gráficas, obtenidas utilizando la librería ggplot2 (versión 1.0.1) implementada en el software para análisis estadístico de datos R (versión 3.2.0) muestran que la frecuencia de recombinación como variable sigue una distribución normal en la población control. En el grupo de AS se observa que la media de las frecuencias se desplazan más hacia la izquierda que en los otros dos grupos.



**Figura R-3:** Distribución de los puntos de recombinación por célula en 261 espermatocitos en estadio de paquitene de los 10 pacientes control, 256 espermatocitos en estadio de paquitene de los 23 pacientes del grupo de azoospermia secretora y 51 espermatocitos en estadio de paquitene de los 5 pacientes del grupo de criptozoospermicos. (R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. H. Wickham. ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer New York, 2009).

En el caso de la gráfica correspondiente al grupo de pacientes con azoospermia secretora, observamos un pequeño sesgo hacia la izquierda, debido a que uno de los criterios de exclusión a la hora de analizar las figuras meióticas en estadio de paquitene, como ya se comentó en el apartado de materiales y métodos, fue presentar menos de 39 puntos de recombinación. En humanos, en la caracterización de la distribución de los puntos de recombinación, en cromosomas individuales, está establecido que cada autosoma presenta al menos dos puntos de recombinación, excepto los cromosomas acrocéntricos, que deben presentar como mínimo un punto de recombinación. Por lo que, diecisiete cromosomas no acrocéntricos por dos puntos de recombinación, da un total de treinta y cuatro puntos de recombinación, más un punto de recombinación por cada uno de los cinco cromosomas acrocéntricos, da un recuento mínimo total de treinta y nueve puntos de recombinación, el recuento mínimo de puntos de recombinación que debe presentar una célula en estadio de paquitene.

En el análisis de la media de recombinación por individuo, se incluyó el análisis pormenorizado del porcentaje de paquitenes de cada individuo que presentaron ausencia de entrecruzamientos y los que presentaron 1, 2, 3, 4, 5 o 6 entrecruzamientos. Se evaluó el porcentaje de bivalentes con diferente número de puntos de recombinación en los tres grupos (Ver tablas R-7, R-8 y R-9).

En la tabla R-10, se muestran los totales de las medias de recombinación y porcentajes con diferentes valores de entrecruzamiento en cada grupo. El análisis estadístico mostró que el grupo de pacientes con azoospermia secretora presentaba un porcentaje significativamente superior de bivalentes con 0 entrecruzamientos (1,05% vs. 0,09%;  $p \leq 0,0001$ ) y 1 entrecruzamiento (20,52% vs. 14,89%;  $p \leq 0,0001$ ) al compararlo con el grupo control, y una disminución significativa en el porcentaje de bivalentes con 3, 4 y 5 entrecruzamientos (19,19% vs. 24,36%;  $p \leq 0,0001$ ; 2,98% vs. 5,29%;  $p \leq 0,0001$  y 0,25% vs. 0,71%;  $p = 0,0005$ , respectivamente). Mientras que en el grupo de pacientes criptozoospermicos únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas

respecto al porcentaje de bivalentes con 0 entrecruzamientos al compararlo con el grupo control (0,44% vs. 0,09%;  $p=0,0142$ ).

Al comparar el grupo de pacientes con azoospermia secretora con el grupo de pacientes criptozoospermicos observamos también un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de bivalentes con 0 entrecruzamientos (1,05% vs. 0,44%;  $p=0,0372$ ) y 1 entrecruzamiento (20,52% vs. 15,86%;  $p=0,004$ ) y una disminución significativa en el porcentaje de bivalentes con 3 y 4 entrecruzamientos (19,19% vs. 22,81%;  $p=0,0061$  y 2,98% vs. 6,23%;  $p\leq 0,0001$ , respectivamente).

**Tabla R-10:** Análisis de los valores de entrecruzamientos globales de los tres grupos.

	Grupo azoospermia secretora	Grupo criptozoospermicos	Grupo Control
Nº de células en estadio de paquitene analizadas	256	51	261
Media de frecuencia de recombinación (MLH1±DS)	44,90 ± 2,41	47,56 ± 4,63	48,71 ± 1,55
% de SC con 0 entrecruzamientos (E0)	1,05 <sup>a,c</sup>	0,44 <sup>b,c</sup>	0,09 <sup>a,b</sup>
% de SC con 1 entrecruzamiento (E1)	20,52 <sup>d,e</sup>	15,86 <sup>e</sup>	14,89 <sup>d</sup>
% de SC con 2 entrecruzamientos (E2)	55,98	54,09	54,61
% de SC con 3 entrecruzamientos (E3)	19,19 <sup>f,g</sup>	22,81 <sup>g</sup>	24,36 <sup>f</sup>
% de SC con 4 entrecruzamientos (E4)	2,98 <sup>h,i</sup>	6,23 <sup>i</sup>	5,29 <sup>h</sup>
% de SC con 5 entrecruzamientos (E5)	0,25 <sup>j</sup>	0,44	0,71 <sup>j</sup>
% de SC con 6 entrecruzamientos (E6)	0,02	0,08	0,03

Test Chi-cuadrado con corrección de Yates. <sup>a,d,f,h,i,j</sup>  $p < 0,0001$ ; <sup>i</sup>  $p < 0,001$ ; <sup>b,c,e,g</sup>  $p < 0,05$

#### 5.4. Estudio de la frecuencia específica de recombinación meiótica por cromosoma.

El FISH secuencial permitió estudiar la frecuencia específica de recombinación meiótica identificando los bivalentes de los cromosomas 1, 4, 6, 13, 16, 18, 21 y 22. Se analizaron un total de 228 células en estadio de paquitene en el grupo control, 218 en el grupo de pacientes con azoospermia secretora y 31 en el grupo de pacientes criptozoospermicos. Se utilizaron para las comparaciones entre grupos el test estadístico t-Welch y la test t-student.

En el grupo de pacientes con azoospermia secretora se observó una media de frecuencia de recombinación significativamente inferior al compararla con la del grupo control para el cromosoma 1 ( $3,24 \pm 0,73$  vs.  $3,66 \pm 0,62$ ;  $p \leq 0,0001$ ), para el cromosoma 4 ( $2,42 \pm 0,59$  vs.  $2,67 \pm 0,66$ ;  $p = 0,0015$ ), para el cromosoma 6 ( $2,19 \pm 0,60$  vs.  $2,64 \pm 0,63$ ;  $p \leq 0,0001$ ), para el cromosoma 16 ( $1,67 \pm 0,48$  vs.  $1,88 \pm 0,51$ ;  $p \leq 0,0001$ ), para el cromosoma 18 ( $1,84 \pm 0,45$  vs.  $2,06 \pm 0,51$ ;  $p \leq 0,0001$ ), para el cromosoma 21 ( $0,95 \pm 0,21$  vs.  $1,00 \pm 0,15$ ;  $p = 0,074$ ) y para el cromosoma 22 ( $1,03 \pm 0,37$  vs.  $1,11 \pm 0,34$ ;  $p = 0,0307$ ) (ver tabla R-11).

La frecuencia de recombinación meiótica por cromosoma no pudo ser analizada en el caso del paciente AS-2 y el paciente AS-9, ya que tras la inmunotinción, el posterior procesado para FISH no permitió obtener figuras de calidad suficiente para su interpretación.

El grupo de pacientes criptozoospermicos mostró una frecuencia de recombinación significativamente inferior al compararla con la del grupo control únicamente para el cromosoma 18 ( $1,72 \pm 0,61$  vs.  $2,06 \pm 0,51$ ;  $p = 0,0023$ ) (ver tabla R-11). En este grupo de pacientes no se analizó la frecuencia de recombinación para los cromosomas 1,4 y 6 porque inicialmente la frecuencia de recombinación en este grupo comparada con el grupo control no fue significativamente diferente.



## RESULTADOS

Al comparar la frecuencia de recombinación por cromosoma entre el grupo de pacientes con azoospermia secretora y el de pacientes criptozoospermicos únicamente se observó una disminución significativa en el grupo de pacientes con azoospermia secretora en el cromosoma 22 ( $1,03 \pm 0,37$  vs.  $1,22 \pm 0,42$ ;  $p= 0,01$ ), y en el cromosoma 21 ( $0,95 \pm 0,21$  vs.  $1,00 \pm 0,10$ ;  $p= 0,0382$ ) (ver tabla R-11)

**Tabla R-11:** Estudio de la frecuencia específica de recombinación meiótica para los cromosomas 1, 4, 6, 13, 16, 18, 21 y 22 en los tres grupos.

	Grupo azoospermia secretora	Grupo Criptozoospermicos	Grupo Control
N° de paquitenes analizadas	218	31	228
MLH1±DS cromosoma 1	3,24 ± 0,73 <sup>a</sup>	-	3,66 ± 0,62 <sup>a</sup>
MLH1±DS cromosoma 4	2,42 ± 0,59 <sup>b</sup>	-	2,67 ± 0,66 <sup>b</sup>
MLH1±DS cromosoma 6	2,19 ± 0,60 <sup>c</sup>	-	2,64 ± 0,63 <sup>c</sup>
MLH1±DS cromosoma 13	1,95 ± 0,51	1,96 ± 0,41	2,03 ± 0,47
MLH1±DS cromosoma 16	1,69 ± 0,54 <sup>d</sup>	1,74 ± 0,44	1,88 ± 0,51 <sup>d</sup>
MLH1±DS cromosoma 18	1,84 ± 0,45 <sup>e, f</sup>	1,72 ± 0,61 <sup>f</sup>	2,06 ± 0,51 <sup>e</sup>
MLH1±DS cromosoma 21	0,95 ± 0,21 <sup>g,h</sup>	1,00 ± 0,10 <sup>h</sup>	1,00 ± 0,15 <sup>g</sup>
MLH1±DS cromosoma 22	1,03 ± 0,37 <sup>i, j</sup>	1,22 ± 0,42 <sup>j</sup>	1,11 ± 0,34 <sup>i</sup>

En el grupo de criptozoospermicos no se analizaron el cromosoma 1, el cromosoma 4 ni el cromosoma 6.

t- test; t-Welch <sup>a,c,d,e</sup>p<0,0001,<sup>f,f,i,j</sup>p≤0,01; <sup>ih</sup>p<0,05.

RESULTADOS

**Tabla R-12:** Estudio de la frecuencia específica de recombinación meiótica para los cromosomas 1, 4, 6, 13, 16, 18, 21 y 22 por individuo en el grupo de azoospermia secretora.

Código muestra	N° paquitenes analizadas	MLH1±DS cromosoma 1	MLH1±DS cromosoma 4	MLH1±DS cromosoma 6	MLH1±DS cromosoma 13	MLH1±DS cromosoma 16	MLH1±DS cromosoma 18	MLH1±DS cromosoma 21	MLH1±DS cromosoma 22
AS-1	4	3,00 ± 0,00	2,00 ± 0,0	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	1,50 ± 0,57	1,75 ± 0,50	0,66 ± 0,57	1,00 ± 0,00
AS-13	4	3,25 ± 0,5	2,00 ± 0,81	1,75 ± 0,50	1,75 ± 0,50	1,25 ± 0,95	1,75 ± 0,50	1,00 ± 0,00	0,75 ± 0,50
AS-19	14	3,46 ± 0,77	2,36 ± 0,50	2,25 ± 0,50	1,92 ± 0,61	1,41 ± 0,51	1,70 ± 0,48	0,85 ± 0,36	1,15 ± 0,55
AS-20	14	3,42 ± 0,64	2,21 ± 0,57	2,42 ± 0,93	2,07 ± 0,27	1,69 ± 0,48	2,00 ± 0,0	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00
AS-23	7	2,75 ± 0,50	2,50 ± 0,57	2,25 ± 0,50	1,57 ± 0,53	1,85 ± 0,37	1,85 ± 0,37	1,00 ± 0,00	0,83± 0,40
AS-24	9	3,87 ± 0,83	2,75 ± 0,46	2,37 ± 0,46	2,14 ± 0,37	2,00 ± 0,00	2,11 ± 0,33	1,00 ± 0,00	1,44 ± 0,52
AS-26	4	2,75 ± 0,50	2,33 ± 0,57	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	1,33 ± 0,57	1,75 ± 0,50	1,00 ± 0,00	0,75 ± 0,5
AS-27	3	3,33 ± 0,57	3,00 ± 0,00	2,33 ± 0,57	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
AS-30	39	3,31 ± 0,73	2,43 ± 0,62	2,06 ± 0,52	2,09 ± 0,52	1,75 ± 0,49	1,87 ± 0,49	0,95 ± 0,21	1,13 ± 0,35
AS-31	3	-	-	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
AS-34	22	3,50 ± 0,81	2,72 ± 0,57	2,35 ± 0,58	2,11 ± 0,48	1,73 ± 0,45	1,84 ± 0,37	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,34
AS-35	6	3,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,2 ± 0,83	1,80 ± 0,83	1,66 ± 0,57	1,00 ± 0,00	1,16 ± 0,40
AS-36	21	3,00 ± 0,66	2,00 ± 0,00	1,7 ± 0,48	2,07 ± 0,64	1,66 ± 0,59	1,78 ± 0,57	0,76 ± 0,43	0,91 ± 0,28
AS-37	13	2,25 ± 0,50	3,00 ± 0,00	2,0 ± 0,81	1,72 ± 0,46	1,66 ± 0,77	2,00 ± 0,00	0,91 ± 0,28	0,75 ± 0,05
AS-39	28	2,93 ± 0,57	2,00 ± 0,00	2,11 ± 0,47	1,88 ± 0,52	1,67 ± 0,47	2,00 ± 0,41	1,00 ± 0,00	0,92 ± 0,26
AS-44	5	3,00 ± 0,00	-	2,33 ± 0,57	1,66 ± 0,57	2,00 ± 0,00	1,5±0,57	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
AS-45	4	2,33 ± 1,15	-	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	1,66 ± 0,57	1,5±0,57	1,00 ± 0,00	1,25 ± 0,50
AS-48	6	3,33 ± 0,51	-	2,83 ± 0,40	2,00 ± 0,63	1,66 ± 0,81	1,83 ± 0,40	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
AS-49	3	4,00 ± 0,00	2,66 ± 0,57	-	1,66 ± 0,57	1,33 ± 0,57	1,33 ± 0,57	0,66 ± 0,57	1,00 ± 0,00
AS-51	5	3,00 ± 0,00	2,33 ± 0,57	-	1,80 ± 0,44	2,00± 0,70	1,66 ± 0,57	1,00 ± 0,00	1,40 ± 0,54
AS-52	4	3,25 ± 0,50	1,00 ± 0,00	2,50 ± 1,00	1,66 ± 0,57	1,50 ± 0,57	1,25± 0,50	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
<b>TOTAL</b>	<b>218</b>	<b>3,24 ± 0,72**</b>	<b>2,42 ± 0,59**</b>	<b>2,19 ± 0,60**</b>	<b>1,95 ± 0,51</b>	<b>1,69 ± 0,54**</b>	<b>1,84 ± 0,44**</b>	<b>0,95 ± 0,21**</b>	<b>1,03 ± 0,37**</b>

.\*\*Diferencias significativas de la media del grupo de estudio ( $p<0,05$ ) con el grupo control (tabla R-14).

**Tabla R-13:** Estudio de la frecuencia específica de recombinación meiótica para los cromosomas 13, 16, 18, 21 y 22 por individuo en el grupo de pacientes criptozoospermicos.

Código muestra	N° paquitenes analizadas	MLH1±DS cromosoma 13	MLH1±DS cromosoma 16	MLH1±DS cromosoma 18	MLH1±DS cromosoma 21	MLH1±DS cromosoma 22
<b>Cripto-1</b>	2	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	-	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
<b>Cripto-2</b>	4	1,50 ± 0,57	1,25 ± 0,15	-	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
<b>Cripto-3</b>	19	2,00 ± 0,34	1,89 ± 0,31	1,88 ± 0,48	1,00 ± 0,00	1,36 ± 0,49
<b>Cripto-4</b>	1	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
<b>Cripto-5</b>	5	2,20 ± 0,44	1,40 ± 0,54	1,60 ± 0,54	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
<b>TOTAL</b>	<b>31</b>	<b>1,96 ± 0,41</b>	<b>1,74 ± 0,44</b>	<b>1,72 ± 0,61**</b>	<b>1,00 ± 0,00</b>	<b>1,22 ± 0,42</b>

\*\*Diferencias significativas de la media del grupo de estudio ( $p < 0,05$ ) con el grupo control (tabla R-14).

**Tabla R-14:** Estudio de la frecuencia específica de recombinación meiótica para los cromosomas 1, 4, 6, 13, 16, 18, 21 y 22 por individuo en el grupo control.

Código muestra	N° paquitenes analizadas	MLH1±DS cromosoma 1	MLH1±DS cromosoma 4	MLH1±DS cromosoma 6	MLH1±DS cromosoma 13	MLH1±DS cromosoma 16	MLH1±DS cromosoma 18	MLH1±DS cromosoma 21	MLH1±DS cromosoma 22
AO-16	30	3,50 ± 0,71	-	2,46 ± 0,64	2,11 ± 0,47	1,78 ± 0,50	1,96 ± 0,20	1,00 ± 0,00	1,04 ± 0,20
AO-19	15	4,00 ± 0,00	-	2,78 ± 0,58	1,92 ± 0,49	1,93 ± 0,46	1,86 ± 0,38	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
AO-22	53	3,68 ± 0,64	3,05 ± 0,60	2,92 ± 0,49	2,07 ± 0,55	2,00 ± 0,53	2,28 ± 0,50	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
AO-23	13	3,45 ± 0,82	2,60 ± 0,84	2,50 ± 0,52	2,27 ± 0,47	2,16 ± 0,72	1,83 ± 0,72	1,09 ± 0,30	1,15 ± 0,55
AO-24	13	3,61 ± 0,51	2,60 ± 0,69	2,46 ± 0,66	2,12 ± 0,35	2,09 ± 0,30	2,20 ± 0,44	1,00 ± 0,00	1,22 ± 0,44
AO-25	8	3,83 ± 0,75	2,28 ± 0,48	2,12 ± 0,83	1,62 ± 0,52	2,00 ± 1,00	2,85 ± 1,06	0,87 ± 0,35	1,00 ± 0,53
AO-26	17	3,75 ± 0,68	2,78 ± 0,58	2,50 ± 0,57	2,08 ± 0,51	1,93 ± 0,25	2,10 ± 0,32	1,00 ± 0,36	1,31 ± 0,48
AO-31	41	3,57 ± 0,61	2,56 ± 0,65	3,00 ± 1,41	1,93 ± 0,44	1,89 ± 0,45	1,89 ± 0,56	1,03 ± 0,16	1,15 ± 0,37
AO-32	13	3,58 ± 0,67	2,53 ± 0,52	2,50 ± 0,71	1,90 ± 0,32	1,69 ± 0,48	2,16 ± 0,39	1,00 ± 0,00	1,09 ± 0,30
AO-34	25	3,81 ± 0,50	2,37 ± 0,57	2,00 ± 0,00	2,04 ± 0,21	1,88 ± 0,44	1,75 ± 0,44	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
<b>TOTAL</b>	<b>228</b>	<b>3,24 ± 0,73</b>	<b>2,42 ± 0,59</b>	<b>2,19 ± 0,60</b>	<b>1,95 ± 0,51</b>	<b>1,69 ± 0,54</b>	<b>1,84 ± 0,45</b>	<b>0,95 ± 0,21</b>	<b>1,03 ± 0,37</b>

### 5.5. Incidencia de anomalías cromosómicas en espermatozoides testiculares

Se realizó FISH de espermatozoides de testículo tanto al grupo control como a los dos grupos de estudio. Se utilizó un test estadístico Chi-cuadrado con corrección de Yates ( $p < 0,05$ ) para comparar la incidencia de anomalías numéricas observadas.

En los pacientes AS-20, AS-39 y AS-52 no se encontraron espermatozoides el día de la biopsia para su utilización en un ciclo de ICSI. En el tejido testicular residual donado a este proyecto tampoco se observaron espermatozoides en ninguna de las extensiones realizadas.

En la tabla R-17 se muestran los resultados del análisis del grupo control, en el que se evaluaron un total de 47.834 espermatozoides procedentes de testículo.

En el grupo de pacientes con azoospermia secretora se evaluaron un total de 48.240 espermatozoides testiculares. La comparación de los resultados con el grupo control mostró un incremento estadísticamente significativo de disomías para los cromosomas sexuales (0,46% vs. 0,11%;  $p < 0,0001$ ), así como de disomías para el cromosoma 13 (0,13% vs. 0,01%;  $p < 0,0001$ ), para el cromosoma 18 (0,02% vs. 0,00%;  $p = 0,0266$ ) y para el cromosoma 21 (0,18% vs. 0,04%;  $p < 0,0001$ ). Se observó también un incremento significativo en la incidencia de aneuploidías totales y de diploidía total (0,41 % vs. 0,08%;  $p < 0,0001$  y 0,08% vs. 0,01%;  $p < 0,0001$ ). Las comparaciones individuales con el grupo control para cada uno de los cromosomas analizados se muestra en la tabla R-15.

## RESULTADOS

En el grupo de pacientes criptozoospermicos se evaluaron 20.866 espermatozoides testiculares (ver tabla R-16). Al compararlo con el grupo control, se observó un incremento significativo en la incidencia de disomías para los cromosomas sexuales (0,25% vs. 0,11%;  $p=0,0022$ ), y para el cromosoma 18 (0,12% vs. 0,00%;  $p<0,0001$ ), así como de aneuploidías totales y diploidía total (0,41% vs. 0,08%;  $p<0,0001$  y 0,08% vs. 0,01%;  $p<0,0001$ , respectivamente).

**Tabla R-15:** Incidencia de anomalías cromosómicas en el grupo de pacientes con azoospermia secretora.

Código muestra	Espermatozoides analizados		DISOMÍAS AUTOSOMAS (%)			DISOMÍAS CROMOSOMAS SEXUALES (%)				ANEUPLOIDÍA TOTAL (%)	DIPLOIDÍA TOTAL (%)
	X/Y/18	13/21	Cromosoma 13	Cromosoma 18	Cromosoma 21	XX	XY	YY	Total		
AS-1	22	8	2 (25)*	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (9,09)	1 (4,54)	3 (13,6)*	5 (16,6)*	0 (0,00)
AS-2	1.831	754	8 (1,06)*	0 (0,00)	3 (0,40)*	0 (0,00)	8 (0,43)	2 (0,11)	10 (0,54)*	21 (0,81)*	9 (0,35)*
AS-9	3.184	627	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,32)*	0 (0,00)	7 (0,22)	0 (0,00)	7 (0,22)	9 (0,23)*	1 (0,03)
AS-13	834	841	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,12)	1 (0,12)	2 (0,24)	4 (0,47)*	4 (0,24)	2 (0,12)*
AS-19	621	369	1 (0,27)	0 (0,00)	1 (0,27)	0 (0,00)	3 (0,48)	0 (0,00)	3 (0,48)*	5 (0,50)*	1 (0,10)
AS-23	836	197	1 (0,51)*	0 (0,00)	3 (1,52)*	2 (0,23)	5 (0,60)	0 (0,00)	7 (0,84)*	11 (1,06)*	3 (0,29)*
AS-24	804	454	1 (0,22)	1 (0,12)*	2 (0,44)*	1 (0,12)	1 (0,12)	0 (0,00)	2 (0,25)	5 (0,35)*	2 (0,14)*
AS-26	164	73	1 (1,4)*	0 (0,00)	2 (2,73)*	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (1,26)*	2 (0,84)*
AS-27	355	190	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,56)	0 (0,00)	2 (0,56)	2 (0,36)	0 (0,00)
AS-30	239	549	1 (0,18)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,13)	0 (0,00)
AS-31	724	268	0 (0,00)	1 (0,14)*	0 (0,00)	1 (0,14)	2 (0,27)	0 (0,00)	3 (0,41)	4 (0,40)*	2 (0,20)*
AS-34	4.765	4.216	0 (0,00)	1 (0,02)	0 (0,00)	2 (0,04)	18 (0,38)	5 (0,10)	25 (0,52)*	26 (0,29)*	2 (0,02)
AS-35	526	664	2 (0,30)*	0 (0,00)	2 (0,30)*	1 (0,19)	0 (0,00)	2 (0,38)	3 (0,57)*	7 (0,59)*	2 (0,16)*
AS-36	2.263	3.587	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,03)	0 (0,00)	8 (0,35)	1 (0,04)	9 (0,40)*	10 (0,17)	4 (0,07)*
AS-37	934	256	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (2,34)*	0 (0,00)	1 (0,11)	2 (0,21)	3 (0,32)	9 (0,75)*	6 (0,50)*
AS-44	771	289	1 (0,34)	1 (0,13)*	1 (0,35)	3 (0,39)	7 (0,90)	1 (0,13)	11 (1,42)*	14 (1,3)*	1 (0,09)
AS-45	2.397	2.931	3 (0,10)*	1 (0,04)	5 (0,17)*	2 (0,08)	8 (0,33)	2 (0,08)	12 (0,50)*	21 (0,39)*	0 (0,00)
AS-48	2.038	1.650	2 (0,12)	0 (0,00)	3 (0,18)	3 (0,15)	6 (0,29)	1 (0,05)	9 (0,44)*	14 (0,38)*	1 (0,03)
AS-49	3.848	1.765	1 (0,05)	1 (0,02)	5 (0,28)*	2 (0,05)	7 (0,18)	3 (0,07)	12 (0,31)*	19 (0,34)*	3 (0,05)*
AS-51	952	444	2 (0,45)*	1 (0,10)*	1 (0,22)	0 (0,00)	4 (0,42)	1 (0,10)	5 (0,52)*	9 (0,64)*	2 (0,14)*
<b>TOTAL</b>	<b>28.108</b>	<b>20.132</b>	<b>26 (0,13)**</b>	<b>7 (0,02)**</b>	<b>37 (0,18)**</b>	<b>18 (0,06)</b>	<b>90 (0,32)</b>	<b>22 (0,08)</b>	<b>130 (0,46)**</b>	<b>199 (0,41)**</b>	<b>39 (0,08)**</b>

\*Diferencias significativas de cada individuo ( $p < 0,05$ ) con el grupo control (tabla R-14). \*\*Diferencias significativas del grupo de estudio ( $p < 0,05$ ) con el grupo control (tabla R-14).



**Tabla R-16:** Incidencia de anomalías cromosómicas en el grupo de pacientes criptozoopérmicos.

Código muestra	Espermatozoides analizados		DISOMÍAS AUTOSOMAS (%)			DISOMÍAS CROMOSOMAS SEXUALES (%)				ANEUPLOIDÍA TOTAL (%)	DIPLOIDÍA TOTAL (%)
	X/Y/18	13/21	Cromosoma 13	Cromosoma 18	Cromosoma 21	XX	XY	YY	Total		
<b>Cripto-1</b>	5.869	6.298	2 (0,03)	0 (0,00)	3 (0,05)	0 (0,00)	2 (0,03)	0 (0,00)	2 (0,03)	7 (0,06)*	0 (0,00)
<b>Cripto-2</b>	926	1.024	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (0,29)*	0 (0,00)	6 (0,65)	1 (0,11)	7 (0,75)	10 (0,51)*	6 (0,30)
<b>Cripto-3</b>	994	1.504	1 (0,07)	0 (0,00)	5 (0,33)*	0 (0,00)	7 (0,70)	2 (0,20)	9 (0,09)	15 (0,60)*	2 (0,08)
<b>Cripto-4</b>	2.072	2.062	0 (0,00)	1 (0,05)	0 (0,00)	2 (0,10)	1 (0,05)	0 (0,00)	3 (0,14)	4 (0,10)	0 (0,00)
<b>Cripto-5*</b>	83	34	0 (0,00)	1 (1,2)*	0 (0,00)	1 (1,2)	3 (3,6)	0 (0,00)	4 (4,8)	5 (4,3)*	0 (0,00)
<b>TOTAL</b>	<b>9.944</b>	<b>10.922</b>	<b>3 (0,03)</b>	<b>12 (0,12)**</b>	<b>11 (0,10)</b>	<b>3 (0,03)</b>	<b>19 (0,19)</b>	<b>3 (0,03)</b>	<b>25 (0,25)**</b>	<b>36 (0,17) **</b>	<b>8 (0,04)**</b>

\* En el paciente Cripto 5, por limitaciones técnicas no se pudieron analizar más espermatozoides.

\*\* Diferencias significativas de cada individuo ( $p < 0,05$ ) con el grupo control (tabla R-14). \*\*\* Diferencias significativas del grupo de estudio ( $p < 0,05$ ) con el grupo control (tabla R-14).

Tabla R-17: Incidencia de anomalías cromosómicas en el grupo control.

Código muestra	Espermatozoides analizados		DISOMÍAS AUTOSOMAS (%)			DISOMÍAS CROMOSOMAS SEXUALES (%)				ANEUPLOIDÍA TOTAL (%)	DIPLOIDÍA TOTAL (%)
	X/Y/18	13/21	Cromosoma 13	Cromosoma 18	Cromosoma 21	XX	XY	YY	Total		
AO-16	4.102	3.623	1 (0,03)	0 (0,00)	5 (0,14)	2 (0,05)	5 (0,12)	4 (0,10)	11 (0,27)	17 (0,22)	2 (0,02)
AO-19	2.047	1.296	2 (0,15)	0 (0,00)	3 (0,23)	0 (0,00)	3 (0,15)	0 (0,00)	3 (0,15)	8 (0,24)	1 (0,03)
AO-22	526	86	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,19)	0 (0,00)	1 (0,19)	2 (0,33)	0 (0,00)
AO-23	6.351	995	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	5 (0,08)	0 (0,00)	5 (0,08)	5 (0,07)	1 (0,01)
AO-24	2.493	351	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,04)	2 (0,08)	1 (0,04)	4 (0,16)	4 (0,14)	0 (0,00)
AO-25	1.052	1.555	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,09)	0 (0,00)	1 (0,09)	1 (0,04)	0 (0,00)
AO-26	1.755	610	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,06)	2 (0,11)	0 (0,00)	3 (0,17)	3 (0,13)	0 (0,00)
AO-31	1.296	1.558	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
AO-32	1.178	1.008	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
AO-34	6.251	9.701	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
<b>TOTAL</b>	<b>27.051</b>	<b>20.783</b>	<b>3 (0,01)</b>	<b>0 (0,00)</b>	<b>8 (0,04)</b>	<b>4 (0,01)</b>	<b>19 (0,07)</b>	<b>5 (0,02)</b>	<b>29 (0,11)</b>	<b>40 (0,08)</b>	<b>4 (0,01)</b>

**Tabla R-18:** Incidencia de aneuploidías y diploidías globales de los tres grupos en espermatozoides testiculares.

	Grupo azoospermia secretora (n=23)	Grupo criptozoospermicos (n=5)	Grupo Control (n=10)
<b>N° espermatozoides evaluados X/Y/18</b>	28.108	9.944	27.051
<b>N° espermatozoides evaluados 13/21</b>	20.132	10.922	20.783
<b>% Disomías cromosomas sexuales</b>	0,46 <sup>a,c</sup>	0,25 <sup>b,c</sup>	0,11 <sup>a,b</sup>
<b>% Disomías cromosoma 13</b>	0,13 <sup>d,e</sup>	0,03 <sup>e</sup>	0,01 <sup>d</sup>
<b>% Disomías cromosoma 18</b>	0,02 <sup>f,h</sup>	0,12 <sup>g,h</sup>	0,00 <sup>f,g</sup>
<b>% Disomías cromosoma 21</b>	0,18 <sup>i</sup>	0,10	0,04 <sup>i</sup>
<b>% TOTAL ANEUPLOIDIAS</b>	0,46 <sup>j,l</sup>	0,17 <sup>k,l</sup>	0,08 <sup>j,k</sup>
<b>% DIPLOIDIA TOTAL</b>	0,08 <sup>m</sup>	0,04 <sup>n</sup>	0,01 <sup>m,n</sup>

Test Chi-cuadrado con corrección de Yates <sup>a,d,g,i,j,l</sup>  $p < 0,0001$ ; <sup>b,c,h</sup>  $p \leq 0,001$ ; <sup>e,k</sup>  $p \leq 0,01$ ; <sup>f,n</sup>  $p < 0,05$

## 6. DISCUSIÓN



## 6.1. ACERCA DE LA HIPÓTESIS DE TRABAJO

En varones infértiles con un factor masculino severo y cariotipo normal se han descrito tanto alteraciones en la meiosis como un incremento en la incidencia de aneuploidías en sus espermatozoides, especialmente en aquellos varones con azoospermia secretora.

La introducción en el campo de la reproducción asistida de técnicas como la 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'tVeld *et al.*, 1995; Bonduelle *et al.*, 1998).

Las aneuploidías en los espermatozoides pueden tener un impacto negativo en los resultados reproductivos a diferentes niveles: tasas de fecundación (Nicopoullos *et al.*, 2008), desarrollo embrionario e implantación (Panget *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2001), abortos (Giorlandino *et al.*, 1998, Rubio *et al.*, 2001, Bernardini *et al.*, 2004, Al-Hassan *et al.*, 2005) e incluso descendencia (Blanco *et al.*, 1998; Moosani *et al.*, 1999; Eskenazi *et al.*, 2002, Rodrigo *et al.*, 2010), observándose cómo tasas elevadas de espermatozoides con alteraciones cromosómicas numéricas dan lugar a una mayor tasa de embriones anormales, destacando una elevada incidencia de aneuploidías para los cromosomas sexuales y de embriones mosaico (Silber *et al.*, 2003; Rodrigo *et al.*, 2010).

Por ello es importante realizar estudios en la línea germinal para entender los mecanismos que conducen a problemas cromosómicos en la descendencia en varones con infertilidad masculina severa y cariotipos normales.

Por este motivo nos planteamos estudiar el origen de estas anomalías cromosómicas y sus posibles causas, en varones con azoospermia secretora de origen idiopático, centrándonos en la recombinación meiótica entre cromosomas homólogos por ser un evento esencial para que se produzca la correcta segregación de los cromosomas en la meiosis.

Por la experiencia clínica y por publicaciones anteriores sabíamos que en casos de factor masculino severo y más concretamente en azoospermias secretoras, los resultados reproductivos tras ICSI eran peores. Por otro lado, los estudios en espermatozoides mostraban mayor riesgo de aneuploidías. Por ello, nos planteamos estudiar el origen de estas anomalías y sus causas.

## 6.2. ACERCA DEL DISEÑO DEL ESTUDIO

La limitación principal del presente estudio fue conseguir pacientes que quisieran participar en el mismo. Por las características de los pacientes no siempre se obtuvieron espermatozoides testiculares para realizar su tratamiento reproductivo planificado, por lo que en muchas ocasiones su estado de ánimo no era el más favorabley decidieron no participar.

Una vez salvado este obstáculo, otra limitación era la calidad y la cantidad de tejido del que partíamos, ya que trabajábamos con el remanente de tejido testicular que en condiciones normales se desecha tras la obtención y la congelación de los espermatozoides por parte del laboratorio de FIV.

Nos encontramos además, con un porcentaje de muestras del 54,90% donde no se observaron células de la línea germinal, por lo que una vez procesadas no se pudieron evaluar las diferentes variables del estudio.

La utilización de las mismas preparaciones celulares para el estudio de las diferentes variables tuvo como limitación el deterioro de las muestras en algunos casos, por lo que en algún paciente no se pudieron completar todos los análisis. A pesar de ello, nuestro

estudio con 23 pacientes incluidos representa la mayor serie de pacientes con azoospermia secretora en los que se han realizado este tipo de estudios.

Otro aspecto relevante de nuestro estudio fue la posibilidad de tener un grupo control de pacientes con una vasectomía, de fertilidad probada y espermatogénesis conservada, donde además confirmamos mediante FISH que ninguno de ellos presentaba incremento de anomalías cromosómicas en sus espermatozoides.

Por último, la posibilidad de haber podido analizar las diferentes variables en muestras de los mismos pacientes, nos ha permitido realizar correlaciones entre los diferentes parámetros.

#### **6.2.1. Elección del grupo control de pacientes con azoospermia obstructiva post-vasectomizados**

En trabajos anteriores de nuestro grupo (Rodrigo *et al.*, 2011), se había determinado la incidencia basal de anomalías cromosómicas en espermatozoides procedentes de testículo en pacientes fértiles y se había propuesto que para estudios de anomalías cromosómicas en espermatozoides procedentes de testículo el grupo control más adecuado serían los espermatozoides testiculares de varones fértiles pre-vasectomizados y no los espermatozoides procedentes de eyaculado utilizado en otros trabajos.

En este sentido se describió que las muestras de varones normozoospermicos procedentes de testículo mostraban un incremento de aneuploidías al compararlas con las procedentes de eyaculado de un mismo varón.

El grupo control propuesto en el presente estudio está formado por varones con vasectomía a los que se les realizó biopsia testicular con fines reproductivos. Los valores de aneuploidías de nuestro grupo control de varones post-vasectomía fueron comparados con los anteriormente publicados por Rodrigo y colaboradores (espermatozoides testiculares de varones pre-vasectomizados) y confirmamos que los valores eran similares, pudiendo afirmar que el ambiente endocrino del testículo tras la



vasectomía no produjo un incremento de aneuploidias en los varones incluidos en nuestro grupo control, y por lo tanto los resultados eran representativos de una población con meiosis normal.

Otros estudios publicados (Topping *et al.*, 2006; Gonsalves *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2005) incluyen en el grupo control pacientes con infertilidad de causa conocida no asociada inicialmente a defectos meióticos en los que incluyen además de pacientes con azoospermia obstructiva post-vasectomía pacientes diagnosticados con cáncer, esto condiciona la validez del grupo como control de meiosis y espermatogénesis conservada, ya que algunos estudios han descrito en pacientes con linfoma de Hodgkin's un incremento significativo de aneuploidias en sus espermatozoides al analizarlos antes de que se hubieran sometido a ningún tratamiento de quimioterapia o radioterapia previamente, apuntando a que quizá la aparición del cáncer induciría por si misma problemas en la meiosis en estos pacientes (Eisenberg *et al.*, 2013).

### 6.2.2. Selección de los grupos de estudio

La recombinación meiótica es un evento que no solo genera diversidad genética, sino que además los entrecruzamientos mantienen unidos a los cromosomas homólogos facilitando de este modo una correcta segregación de los cromosomas durante la meiosis. Anomalías en la frecuencia y la localización de los entrecruzamientos está asociada a una no disyunción de los cromosomas homólogos y a la producción de gametos aneuploides (Savage *et al.*, 1998; Hassold *et al.*, 1995; Lamb *et al.*, 1996; Ferguson *et al.*, 2007). Dentro de la población de varones infértiles el grupo de varones con azoospermia secretora de origen idiopático presenta meiosis anormal en el 30% de los casos presentan meiosis anormal (ASESA, 2005), por lo que representa el grupo de mayor riesgo y por ello fue el grupo seleccionado para el estudio. Otra consideración importante fue el hecho de que estos pacientes ya se iban a someter a una biopsia testicular con fines reproductivos por lo que no hubo que realizar una intervención adicional. Al procesar las muestras del grupo de estudio diferenciamos entre aquellos pacientes que inicialmente cuando llegaron a la clínica para un tratamiento de reproducción eran criptozoospermicos y que cuando fueron reclutados para este estudio fueron diagnosticados como azoospermicos.

### 6.3. ACERCA DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA

#### 6.3.1. Lo que nos han enseñado las técnicas de inmunocitogenética sobre la meiosis masculina

En los casos de espermatogénesis anormal, las técnicas inmunocitogenéticas han proporcionado una nueva herramienta de aproximación para el estudio de la infertilidad de origen idiopático, justificando aproximadamente el 10% de los casos de azoospermia secretora de origen desconocido (Topping *et al.*, 2006).

La posibilidad de estudiar las primeras etapas de la meiosis de una forma directa mediante el análisis del complejo sinaptonémico y de los puntos de recombinación, en lugar de mapas de ligamiento ha revolucionado la investigación en el campo de la meiosis. Durante estos últimos años se han publicado varios estudios en varones fértiles con espermatogénesis conservada (Lynn *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004c; Brown *et al.*, 2005), y un número más reducido de estudios en varones infértiles, muchos de ellos como casos únicos (Sun *et al.*, 2004; Judis *et al.*, 2004;) o como series pequeñas de pacientes (Lynn *et al.*, 2004; Gonsalves *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2005a; Codina-Pascual *et al.*, 2005; Topping *et al.*, 2006).

- **Progresión meiótica**

El análisis de la distribución de tres de los estadios iniciales de la profase I de la meiosis: leptotene, zigotene y paquitene, muestran que el estadio de paquitene es el más frecuente en las muestras del grupo control debido a que es el estadio de mayor duración en la espermatogénesis normal (15 días) siendo menos frecuente los estadios de leptotene y zigotene, tal y como ha observado en otros estudios publicados (Tassitro *et al.*, 2009).

En el grupo de pacientes con azoospermia secretora y en el grupo de pacientes criptozoospermicos, se observó un incremento de células meióticas en los estadios de leptotene y zigotene y una disminución en el porcentaje de células en estadio de paquitene, al compararlo con el grupo control. Esta acumulación de espermátocitos

primarios tempranos confirma que la progresión meiótica es defectuosa en pacientes con fallos en la espermatogénesis. El punto de control en paquitene 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). Si no se produce el bloqueo meiótico, el espermatocito primario puede progresar la meiosis sin dividirse y dar lugar a espermatocitos secundarios diploides, que culminarán en dos gametos diploides tras la segunda división meiótica (Egozcue *et al.*, 2000a; Vendrell, 2005).

El porcentaje de espermatocitos primarios en estadio de diplotene es prácticamente imperceptible tanto en el grupo control como en los grupos de estudio coincidiendo con los datos publicados por Sun *et al.*, 2007.

- **Medición de la longitud total de los complejos sinaptonémicos (CS)**

La longitud de los complejos sinaptonémicos se ha relacionado con el grado de compactación del ADN y con su accesibilidad a los diferentes mecanismos que dan lugar a la rotura y reparación del ADN.

En el presente estudio, en el grupo control el rango en la longitud total de los complejos sinaptonémicos fue de 201,69  $\mu\text{m}$  - 411,32  $\mu\text{m}$ , similar a lo publicado por otros autores: 220  $\mu\text{m}$  - 360  $\mu\text{m}$  (Lynn *et al.*, 2002) y 200  $\mu\text{m}$  - 448  $\mu\text{m}$  (Pan *et al.*, 2012) y comparable tanto a las medidas obtenidas en el grupo de pacientes con azoospermia secretora (205,19  $\mu\text{m}$  - 415,78  $\mu\text{m}$ ) y en el grupo de pacientes criptozoospermicos (218,79  $\mu\text{m}$  - 369,04). Observamos una discreta variabilidad entre los individuos dentro de cada uno de los grupos de estudio y del grupo control. Algunos autores apuntan a la idea de que esta variación se puede producir además dentro de las diferentes células de un mismo individuo y que estas diferencias de la longitud total de los complejos sinaptonémicos podrían deberse a que las longitudes varían en función del momento del estadio de paquitene en que se encuentra la célula (Pan *et al.*, 2012).

- **Análisis de la frecuencia de recombinación meiótica**

Los mapas de ligamiento han sido utilizados como herramienta para el estudio de la recombinación meiótica en humanos, pero tienen dos limitaciones importantes. En primer lugar, requieren una buena caracterización de al menos tres generaciones y en segundo lugar, el enfoque se basa en el análisis de los productos haploides transmitidos en vez de células en el proceso de meiosis, por lo que sólo se pueden detectar la mitad de los entrecruzamientos. Es por ello que las técnicas de inmunocitogenética sobre espermatoцитos primarios nos dan una mejor aproximación, de forma más sencilla y directa, al proceso de recombinación meiótica, pudiendo detectar todos los entrecruzamientos de cada uno de los cromosomas en la célula meiótica y visualizarse de forma simultánea. Se han realizado diferentes estudios, inicialmente en ratones (Baker *et al.*, 1996) y más tarde en humanos (Gonsalves *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2005b; Lynn *et al.*, 2004), que han confirmado que la proteína MLH1, proteína de reparación del ADN, se co-localiza con los puntos de recombinación y los datos obtenidos de esta aproximación coinciden con los descritos en análisis genéticos de mapas de ligamiento (Lynn *et al.*, 2002) y los principios básicos de la meiosis. Utilizando pues, anticuerpos frente a MLH1 podemos visualizar los puntos de recombinación en las células meióticas en estadio de paquitene.

En nuestro estudio utilizando técnicas inmunocitogenéticas, hemos observado una frecuencia de recombinación meiótica para el grupo control de  $48,71 \pm 1,55$ , casi el doble de la media de recombinación descrita por estudios basados en mapas de ligamiento con valores de 25,9 a 27,3 (Chowdhury *et al.*, 2009; Cheung *et al.*, 2007; Coop *et al.*, 2008; Petkov *et al.*, 2007).

El análisis de la frecuencia de recombinación meiótica en nuestro estudio mostró una disminución en el grupo de pacientes con azoospermia secretora comparado con el grupo control, con una media de  $44,90 \pm 2,41$  coincidiendo con los resultados de otros estudios publicados (Gonsalves *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2005a,b; Sun *et al.*, 2007) y en contraposición a otros estudios en los que no encontraron diferencias (Topping *et al.*, 2006;

Ma *et al.*, 2006a; Sun *et al.*, 2008) debido quizá al tamaño muestral de los grupos y la heterogeneidad de los mismos, y a criterios de evaluación menos estrictos.

Esta disminución no fue significativa en el grupo de pacientes que inicialmente eran criptozoospermicos y que en el momento del estudio fueron diagnosticados como azoospermicos.

En un estudio publicado en 2009 por Hassold y colaboradores, en el que utilizaron como modelo biomédico el mono Rhesus (*Macaca mulatta*), analizaron el número y la localización de MLH1 en 483 espermatoцитos en estadio de paquitene de 11 machos de Rhesus. La frecuencia de recombinación media que observaron fue de  $39,0 \pm 3,0$ , mucho menor que en humanos, lo que puede significar que entre mamíferos el número y la distribución de entrecruzamientos está sujeto a una regulación específica de especie, ya que en estudios realizados en ratones también se han observado diferencias (Lynn *et al.*, 2002).

Nuestros datos muestran una variación en la frecuencia de recombinación meiótica entre individuos dentro del mismo grupo, en el caso del grupo de pacientes con azoospermia secretora con un rango de  $41,50 \pm 2,12$  a  $51,58 \pm 4,31$ , en el caso del grupo de pacientes criptozoospermicos de  $42,60 \pm 1,67$  a  $51,00 \pm 4,46$ , y en el caso del grupo control de  $47,37 \pm 2,70$  a  $52,90 \pm 3,34$ , coincidiendo con lo publicado por otros grupos. Estudios recientes apuntan a que mecanismos epigenéticos podrían afectar a la frecuencia de recombinación (Winckler *et al.*, 2005; Neumann and Jeffreys, 2006; Sandovici *et al.*, 2006). En este sentido, la metilación como modificación epigenética se produce en la profase I cuando ocurre la recombinación. Kong y colaboradores (2002) y Myers y colaboradores (2006) demostraron que la densidad de islas CpG estaba directamente correlacionada con la frecuencia de recombinación en humanos. Otros autores (Flanagan *et al.*, 2006; Sigurdsson *et al.*, 2009) han encontrado una correlación positiva entre los patrones de metilación en la línea germinal y la frecuencia de recombinación en humanos. En regiones cromosómicas reguladas por imprinting se han descrito "puntos calientes" de recombinación (hotspots) (Sandovici *et al.*, 2006; Arheim *et al.*, 2007). Así pues, diferencias

en la metilación en la línea germinal podrían justificar la variación de la recombinación entre individuos.

Hay estudios epidemiológicos de metilación publicados que apuntan a que existe una relación entre la infertilidad masculina y las anomalías epigenéticas. Un posible nexo entre las anomalías de metilación en regiones reguladas por imprinting genético y la disminución en la concentración de espermatozoides podría residir en el bloqueo meiótico que se produciría en espermatozoides con patrones de metilación alterados. La presencia de anomalías en la metilación podría producir alteraciones en el emparejamiento de los cromosomas en la meiosis activando de este modo los puntos de control de la meiosis, bloqueando la línea de células con anomalías, reduciendo de este modo el número final de espermatozoides (Camprubí *et al.*, 2012).

- **Estudio de la frecuencia específica de recombinación meiótica por cromosoma**

Varios estudios han combinado la inmunofluorescencia y el FISH para analizar espermatoцитos primarios en estadio de paquitene para caracterizar los patrones de recombinación específicos por cromosoma en varones fértiles (Tease *et al.*, 2004; Codina-Pascual *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006). Sin embargo, no disponemos de mucha información sobre las frecuencias específicas por cromosoma en la población infértil. Ferguson y colaboradores (2007) analizaron la frecuencia de recombinación de los cromosomas 13, 18 y 21 y observaron que en los tres autosomas la frecuencia de recombinación era significativamente inferior en su grupo de pacientes con azoospermia secretora y con OATal compararlos con su grupo control.

El análisis de nuestros datos muestra una media de frecuencia de recombinación específica para los cromosomas 1, 4, 6, 16, 18, 21 y 22 significativamente inferior en el grupo de pacientes con azoospermia secretora comparado con el grupo control de pacientes post-vasectomizados. Así pues se confirma que el efecto en la disminución de la recombinación se refleja en cromosomas pertenecientes a los diferentes grupos cromosómicos, independientemente de su tamaño y estructura.

Si consideramos que la recombinación es esencial para la correcta segregación de los cromosomas homólogos durante la meiosis (Koehler *et al.*, 1996), la disminución de las frecuencias de recombinación observadas tanto a nivel global como específicas de cromosoma en varones infértiles podrían explicar en esta población el incremento en el riesgo de producir espermatozoides aneuploides y por consiguiente incrementar el riesgo de descendencia con anomalías cromosómicas.

### **6.3.2. El FISH como técnica de estudio de aneuploidías en espermatozoides**

Los estudios publicados de FISH en espermatozoides han mostrado un incremento significativo en la incidencia de anomalías cromosómicas numéricas en de varones infértiles, principalmente para los cromosomas sexuales y en pacientes OAT (Aran *et al.*, 1999; Bernardini *et al.*, 1998, 2000; Calogero *et al.*, 2001a,b; Colombero *et al.*, 1999; Rubio *et al.* 2001; Vegetti *et al.*, 2000). Algunos estudios han encontrado una incidencia de anomalías cromosómicas similar en espermatozoides procedentes de testículo en varones con azoospermia secretora (Martin *et al.*, 2000) y en varones con azoospermia obstructiva (Viville *et al.*, 2000) al compararlos con espermatozoides de varones fértiles procedentes de eyaculado. Sinembargo, la mayor parte de los estudios muestran un incremento de anomalías cromosómicas en espermatozoides procedentes de testículo, principalmente en varones con azoospermia secretora (Bernardini *et al.*, 2000; Burrello *et al.*, 2002; Levron *et al.*, 2001; Mateizel *et al.*, 2002; Palermo *et al.*, 2002), al compararlos con donantes normozoospermicos y estas diferencias son más evidentes para los cromosomas sexuales (Rodrigo *et al.*, 2004).

Los resultados de nuestro estudio muestran un incremento de aneuploidías para todos los cromosomas analizados (13,18, 21, X e Y) y de diploidías en el grupo de pacientes con azoospermia secretora al compararlos con el grupo control tal y como esperábamos, coincidiendo con lo descrito en otros estudios publicados.

En el grupo de pacientes criptozoospermicos este incremento en la incidencia de aneuploidías se observó únicamente para el cromosoma 18, los cromosomas sexuales y para la incidencia de diploidías.

En el caso del paciente *Cripto-3*, tuvimos la oportunidad de comparar los resultados de FISH de espermatozoides en eyaculado ya que estaba documentado en su historia clínica, y compararlo con los resultados del FISH en espermatozoides testiculares, cuando su criptozoospermia evolucionó a azoospermia de origen idiopático. En ambos casos el FISH dio un resultado alterado con un incremento de disomías para los cromosomas sexuales.

Mediante los estudios de FISH en espermatozoides se han podido identificar grupos de varones con cariotipo normal que presentan mayor riesgo de transmitir aneuploidías en sus espermatozoides. En general, estos pacientes se podrían clasificar en los siguientes grupos:

- Varones con cariotipo normal y tratamientos de quimioterapia y radioterapia con incremento 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).
- Varones con cariotipo normal y con gestaciones previas con cromosomopatía de origen paterno, con incremento de alteraciones cromosómicas en los espermatozoides para los cromosomas implicados se ha descrito entre el 1-20% (Blanco *et al.*, 1998; Martínez-Pasarell *et al.*, 1999a; Eskenazi *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2004).
- Varones con parámetros espermáticos anormales: con oligozoospermia (Rubio *et al.*, 2001; Bernardini *et al.*, 1998; Pang *et al.*, 1999; Pfeffe *ret al.*, 1999; Vegetti *et al.*, 2000; Ushijima *et al.*, 2000; Nishikawa *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2003a) y teratozoospermia severa (In'tVeld *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'tVeld *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,b). 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.

#### 6.4. ACERCA DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES ANALIZADAS

- **Relación entre recombinación meiótica y la edad**

La edad de los pacientes no parece tener efecto en la recombinación meiótica como ya había apuntado Lynn y colaboradores (2002) En 2009, Hassold y colaboradores, utilizando como modelo biomédico el Rhesus monkey (*Macaca mulatta*), dentro del grupo estudiado se encontraron con dos machos con una frecuencia de recombinación significativamente menor, pero esta variación era independiente de la edad del animal. En 2011 Duan y colaboradores en sus estudios de la recombinación meiótica en espermatozoides humanos de 10 varones fértiles tampoco encontraron una correlación entre la edad y la frecuencia de recombinación.

- **Relación entre recombinación meiótica y la longitud de SC**

En estudios previos se ha sugerido una asociación entre la longitud del complejo sinaptonémico y el número de puntos de recombinación (Lynn *et al.*, 2002; Tease *et al.*, 2004). Es sabido que existen diferencias inter-individuales (Lynn *et al.*, 2002; Hassold *et al.*, 2004), inter-específicas (Hassold *et al.*, 2009) e inter-sexos en cuanto a la frecuencia de recombinación. En estudios realizados en ratón, se ha descrito que las hembras presentan

una media de frecuencia de recombinación de  $69,25 \pm 0,29$  frente a los machos de  $49,09 \pm 0,07$ , con una longitud más corta de sus complejos sinaptonémicos por cromosoma (Gruhn *et al.*, 2013), por lo que se sugirió una posible relación entre frecuencia de recombinación y longitud de SC.

Con estas premisas esperábamos encontrar diferencias en la longitud de SC entre el grupo control y los grupos de estudio puesto que existía entre ellos una diferencia significativa en la frecuencia de recombinación pero las longitudes en nuestro caso fueron comparables. Se justificaría porque las diferencias entre nuestro grupo estudio y grupo control fueron del orden de 3,81 puntos ( $48,71 \pm 1,55$  vs.  $44,90 \pm 2,41$ ) mientras que en el estudio mencionado en ratones era de 20 puntos entre hembras y machos.

- **Relación entre recombinación meiótica e incidencia de anomalías cromosómicas en espermatozoides testiculares**

La recombinación juega un papel crítico para garantizar la correcta segregación de los cromosomas durante la meiosis, por lo que estábamos interesados en determinar si varones infértiles con frecuencias de recombinación alterada presentaban un riesgo incrementado de producir espermatozoides con anomalías cromosómicas.

El 78,3% de los pacientes del grupo de azoospermia secretora presentaron niveles de recombinación meiótica significativamente inferiores a los del grupo control. De estos pacientes con disminución de la recombinación, en 3 de ellos no se encontraron espermatozoides y 14 de los 15 restantes (93,3%) mostraron un incremento significativo de aneuploidías totales y/o diploidías para los cromosomas analizados.

Ma y colaboradores (2006b) describieron un caso de un varón OAT con un incremento de aneuploidías para los cromosomas sexuales en eyaculado que presentaba mayor porcentaje de células en estadio de paquitene sin recombinación entre los cromosomas sexuales que el observado en dos varones fértiles.

Posteriormente Ferguson y colaboradores (2007), encontraron una disminución de la recombinación en dos pacientes con OAT y en tres pacientes con azoospermia secretora al comparado con su grupo control. El análisis de frecuencia de recombinación por cromosoma y las aneuploidías encontradas para los mismos cromosomas reveló que no existía relación directa para los cromosomas 13, 18 y 21 pero si para los cromosomas sexuales, con menor frecuencia de recombinación en los casos con mayor incidencia de disomías para los cromosomas sexuales.

Finalmente Sun y colaboradores (2008), encontraron una correlación positiva entre el incremento de aneuploidías para los cromosomas sexuales y la disminución de la recombinación en la vesícula sexual. Para el resto de autosomas analizados no encontraron esta relación.

## 7. CONCLUSIONES



1. En los pacientes con azoospermia secretora de origen idiopático la frecuencia de recombinación meiótica mostró una disminución significativa al compararla con el grupo control de pacientes post-vasectomizados. Sin embargo, en el grupo de pacientes criptozoospermicos esta disminución no mostró diferencias significativas con el grupo control. Se observó una variación de la frecuencia de recombinación entre individuos, tanto en los grupos de estudio, como en el grupo control que no se correlacionó ni con la edad de los pacientes, ni con el tiempo transcurrido desde la vasectomía en el caso de los individuos pertenecientes al grupo control.
2. En pacientes con azoospermia secretora se observó una disminución en los niveles de recombinación para la mayoría de cromosomas analizados, independientemente de su tamaño y estructura.
3. Los varones con azoospermia secretora presentaron una acumulación de espermatoцитos primarios en los estadios iniciales de la profase I, con menor porcentaje de meiocitos que superaron el punto de control de paquitene.
4. La medición de la longitud total de los complejos sinaptonémicos en los espermatoцитos primarios en estadio de paquitene resultó similar en el grupo control y en los grupos de estudio, por lo que no se observó una correlación entre longitud de complejos sinaptonémicos con los niveles de recombinación.
5. En pacientes con azoospermia secretora se observó un incremento significativo en la incidencia de disomías y diploidías para todos los cromosomas analizados al compararlo con el grupo control. Los pacientes criptozoospermicos sólo mostraron este incremento significativo en las disomías para el cromosoma 18, los cromosomas sexuales y para la incidencia de diploidías.

## CONCLUSIONES

6. El 81,2% de los pacientes del grupo de azoospermia secretora que presentaron unos niveles de recombinación meiótica significativamente inferiores a los del grupo control mostraron un incremento de anomalías cromosómicas en sus espermatozoides.

## 8. BIBLIOGRAFIA





- Anton, E., Vidal, F. & Blanco, J. 2007, "Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 22, no. 8, pp. 2088-2092.
- Aran, B., Blanco, J., Vidal, F., Vendrell, J.M., Egozcue, S., Barri, P.N., Egozcue, J. & Veiga, A. 1999, "Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program", *Fertility and sterility*, vol. 72, no. 4, pp. 696-701.
- Arnheim, N., Calabrese, P. & Tiemann-Boege, I. 2007, "Mammalian meiotic recombination hot spots", *Annual Review of Genetics*, vol. 41, pp. 369-399.
- Baker, S.M., Plug, A.W., Prolla, T.A., Bronner, C.E., Harris, A.C., Yao, X., Christie, D.M., Monell, C., Arnheim, N., Bradley, A., Ashley, T. & Liskay, R.M. 1996, "Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over", *Nature genetics*, vol. 13, no. 3, pp. 336-342.
- Barlow, P. & Vosa, C.G. 1970, "The Y chromosome in human spermatozoa", *Nature*, vol. 226, no. 5249, pp. 961-962.
- Bernardini, L., Borini, A., Preti, S., Conte, N., Flamigni, C., Capitano, G.L. & Venturini, P.L. 1998, "Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 13, no. 12, pp. 3406-3413.
- Bernardini, L., Gianaroli, L., Fortini, D., Conte, N., Magli, C., Cavani, S., Gaggero, G., Tindiglia, C., Ragni, N. & Venturini, P.L. 2000, "Frequency of hyper-, hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 15, no. 10, pp. 2165-2172.
- Bolor, H., Mori, T., Nishiyama, S., Ito, Y., Hosoba, E., Inagaki, H., Kogo, H., Ohye, T., Tsutsumi, M., Kato, T., Tong, M., Nishizawa, H., Pryor-Koishi, K., Kitaoka, E., Sawada, T., Nishiyama, Y., Udagawa, Y. & Kurahashi, H. 2009, "Mutations of the SYCP3 gene in women with recurrent pregnancy loss", *American Journal of Human Genetics*, vol. 84, no. 1, pp. 14-20.
- Bonduelle, M., Van Assche, E., Joris, H., Keymolen, K., Devroey, P., Van Steirteghem, A. & Liebaers, I. 2002, "Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 17, no. 10, pp. 2600-2614.
- Brown, P.W., Judis, L., Chan, E.R., Schwartz, S., Seftel, A., Thomas, A. & Hassold, T.J. 2005, "Meiotic synapsis proceeds from a limited number of subtelomeric sites in the human male", *American Journal of Human Genetics*, vol. 77, no. 4, pp. 556-566.

- Burgoyne, P.S., Mahadevaiah, S.K. & Turner, J.M. 2009, "The consequences of asynapsis for mammalian meiosis", *Nature reviews.Genetics*, vol. 10, no. 3, pp. 207-216.
- Burrello, N., Calogero, A.E., De Palma, A., Grazioso, C., Torrisi, C., Barone, N., Pafumi, C., D'Agata, R. & Vicari, E. 2002, "Chromosome analysis of epididymal and testicular spermatozoa in patients with azoospermia", *European journal of human genetics : EJHG*, vol. 10, no. 6, pp. 362-366.
- Calogero, A.E., De Palma, A., Grazioso, C., Barone, N., Burrello, N., Palermo, I., Gulisano, A., Pafumi, C. & D'Agata, R. 2001, "High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 16, no. 7, pp. 1433-1439.
- Calogero, A.E., De Palma, A., Grazioso, C., Barone, N., Romeo, R., Rappazzo, G. & D'Agata, R. 2001, "Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 16, no. 6, pp. 1172-1179.
- Camprubi, C., Pladevall, M., Grossmann, M., Garrido, N., Pons, M.C. & Blanco, J. 2012, "Semen samples showing an increased rate of spermatozoa with imprinting errors have a negligible effect in the outcome of assisted reproduction techniques", *Epigenetics*, vol. 7, no. 10, pp. 1115-1124.
- Carrell, D.T. 2008, "The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises", *Journal of andrology*, vol. 29, no. 2, pp. 124-133.
- Cheung, V.G., Burdick, J.T., Hirschmann, D. & Morley, M. 2007, "Polymorphic variation in human meiotic recombination", *American Journal of Human Genetics*, vol. 80, no. 3, pp. 526-530.
- Chowdhury, R., Bois, P.R., Feingold, E., Sherman, S.L. & Cheung, V.G. 2009, "Genetic analysis of variation in human meiotic recombination", *PLoS genetics*, vol. 5, no. 9, pp. e1000648.
- Codina-Pascual, M., Campillo, M., Kraus, J., Speicher, M.R., Egozcue, J., Navarro, J. & Benet, J. 2006, "Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and effects on human male meiosis", *Molecular human reproduction*, vol. 12, no. 2, pp. 123-133.
- Codina-Pascual, M., Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Campillo, M., Garcia, F., Egozcue, S., Abad, C., Egozcue, J. & Benet, J. 2005, "Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 20, no. 8, pp. 2133-2139.
- Colombero, L.T., Hariprashad, J.J., Tsai, M.C., Rosenwaks, Z. & Palermo, G.D. 1999, "Incidence of sperm aneuploidy in relation to semen characteristics and assisted reproductive outcome", *Fertility and sterility*, vol. 72, no. 1, pp. 90-96.

- Coop, G., Wen, X., Ober, C., Pritchard, J.K. & Przeworski, M. 2008, "High-resolution mapping of crossovers reveals extensive variation in fine-scale recombination patterns among humans", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 319, no. 5868, pp. 1395-1398.
- Cram, D.S., Ma, K., Bhasin, S., Arias, J., Pandjaitan, M., Chu, B., Audrins, M.S., Saunders, D., Quinn, F., deKretser, D. & McLachlan, R. 2000, "Y chromosome analysis of infertile men and their sons conceived through intracytoplasmic sperm injection: vertical transmission of deletions and rarity of de novo deletions", *Fertility and sterility*, vol. 74, no. 5, pp. 909-915.
- de Kretser, D. 1997, "Male infertility", *The Lancet*, vol. 349, no. 9054, pp. 787-790.
- Devroey, P., Liu, J., Nagy, Z., Goossens, A., Tournaye, H., Camus, M., Van Steirteghem, A. & Silber, S. 1995, "Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 10, no. 6, pp. 1457-1460.
- Ding, D.Q., Haraguchi, T. & Hiraoka, Y. 2010, "From meiosis to postmeiotic events: alignment and recognition of homologous chromosomes in meiosis", *The FEBS journal*, vol. 277, no. 3, pp. 565-570.
- Duan, T., Yang, Q.L., Wang, L., Shi, Q.H. & Yu, D.X. 2011, "Correlation analysis between meiotic recombination frequencies and age in human spermatocyte", *Yi chuan = Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji*, vol. 33, no. 7, pp. 725-730.
- Duan, T., Yang, Q.L., Wang, L., Shi, Q.H. & Yu, D.X. 2011, "Correlation analysis between meiotic recombination frequencies and age in human spermatocyte", *Yi chuan = Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji*, vol. 33, no. 7, pp. 725-730.
- Egozcue, J., Sarrate, Z., Codina-Pascual, M., Egozcue, S., Oliver-Bonet, M., Blanco, J., Navarro, J., Benet, J. & Vidal, F. 2005, "Meiotic abnormalities in infertile males", *Cytogenetic and genome research*, vol. 111, no. 3-4, pp. 337-342.
- Egozcue, S., Blanco, J., Vendrell, J.M., Garcia, F., Veiga, A., Aran, B., Barri, P.N., Vidal, F. & Egozcue, J. 2000, "Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion", *Human reproduction update*, vol. 6, no. 1, pp. 93-105.
- Egozcue, S., Vendrell, J.M., Garcia, F., Veiga, A., Aran, B., Barri, P.N. & Egozcue, J. 2000, "Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection", *Journal of assisted reproduction and genetics*, vol. 17, no. 6, pp. 307-309.
- Eisenberg, M.L., Betts, P., Herder, D., Lamb, D.J. & Lipshultz, L.I. 2013, "Increased risk of cancer among azoospermic men", *Fertility and sterility*, vol. 100, no. 3, pp. 681-685.

- Ferguson, K.A., Wong, E.C., Chow, V., Nigro, M. & Ma, S. 2007, "Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy", *Human molecular genetics*, vol. 16, no. 23, pp. 2870-2879.
- Finch, K.A., Fonseka, K.G., Abogrein, A., Ioannou, D., Handyside, A.H., Thornhill, A.R., Hickson, N. & Griffin, D.K. 2008, "Nuclear organization in human sperm: preliminary evidence for altered sex chromosome centromere position in infertile males", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 23, no. 6, pp. 1263-1270.
- Flanagan, J.M., Pependikyte, V., Pozdniakovaite, N., Sobolev, M., Assadzadeh, A., Schumacher, A., Zangeneh, M., Lau, L., Virtanen, C., Wang, S.C. & Petronis, A. 2006, "Intra- and interindividual epigenetic variation in human germ cells", *American Journal of Human Genetics*, vol. 79, no. 1, pp. 67-84.
- Foresta, C., Moro, E. & Ferlin, A. 2001, "Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis", *Endocrine reviews*, vol. 22, no. 2, pp. 226-239.
- García-Quevedo, L., Blanco, J., Sarrate, Z., Catala, V., Bassas, L. & Vidal, F. 2011, "Hidden mosaicism in patients with Klinefelter's syndrome: implications for genetic reproductive counselling", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 26, no. 12, pp. 3486-3493.
- Gil-Salom, M., Minguez, Y., Rubio, C., De los Santos, M.J., Remohi, J. & Pellicer, A. 1995, "Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 10, no. 12, pp. 3166-3170.
- Gil-Salom, M., Minguez, Y., Rubio, C., Ruiz, A., Remohi, J. & Pellicer, A. 1996, "Intracytoplasmic sperm injection: a treatment for extreme oligospermia", *The Journal of urology*, vol. 156, no. 3, pp. 1001-1004.
- Gil-Salom, M., Romero, J., Rubio, C., Ruiz, A., Remohi, J. & Pellicer, A. 2000, "Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa", *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 169, no. 1-2, pp. 15-19.
- 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.
- Gonsalves, J., Sun, F., Schlegel, P.N., Turek, P.J., Hopps, C.V., Greene, C., Martin, R.H. & Pera, R.A. 2004, "Defective recombination in infertile men", *Human molecular genetics*, vol. 13, no. 22, pp. 2875-2883.

- Gonzalez-Merino, E., Hans, C., Abramowicz, M., Englert, Y. & Emiliani, S. 2007, "Aneuploidy study in sperm and preimplantation embryos from nonmosaic 47,XYY men", *Fertility and sterility*, vol. 88, no. 3, pp. 600-606.
- Gruhn, J.R., Rubio, C., Broman, K.W., Hunt, P.A. & Hassold, T. 2013, "Cytological studies of human meiosis: sex-specific differences in recombination originate at, or prior to, establishment of double-strand breaks", *PLoS one*, vol. 8, no. 12, pp. e85075.
- Hall, H., Hunt, P. & Hassold, T. 2006, "Meiosis and sex chromosome aneuploidy: how meiotic errors cause aneuploidy; how aneuploidy causes meiotic errors", *Current opinion in genetics & development*, vol. 16, no. 3, pp. 323-329.
- Handel, M.A. & Schimenti, J.C. 2010, "Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility", *Nature reviews.Genetics*, vol. 11, no. 2, pp. 124-136.
- Hann, M.C., Lau, P.E. & Tempest, H.G. 2011, "Meiotic recombination and male infertility: from basic science to clinical reality?", *Asian Journal of Andrology*, vol. 13, no. 2, pp. 212-218.
- Hassold, T., Hall, H. & Hunt, P. 2007, "The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going", *Human molecular genetics*, vol. 16 Spec No. 2, pp. R203-8.
- Hassold, T., Hansen, T., Hunt, P. & VandeVoort, C. 2009, "Cytological studies of recombination in rhesus males", *Cytogenetic and genome research*, vol. 124, no. 2, pp. 132-138.
- Hassold, T. & Hunt, P. 2001, "To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy", *Nature reviews.Genetics*, vol. 2, no. 4, pp. 280-291.
- Hassold, T., Judis, L., Chan, E.R., Schwartz, S., Seftel, A. & Lynn, A. 2004, "Cytological studies of meiotic recombination in human males", *Cytogenetic and genome research*, vol. 107, no. 3-4, pp. 249-255.
- Hassold, T., Sherman, S. & Hunt, P.A. 1995, "The origin of trisomy in humans", *Progress in clinical and biological research*, vol. 393, pp. 1-12.
- Johnson, M.D. 1998, "Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening", *Fertility and sterility*, vol. 70, no. 3, pp. 397-411.
- Judis, L., Chan, E.R., Schwartz, S., Seftel, A. & Hassold, T. 2004, "Meiosis I arrest and azoospermia in an infertile male explained by failure of formation of a component of the synaptonemal complex", *Fertility and sterility*, vol. 81, no. 1, pp. 205-209.

- Koehler, K.E., Hawley, R.S., Sherman, S. & Hassold, T. 1996, "Recombination and nondisjunction in humans and flies", *Human molecular genetics*, vol. 5 Spec No, pp. 1495-1504.
- Kong, A., Gudbjartsson, D.F., Sainz, J., Jonsdottir, G.M., Gudjonsson, S.A., Richardsson, B., Sigurdardottir, S., Barnard, J., Hallbeck, B., Masson, G., Shlien, A., Palsson, S.T., Frigge, M.L., Thorgeirsson, T.E., Gulcher, J.R. & Stefansson, K. 2002, "A high-resolution recombination map of the human genome", *Nature genetics*, vol. 31, no. 3, pp. 241-247.
- Kong, A., Thorleifsson, G., Stefansson, H., Masson, G., Helgason, A., Gudbjartsson, D.F., Jonsdottir, G.M., Gudjonsson, S.A., Sverrisson, S., Thorlacius, T., Jonasdottir, A., Hardarson, G.A., Palsson, S.T., Frigge, M.L., Gulcher, J.R., Thorsteinsdottir, U. & Stefansson, K. 2008, "Sequence variants in the RNF212 gene associate with genome-wide recombination rate", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 319, no. 5868, pp. 1398-1401.
- Krausz, C., Hoefsloot, L., Simoni, M., Tuttelmann, F., European Academy of Andrology & European Molecular Genetics Quality Network 2014, "EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013", *Andrology*, vol. 2, no. 1, pp. 5-19.
- Lamb, N.E., Freeman, S.B., Savage-Austin, A., Pettay, D., Taft, L., Hersey, J., Gu, Y., Shen, J., Saker, D., May, K.M., Avramopoulos, D., Petersen, M.B., Hallberg, A., Mikkelsen, M., Hassold, T.J. & Sherman, S.L. 1996, "Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II", *Nature genetics*, vol. 14, no. 4, pp. 400-405.
- Lee, S.H., Ahn, S.Y., Lee, K.W., Kwack, K., Jun, H.S. & Cha, K.Y. 2006, "Intracytoplasmic sperm injection may lead to vertical transmission, expansion, and de novo occurrence of Y-chromosome microdeletions in male fetuses", *Fertility and sterility*, vol. 85, no. 5, pp. 1512-1515.
- Levron, J., Aviram-Goldring, A., Madgar, I., Raviv, G., Barkai, G. & Dor, J. 2001, "Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection", *Fertility and sterility*, vol. 76, no. 3, pp. 479-484.
- Li, Z., Haines, C.J. & Han, Y. 2008, "'Micro-deletions' of the human Y chromosome and their relationship with male infertility", *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, vol. 35, no. 4, pp. 193-199.
- Llano, E., Gomez-H, L., Garcia-Tunon, I., Sanchez-Martin, M., Caburet, S., Barbero, J.L., Schimenti, J.C., Veitia, R.A. & Pendas, A.M. 2014, "STAG3 is a strong candidate gene for male infertility", *Human molecular genetics*, .
- Lynn, A., Ashley, T. & Hassold, T. 2004, "Variation in human meiotic recombination", *Annual review of genomics and human genetics*, vol. 5, pp. 317-349.

- Lynn, A., Koehler, K.E., Judis, L., Chan, E.R., Cherry, J.P., Schwartz, S., Seftel, A., Hunt, P.A. & Hassold, T.J. 2002, "Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 296, no. 5576, pp. 2222-2225.
- Lyrakou, S., Mantas, D., Msaouel, P., Baathalah, S., Shrivastav, P., Chrisostomou, M., Mihalopoulos, Y., Hasiakos, D. & Baka, S. 2007, "Crossover analysis using immunofluorescent detection of MLH1 foci in frozen-thawed testicular tissue", *Reproductive biomedicine online*, vol. 15, no. 1, pp. 99-105.
- Ma, S., Arsovska, S., Moens, P., Nigro, M. & Chow, V. 2006, "Analysis of early meiotic events and aneuploidy in nonobstructive azoospermic men: a preliminary report", *Fertility and sterility*, vol. 85, no. 3, pp. 646-652.
- Ma, S., Ferguson, K.A., Arsovska, S., Moens, P. & Chow, V. 2006, "Reduced recombination associated with the production of aneuploid sperm in an infertile man: a case report", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 21, no. 4, pp. 980-985.
- Malmanche, N., Maia, A. & Sunkel, C.E. 2006, "The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis", *FEBS letters*, vol. 580, no. 12, pp. 2888-2895.
- Martin, R.H. 2008, "Cytogenetic determinants of male fertility", *Human reproduction update*, vol. 14, no. 4, pp. 379-390.
- Martin, R.H., Ernst, S., Rademaker, A., Barclay, L., Ko, E. & Summers, N. 1999, "Analysis of sperm chromosome complements before, during, and after chemotherapy", *Cancer genetics and cytogenetics*, vol. 108, no. 2, pp. 133-136.
- Martin, R.H., Greene, C., Rademaker, A., Barclay, L., Ko, E. & Chernos, J. 2000, "Chromosome analysis of spermatozoa extracted from testes of men with non-obstructive azoospermia", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 15, no. 5, pp. 1121-1124.
- Martin, R.H., Greene, C. & Rademaker, A.W. 2003, "Sperm chromosome aneuploidy analysis in a man with globozoospermia", *Fertility and sterility*, vol. 79 Suppl 3, pp. 1662-1664.
- Martin, R.H., Greene, C., Rademaker, A.W., Ko, E. & Chernos, J. 2003, "Analysis of aneuploidy in spermatozoa from testicular biopsies from men with nonobstructive azoospermia", *Journal of andrology*, vol. 24, no. 1, pp. 100-103.
- Martin, R.H., Rademaker, A.W., Greene, C., Ko, E., Hoang, T., Barclay, L. & Chernos, J. 2003, "A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia", *Biology of reproduction*, vol. 69, no. 2, pp. 535-539.



- Martinez, M.C., Bernabe, M.J., Gomez, E., Ballesteros, A., Landeras, J., Glover, G., Gil-Salom, M., Remohi, J. & Pellicer, A. 2000, "Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients", *Journal of andrology*, vol. 21, no. 5, pp. 651-655.
- Mateizel, I., Verheyen, G., Van Assche, E., Tournaye, H., Liebaers, I. & Van Steirteghem, A. 2002, "FISH analysis of chromosome X, Y and 18 abnormalities in testicular sperm from azoospermic patients", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 17, no. 9, pp. 2249-2257.
- Mateu, E., Rodrigo, L., Martinez, M.C., Peinado, V., Milan, M., Gil-Salom, M., Martinez-Jabaloyas, J.M., Remohi, J., Pellicer, A. & Rubio, C. 2010, "Aneuploidies in embryos and spermatozoa from patients with Y chromosome microdeletions", *Fertility and sterility*, vol. 94, no. 7, pp. 2874-2877.
- Meschede, D., Lemcke, B., Stussel, J., Louwen, F. & Horst, J. 1998, "Strong preference for non-invasive prenatal diagnosis in women pregnant through intracytoplasmic sperm injection (ICSI)", *Prenatal diagnosis*, vol. 18, no. 7, pp. 700-705.
- Miyamoto, T., Hasuike, S., Yogev, L., Maduro, M.R., Ishikawa, M., Westphal, H. & Lamb, D.J. 2003, "Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3", *Lancet*, vol. 362, no. 9397, pp. 1714-1719.
- Moosani, N., Pattinson, H.A., Carter, M.D., Cox, D.M., Rademaker, A.W. & Martin, R.H. 1995, "Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization", *Fertility and sterility*, vol. 64, no. 4, pp. 811-817.
- Mukherjee, S., Ridgeway, A.D. & Lamb, D.J. 2010, "DNA mismatch repair and infertility", *Current opinion in urology*, vol. 20, no. 6, pp. 525-532.
- Myers, S., Spencer, C.C., Auton, A., Bottolo, L., Freeman, C., Donnelly, P. & McVean, G. 2006, "The distribution and causes of meiotic recombination in the human genome", *Biochemical Society transactions*, vol. 34, no. Pt 4, pp. 526-530.
- Neumann, R. & Jeffreys, A.J. 2006, "Polymorphism in the activity of human crossover hotspots independent of local DNA sequence variation", *Human molecular genetics*, vol. 15, no. 9, pp. 1401-1411.
- Nicklas, R.B. 1997, "How cells get the right chromosomes", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 275, no. 5300, pp. 632-637.
- Nishikawa, N., Murakami, I., Ikuta, K. & Suzumori, K. 2000, "Sex chromosomal analysis of spermatozoa from infertile men using fluorescence in situ hybridization", *Journal of assisted reproduction and genetics*, vol. 17, no. 2, pp. 97-102.

- O'Flynn O'Brien, K.L., Varghese, A.C. & Agarwal, A. 2010, "The genetic causes of male factor infertility: A review", *Fertility and sterility*, vol. 93, no. 1, pp. 1-12.
- Oliver-Bonet, M., Benet, J. & Martin, R.H. 2006, "Studying meiosis: a review of FISH and M-FISH techniques used in the analysis of meiotic processes in humans", *Cytogenetic and genome research*, vol. 114, no. 3-4, pp. 312-318.
- Oliver-Bonet, M., Liehr, T., Nietzel, A., Heller, A., Starke, H., Claussen, U., Codina-Pascual, M., Pujol, A., Abad, C., Egozcue, J., Navarro, J. & Benet, J. 2003, "Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH", *European journal of human genetics : EJHG*, vol. 11, no. 11, pp. 879-883.
- Page, D.C., Silber, S. & Brown, L.G. 1999, "Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 14, no. 7, pp. 1722-1726.
- Page, S.L. & Hawley, R.S. 2004, "The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex", *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 20, pp. 525-558.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. & Van Steirteghem, A.C. 1992, "Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte", *Lancet (London, England)*, vol. 340, no. 8810, pp. 17-18.
- Palermo, G.D., Colombero, L.T., Hariprashad, J.J., Schlegel, P.N. & Rosenwaks, Z. 2002, "Chromosome analysis of epididymal and testicular sperm in azoospermic patients undergoing ICSI", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 17, no. 3, pp. 570-575.
- Pan, Z., Yang, Q., Ye, N., Wang, L., Li, J., Yu, D., Cooke, H.J. & Shi, Q. 2012, "Complex relationship between meiotic recombination frequency and autosomal synaptonemal complex length per cell in normal human males", *American journal of medical genetics. Part A*, vol. 158A, no. 3, pp. 581-587.
- Pang, M.G., Hoegerman, S.F., Cuticchia, A.J., Moon, S.Y., Doncel, G.F., Acosta, A.A. & Kearns, W.G. 1999, "Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoeratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 14, no. 5, pp. 1266-1273.
- Patsalis, P.C., Skordis, N., Sismani, C., Kousoulidou, L., Koumbaris, G., Eftychi, C., Stavrides, G., Ioulianos, A., Kitsiou-Tzeli, S., Galla-Voumvouraki, A., Kosmaidou, Z., Hadjiathanasiou, C.G. & McElreavey, K. 2005, "Identification of high frequency of Y chromosome deletions in patients with sex chromosome mosaicism and correlation with the clinical phenotype and Y-chromosome instability", *American journal of medical genetics. Part A*, vol. 135, no. 2, pp. 145-149.

- Pawlowitzki, I.H. & Pearson, P.L. 1972, "Chromosomal aneuploidy in human spermatozoa", *Humangenetik*, vol. 16, no. 1, pp. 119-122.
- Pearson, P.L. & Bobrow, M. 1970, "Fluorescent staining of the Y chromosome in meiotic stages of the human male", *Journal of reproduction and fertility*, vol. 22, no. 1, pp. 177-179.
- Petkov, P.M., Broman, K.W., Szatkiewicz, J.P. & Paigen, K. 2007, "Crossover interference underlies sex differences in recombination rates", *Trends in genetics : TIG*, vol. 23, no. 11, pp. 539-542.
- Pfeffer, J., Pang, M.G., Hoegerman, S.F., Osgood, C.J., Stacey, M.W., Mayer, J., Oehninger, S. & Kearns, W.G. 1999, "Aneuploidy frequencies in semen fractions from ten oligoasthenoteratozoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection", *Fertility and sterility*, vol. 72, no. 3, pp. 472-478.
- Reynolds, A., Qiao, H., Yang, Y., Chen, J.K., Jackson, N., Biswas, K., Holloway, J.K., Baudat, F., de Massy, B., Wang, J., Hoog, C., Cohen, P.E. & Hunter, N. 2013, "RNF212 is a dosage-sensitive regulator of crossing-over during mammalian meiosis", *Nature genetics*, vol. 45, no. 3, pp. 269-278.
- Robbins, W.A., Meistrich, M.L., Moore, D., Hagemester, F.B., Weier, H.U., Cassel, M.J., Wilson, G., Eskenazi, B. & Wyrobek, A.J. 1997, "Chemotherapy induces transient sex chromosomal and autosomal aneuploidy in human sperm", *Nature genetics*, vol. 16, no. 1, pp. 74-78.
- Rodrigo, L., Peinado, V., Mateu, E., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C., Gil-Salom, M. & Rubio, C. 2010, "Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos", *Fertility and sterility*, vol. 94, no. 4, pp. 1380-1386.
- Rodrigo, L., Rubio, C., Mateu, E., Simon, C., Remohi, J., Pellicer, A. & Gil-Salom, M. 2004, "Analysis of chromosomal abnormalities in testicular and epididymal spermatozoa from azospermic ICSI patients by fluorescence in-situ hybridization", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 19, no. 1, pp. 118-123.
- Rodrigo, L., Rubio, C., Peinado, V., Villamon, R., Al-Asmar, N., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C. & Gil-Salom, M. 2011, "Testicular sperm from patients with obstructive and nonobstructive azospermia: aneuploidy risk and reproductive prognosis using testicular sperm from fertile donors as control samples", *Fertility and sterility*, vol. 95, no. 3, pp. 1005-1012.
- Rodrigo Vivó, Lorena. (2013). *Valor de los estudios cromosómicos en espermatozoides mediante la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) en parejas estériles*. (Tesis doctoral). Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia. Valencia.

- Roeder, G.S. & Bailis, J.M. 2000, "The pachytene checkpoint", *Trends in genetics : TIG*, vol. 16, no. 9, pp. 395-403.
- Rosenbusch, B. 2010, "Somatic chromosomal abnormalities in couples undergoing infertility treatment by intracytoplasmic sperm injection", *Journal of genetics*, vol. 89, no. 1, pp. 105-108.
- Rubio, C., Gil-Salom, M., Simon, C., Vidal, F., Rodrigo, L., Minguez, Y., Remohi, J. & Pellicer, A. 2001, "Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 16, no. 10, pp. 2084-2092.
- Sadeghi-Nejad, H. & Farrokhi, F. 2007, "Genetics of azoospermia: current knowledge, clinical implications, and future directions. Part II: Y chromosome microdeletions", *Urology journal*, vol. 4, no. 4, pp. 192-206.
- Sanderson, M.L., Hassold, T.J. & Carrell, D.T. 2008, "Proteins involved in meiotic recombination: a role in male infertility?", *Systems biology in reproductive medicine*, vol. 54, no. 2, pp. 57-74.
- Sandovici, I., Kassovska-Bratinova, S., Vaughan, J.E., Stewart, R., Leppert, M. & Sapienza, C. 2006, "Human imprinted chromosomal regions are historical hot-spots of recombination", *PLoS genetics*, vol. 2, no. 7, pp. e101.
- Sarrate, Z., Blanco, J., Egozcue, S., Vidal, F. & Egozcue, J. 2004, "Identification of meiotic anomalies with multiplex fluorescence in situ hybridization: Preliminary results", *Fertility and sterility*, vol. 82, no. 3, pp. 712-717.
- Sazegari, A., Kalantar, S.M., Pashaiefar, H., Mohtaram, S., Honarvar, N., Feizollahi, Z. & Ghasemi, N. 2014, "The T657C polymorphism on the SYCP3 gene is associated with recurrent pregnancy loss", *Journal of assisted reproduction and genetics*, vol. 31, no. 10, pp. 1377-1381.
- Sigurdsson, M.I., Smith, A.V., Bjornsson, H.T. & Jonsson, J.J. 2009, "HapMap methylation-associated SNPs, markers of germline DNA methylation, positively correlate with regional levels of human meiotic recombination", *Genome research*, vol. 19, no. 4, pp. 581-589.
- Silber, S., Escudero, T., Lenahan, K., Abdelhadi, I., Kilani, Z. & Munne, S. 2003, "Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction", *Fertility and sterility*, vol. 79, no. 1, pp. 30-38.
- Stahl, P.J., Stember, D.S. & Goldstein, M. 2012, "Contemporary management of male infertility", *Annual Review of Medicine*, vol. 63, pp. 525-540.
- Sun, F., Kozak, G., Scott, S., Trpkov, K., Ko, E., Mikhaail-Philips, M., Bestor, T.H., Moens, P. & Martin, R.H. 2004, "Meiotic defects in a man with non-obstructive

- azoospermia: case report", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 19, no. 8, pp. 1770-1773.
- Sun, F., Mikhaail-Philips, M., Oliver-Bonet, M., Ko, E., Rademaker, A., Turek, P. & Martin, R.H. 2008b, "Reduced meiotic recombination on the XY bivalent is correlated with an increased incidence of sex chromosome aneuploidy in men with non-obstructive azoospermia", *Molecular human reproduction*, vol. 14, no. 7, pp. 399-404.
- Sun, F., Mikhaail-Philips, M., Oliver-Bonet, M., Ko, E., Rademaker, A., Turek, P. & Martin, R.H. 2008a, "The relationship between meiotic recombination in human spermatocytes and aneuploidy in sperm", *Human reproduction (Oxford, England)*, .
- Sun, F., Oliver-Bonet, M., Liehr, T., Starke, H., Turek, P., Ko, E., Rademaker, A. & Martin, R.H. 2006, "Variation in MLH1 distribution in recombination maps for individual chromosomes from human males", *Human molecular genetics*, vol. 15, no. 15, pp. 2376-2391.
- Sun, F., Trpkov, K., Rademaker, A., Ko, E., Barclay, L., Mikhaail-Philips, M. & Martin, R.H. 2004b, "The effect of cold storage on recombination frequencies in human male testicular cells", *Cytogenetic and genome research*, vol. 106, no. 1, pp. 39-42.
- Sun, F., Trpkov, K., Rademaker, A., Ko, E. & Martin, R.H. 2005, "Variation in meiotic recombination frequencies among human males", *Human genetics*, vol. 116, no. 3, pp. 172-178.
- Sun, F., Turek, P., Greene, C., Ko, E., Rademaker, A. & Martin, R.H. 2007, "Abnormal progression through meiosis in men with non-obstructive azoospermia", *Fertility and sterility*, vol. 87, no. 3, pp. 565-571.
- Svetlanov, A. & Cohen, P.E. 2004, "Mismatch repair proteins, meiosis, and mice: understanding the complexities of mammalian meiosis", *Experimental cell research*, vol. 296, no. 1, pp. 71-79.
- Tassistro, V., Ghalamoun-Slami, R., Saias-Magnan, J. & Guichaoua, M.R. 2009, "Chronology of meiosis & synaptonemal complex abnormalities in normal & abnormal spermatogenesis", *The Indian journal of medical research*, vol. 129, no. 3, pp. 268-278.
- Tease, C. & Hulten, M.A. 2004, "Inter-sex variation in synaptonemal complex lengths largely determine the different recombination rates in male and female germ cells", *Cytogenetic and genome research*, vol. 107, no. 3-4, pp. 208-215.
- Tempest, H.G. & Martin, R.H. 2009, "Cytogenetic risks in chromosomally normal infertile men", *Current opinion in obstetrics & gynecology*, vol. 21, no. 3, pp. 223-227.

- Templado, C., Uroz, L. & Estop, A. 2013, "New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa", *Molecular human reproduction*, vol. 19, no. 10, pp. 634-643.
- Topping, D., Brown, P., Judis, L., Schwartz, S., Seftel, A., Thomas, A. & Hassold, T. 2006, "Synaptic defects at meiosis I and non-obstructive azoospermia", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 21, no. 12, pp. 3171-3177.
- Topping, D., Brown, P. & Hassold, T. (2007) The Immunocytogenetics of Human Male Meiosis. D. Carrell (Eds.) *The Genetics of Male Infertility* (pp.115-128) Totowa, New Jersey: Human Press.
- Tournaye, H., Devroey, P., Liu, J., Nagy, Z., Lissens, W. & Van Steirteghem, A. 1994, "Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens", *Fertility and sterility*, vol. 61, no. 6, pp. 1045-1051.
- Uroz, L., Rajmil, O. & Templado, C. 2011, "Meiotic chromosome abnormalities in fertile men: are they increasing?", *Fertility and sterility*, vol. 95, no. 1, pp. 141-146.
- Uroz, L., Rajmil, O. & Templado, C. 2008, "Premature separation of sister chromatids in human male meiosis", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 23, no. 4, pp. 982-987.
- Uroz, L. & Templado, C. 2012, "Meiotic non-disjunction mechanisms in human fertile males", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 27, no. 5, pp. 1518-1524.
- Ushijima<sup>1</sup>, C., Kumasako, Y., Kihale, P.E., Hirotsuru, K. & Utsunomiya, T. 2000, "Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence in-situ hybridization", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 15, no. 5, pp. 1107-1111.
- Vallente, R.U., Cheng, E.Y. & Hassold, T.J. 2006, "The synaptonemal complex and meiotic recombination in humans: new approaches to old questions", *Chromosoma*, vol. 115, no. 3, pp. 241-249.
- Van Opstal, D., Los, F.J., Ramlakhan, S., Van Hemel, J.O., Van Den Ouweland, A.M., Brandenburg, H., Pieters, M.H., Verhoeff, A., Vermeer, M.C., Dhont, M. & In't Veld, P.A. 1997, "Determination of the parent of origin in nine cases of prenatally detected chromosome aberrations found after intracytoplasmic sperm injection", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 12, no. 4, pp. 682-686.
- Van Steirteghem, A., Bonduelle, M., Devroey, P. & Liebaers, I. 2002, "Follow-up of children born after ICSI", *Human reproduction update*, vol. 8, no. 2, pp. 111-116.

- Van Steirteghem, A.C., Nagy, Z., Joris, H., Liu, J., Staessen, C., Smits, J., Wisanto, A. & Devroey, P. 1993, "High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 8, no. 7, pp. 1061-1066.
- Vegetti, W., Van Assche, E., Frias, A., Verheyen, G., Bianchi, M.M., Bonduelle, M., Liebaers, I. & Van Steirteghem, A. 2000, "Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 15, no. 2, pp. 351-365.
- Vendrell, J.M., Garcia, F., Veiga, A., Calderon, G., Egozcue, S., Egozcue, J. & Barri, P.N. 1999, "Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 14, no. 2, pp. 375-378.
- Vendrell JM. "Estudios meióticos en la era del ICSI". *Cuad Med Reprod* 2005; 11:51-60
- Vialard, F., Bailly, M., Bouazzi, H., Albert, M., Pont, J.C., Mendes, V., Bergere, M., Gomes, D.M., de Mazancourt, P. & Selva, J. 2012, "The high frequency of sperm aneuploidy in klinefelter patients and in nonobstructive azoospermia is due to meiotic errors in euploid spermatocytes", *Journal of andrology*, vol. 33, no. 6, pp. 1352-1359.
- Viville, S., Mollard, R., Bach, M.L., Falquet, C., Gerlinger, P. & Warter, S. 2000, "Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies?: case report", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 15, no. 12, pp. 2563-2566.
- Winckler, W., Myers, S.R., Richter, D.J., Onofrio, R.C., McDonald, G.J., Bontrop, R.E., McVean, G.A., Gabriel, S.B., Reich, D., Donnelly, P. & Altshuler, D. 2005, "Comparison of fine-scale recombination rates in humans and chimpanzees", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 308, no. 5718, pp. 107-111.
- Yogev, L., Segal, S., Zeharia, E., Gamzu, R., Maymon, B.B., Paz, G., Botchan, A., Hauser, R., Yavetz, H. & Kleiman, S.E. 2004, "Sex chromosome alignment at meiosis of azoospermic men with azoospermia factor microdeletion", *Journal of andrology*, vol. 25, no. 1, pp. 110-116.
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., van der Poel, S., International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology & World Health Organization 2009, "The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 24, no. 11, pp. 2683-2687.

- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., Vanderpoel, S., International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology & World Health Organization 2009, "International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009", *Fertility and sterility*, vol. 92, no. 5, pp. 1520-1524.
- Zickler, D. & Kleckner, N. 1999, "Meiotic chromosomes: integrating structure and function", *Annual Review of Genetics*, vol. 33, pp. 603-754.





# ANEXOS



## ANEXO I



**DICTAMEN DEL CEIC A ESTUDIO POSTAUTORIZACION  
DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

Don Juan Manuel Giles Jiménez  
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica de IVI Valencia  
CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor para que se realice el estudio:

**Título "Estudio sobre la sinapsis y recombinación meiótica y sus implicaciones en la infertilidad masculina"**

Promotor: Dra. Carmen Rubio, IVI Valencia.

Y tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos del Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero y las normas que lo desarrollan.
- Los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- El seguro o la garantía financiera previstos.
- El procedimiento para obtener el consentimiento informado, incluyendo la hoja de información para los sujetos, el plan de reclutamiento de sujetos y las compensaciones previstas para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas y su posible interferencia con el respeto a los postulados éticos.

Este Comité, emite un DICTAMEN FAVORABLE para la realización de dicho estudio observacional en IVI Valencia.

SOLICITA LAS ACLARACIONES que se listan a continuación:

Consideraciones sobre aspectos generales:

Solicitud de aclaración referente a la hoja de información al paciente/sujeto.

Lo que firmo en Valencia a 17 de Julio de 2007

Firmado:  
Don Juan Manuel Giles Jiménez



## ANEXO II

### **HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE**

**TÍTULO DEL ESTUDIO: Estudio sobre la sinapsis y la recombinación meiótica y sus implicaciones en la infertilidad masculina**

**CÓDIGO DEL PROMOTOR: Meiosis testicular**

**PROMOTOR: IVI-Valencia**

**INVESTIGADOR PRINCIPAL: Carmen Rubio, laboratorio de FISH ([c.rubio@ivi.es](mailto:c.rubio@ivi.es))**

**CENTRO: IVI-Valencia**

#### **INTRODUCCION**

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente. Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

#### **PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA**

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

#### **DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:**

El presente estudio se basa en el análisis meiótico de pacientes que se sometan a biopsia testicular para la obtención y congelación de espermatozoides para un ciclo de inyección intracitoplasmática (ICSI). En estos casos, tras el aislamiento y congelación de los espermatozoides obtenidos, el resto de tejido testicular, que en condiciones normales se desecha, será aprovechado para realizar estudios de meiosis en células progenitoras de espermatozoides. Se utilizarán técnicas moleculares para estudiar como se producen los procesos que controlan la correcta segregación de los cromosomas homólogos en los espermatozoides humanos para dar lugar a espermatozoides con un número correcto de cromosomas. Sabemos que alteraciones en este proceso pueden dar

lugar a espermatozoides con un número incorrecto de cromosomas y por tanto se podría relacionar con la infertilidad masculina.

Sugerimos que estos estudios nos llevarán a la identificación de las primeras causas de infertilidad dependientes de la unión y recombinación de cromosomas homólogos, además de representar un paso crítico en el entendimiento de la etiología de la infertilidad humana y de sus posibles causas genéticas.

La información obtenida en los estudios meióticos en varones infértiles será relacionada con diferentes parámetros clínicos asociados a las técnicas de reproducción asistida,

como son la tasa de fecundación, desarrollo embrionario y anomalías cromosómicas embrionarias, así como con las posibilidades de conseguir una gestación a término.

Es importante mencionar que la participación en este estudio no implica ninguna intervención adicional en el tratamiento del paciente, puesto que se utilizará el material que se desecha en una biopsia testicular tras la recuperación de los espermatozoides obtenidos para su congelación y posterior utilización en un ciclo de ICSI. Por lo tanto, no implica ningún riesgo para el paciente, ni compromete el éxito de su posterior tratamiento en nuestro centro.

Se pretende evaluar un número comprendido entre 25-50 pacientes y valorar si la información obtenida podría ser de utilidad en el futuro para incorporar este tipo de estudios en el estudio del varón infértil.

## **BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO**

### **TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS**

Los resultados obtenidos del estudio es posible que no sirvan de utilidad directa para el individuo, pero presenta la posibilidad de evaluar si este tipo de análisis podría ser de interés en el futuro para la evaluación del varón infértil y para orientarle mejor sobre sus posibilidades reproductivas y el tratamiento más indicado en su caso. Los investigadores del estudio estarán disponibles para explicarles en todo momento en que consiste el estudio.

### **CONFIDENCIALIDAD**

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse al investigador responsable / su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

## **COMPENSACIÓN ECONÓMICA**

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo. Su participación en el estudio no le supondrá gasto, ni remuneración alguna.

## **OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE**

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor los investigadores del estudio lo consideran oportuno. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

**CONSENTIMIENTOS INFORMADOS**

Título del Estudio: **Estudio sobre la sinapsis y la recombinación meiótica y sus implicaciones en la infertilidad masculina**

Yo (nombre y apellidos)

.....

Nº Historia: .....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

.....(nombre del médico / investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

- Accedo a que las muestras de sangre o tejidos obtenidas para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con la enfermedad o fármacos del estudio no previstos en el protocolo actual (quedando excluidos los análisis genéticos, siempre y cuando no formen parte de los objetivos del estudio): SI NO

**Firma del paciente:**

**Firma del médico**

**/ investigador:**

**Nombre:**

**Nombre:**

**Fecha:**

**Fecha:**

Versión:

Fecha





## ANEXO III

Parte de los resultados de este trabajo de tesis doctoral han sido presentados a diversos congresos nacionales e internacionales:

- *Meiotic recombination and sperm aneuploidy in post-vasectomy obstructive azoospermic patients.*

Autores: **Peinado V**, Al-Asmar N, Susiarjo M, Gruhn J, Rodrigo L, Gil-Salom M, Martínez-Jabaloyas JM, Rubio C, Hassold T.

Participación: Póster

Organizador: 7th European Cytogenetics Conference

Fecha: 4-7 Julio-2009 Lugar: Estocolmo (Suecia).

- *Decreased meiotic recombination and higher risk of sperm aneuploidy in non- obstructive azoospermia patients.*

Autores: **Peinado, V** .; Al-Asmar, N .; Gruhn, J .; Rodrigo L ; Gil-Salom, M .; Martínez-Jabaloyas, JM .; Pellicer, A .; Remohí, J .; Rubio, C . and Hassold, T .

Participación: Poster

Organizador: ESHRE

Fecha: 27-30 Junio 2010 Lugar: Roma (Italia)

- *Higher aneuploidy risk in sperm and abnormal meiotic recombination levels in non-obstructive azoospermic patients.*

Autores: **Peinado, V.**; Al-Asmar, N.; Gruhn, J.; Rodrigo, L.; Gil-Salom, M.; Martínez, JM.; Pellicer, A.; Remohí, J.; Hassold, TJ.; Rubio, C.

Participación: Poster

Organizador: 4th IVI International Congress

Fecha: 7-9 Abril Lugar: Valencia (España)

- *Relationship between meiotic recombination and sperm aneuploidy and diploidy in non-obstructive azoospermic males.*

Autores: **Peinado, V.**; Al-Asmar, N.; Gruhn, J.; Rodrigo, L.; Gil-Salom, M.; Martínez, JM.; Pellicer, A.; Remohí, J.; Hassold, TJ.; Rubio, C.

Participación: Comunicación Oral

Organizador: 8th European Cytogenetics Conference

Fecha: 2-5 Julio 2011 Lugar: Oporto (Portugal).

- *Estudio de anomalías meióticas y aneuploidías en varones infértiles con azoospermia secretora.*

Autores: **V. Peinado**; N. Al-Asmar; L. Alegre; M. Vera; L. Rodrigo; M. Gil-Salom; JM. Martínez, A. Pellicer; J. Remohí; C. Rubio.

Participación: Poster

Congreso: ASEBIR

Fecha: 20-21 Noviembre 2013 Lugar: Sevilla (España).

- *Increased risk of sperm chromosomal abnormalities and decreased recombination frequency in non-obstructive azoospermic males*

Autores: **Vanessa Peinado**, Nasser Al-Asmar, Lucia Alegre, María Vera, Lorena Rodrigo, Jose María Martínez-Jabaloyas, Manuel Gil-Salom, Carlos Simón, Terry Hassold, Carmen Rubio.

Participación: Comunicación oral

Congreso: ESHRE

Fecha: 14-17 Junio 2015 Lugar: Lisboa (Portugal).



## ABREVIATURAS

<b>ADB</b>	Antibody dilution buffer
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AO</b>	Azoospermia obstructiva post-vasectomía
<b>AS</b>	Azoospermia secretora
<b>ASESA</b>	Asociación Española de Andrología
<b>ASEBIR</b>	Asociación para el estudio de la Biología de la Reproducción.
<b>AZF</b>	Azoospermic Factor
<b>ADAH</b>	AMCA anti human
<b>AMCA</b>	1 amino-4 methylcoumarin-3 acetic acid and Cy3
<b>BSA</b>	Bovin serum albumine
<b>Cen M-FISH</b>	Centromere-specific Multicolor Fluorescence In Situ Hybridization
<b>CEP</b>	Chromosome Enumeration Probes
<b>CREST</b>	Calcinosis - fenómeno de Raynaud - disfunción Esofágica, eSclerodactilia y Telangiesctasia
<b>c</b>	Cromátida hermana
<b>C</b>	Número de bivalentes
<b>CS</b>	Complejo sinaptonémico
<b>Cripto</b>	Criptozoospermicos
<b>ICMART</b>	Comité Internacional de Seguimiento en Tecnología de Reproducción Asistida
<b>ADB</b>	Antibody dilution buffer
<b>DAPI</b>	4', 6-diamidino-2-phenylindole
<b>DSB</b>	Double Strand Breaks
<b>DTT</b>	1,4-Dithiothreitol
<b>E</b>	Entrecruzamientos
<b>FISH</b>	Fluorescence In Situ Hybridization
<b>FSH</b>	Hormona foliculo estimulante
<b>FDAM</b>	Fluorescein anti-mouse
<b>ICSI</b>	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
<b>ICMART</b>	Comité Internacional de Seguimiento en Tecnología de Reproducción Asistida
<b>LH</b>	Hormona Luteinizante
<b>LSI</b>	Locus-Specific Identifier probes

<b>MI</b>	Meiosis I
<b>MII</b>	Meiosis II
<b>MLH1</b>	MutL protein homolog 1
<b>M-FISH</b>	Multiplex Fluorescence In Situ Hybridization
<b>NP-40</b>	Nonyl Phenoxy polyethoxyl ethanol 40
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OAT</b>	Oligoastenoteratozoospermicos
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PFA</b>	Paraformaldehido
<b>PR</b>	Prolactina
<b>RDAR</b>	Rodhamine anti-rabbit
<b>RNV</b>	Recién nacido vivo
<b>SSC</b>	Citrato Sódico Salino
<b>SAC</b>	Spindle assembly checkpoint
<b>SYCP1</b>	Synaptonemal Complex Protein 1
<b>SYCP2</b>	Synaptonemal Complex Protein 2
<b>SYCP3</b>	Synaptonemal Complex Protein 3
<b>T</b>	Testosterona
<b>TRIS</b>	Tris(hydroximetil) aminometano

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento y recordar con merecido reconocimiento a aquellos que en gran medida han contribuido a hacer este trabajo posible.

En primer lugar, gracias a mis directores de tesis:

A la Dra. Carmen Rubio por darme la oportunidad de iniciar mi formación investigadora y abrirme las puertas al mundo de la meiosis. Gracias por la confianza depositada, por los conocimientos transmitidos durante estos años, por contagiarme tu motivación y perseverancia, por tu apoyo y por ser tan generosa con tu tiempo.

Al Dr. Manolo Gil, gracias porque sin ti este momento no hubiera sido posible. Siempre has sido un referente para mí. Gracias por compartir conmigo con ilusión todos mis pequeños logros, personales y profesionales. Espero que estés orgulloso de mí.

Al Dr. Remohí, por la confianza depositada en mí y por estimular e impulsar siempre la investigación desde la clínica.

A las enfermeras de planta de la clínica IVI-Valencia: Susana, María, Budil y Ana, por no dejar escapar un consentimiento informado sin firmar del “estudio meiosis” durante todos estos años. Muchas gracias por vuestra colaboración siempre con una sonrisa.

A los técnicos del laboratorio de semen de la clínica IVI-Valencia: Menchín, Guillermo, Sergio, Rafa, María, Ana Belén y Nuria, por avisarme siempre lo antes posible que ya podía pasar a recoger los restos del tejido de las biopsias y hacérmelo fácil, sobre todo cuando me trasladé a Igenomix.

A los informáticos de la clínica IVI-Valencia: Javi y Víctor muchas gracias por vuestra ayuda con la impresión de las imágenes y apoyo moral todos esos viernes por la tarde – noche, cuando la impresora se quería ir ya de fin de semana y se atascaba sin parar.



Al Dr. Martínez-Jabaloyas, urólogo de la clínica IVI-Valencia, por continuar proporcionandome la materia prima sin la que no se hubiera podido realizar este trabajo. Por tu implicación y tú entusiasmo.

A Lucia Alegre, por tu inestimable ayuda con el Zeiss. Por siempre poder contar contigo.

A la Dra. DianaValbuena y al Dr. Nicolás Garrido por su asesoramiento estadístico.

Al Dr. Terry Hassold, por compartir sus conocimientos sobre la meiosis y por parecerle todo siempre “wonderfull!”.

A todos mis compañeros de Igenomix y la Fundación IVI, por vuestro apoyo moral en estos años de doctorado, y los buenos momentos compartidos, en especial a mis compañeros del laboratorio de DGP-Cromosómico: Emi, Nasser, Miguel, Sandra, y Chiti, la futura Dra. Campos, compañera de penurias “tesiles”. A las nuevas incorporaciones, Pilar y Tantra., por vuestro compañerismo. A Asun por compartir sus conocimientos técnicos sobre zoides, y siempre tener una palabra de ánimo. A María, por aportar su faceta más artística a esta tesis con la portada. A nuestra Eva, por esos abrazos de buenos días a las 8 de la mañana que ayudan a continuar. A Lorena, que me ha visto crecer profesional y personalmente, gracias por todo lo aprendido y compartido estos años, por tu mirada de orgullo en mi primera comunicación oral, por apoyarme siempre.

A mis vecinos del laboratorio de PCR: Ana, Pere, Mariaje, Vicente, Mila, Jose An y Lucia, por hacerme reír cuando más lo necesitaba. Por vuestro cariño y vuestros sabios consejos. Por vuestros ánimos y por hacer que vuelva a casa con gasolina.

A mis compañeras de equipo de DPI en los inicios en el IVI a Merca, Txuki, Laurichu y Thamara, Pili y Tugce, porque aunque nuestros caminos se separaron siempre he sentido vuestro cariño y vuestra amistad a pesar de la distancia y “de cualquier cantidad de tiempo”.

Gracias a mi familia, pilar fundamental en mi vida, sin los que no sería quien soy.

A mis padres, por su apoyo y su amor incondicional. Por ayudarme a cumplir mis sueños.

A mi hermano, por hacerme ver las cosas importantes de la vida

A mi yayi, por tu buen humor, por tu buenos consejos y tú “hija, ya vendrán tiempos mejores”

A mi tía Pili, por estar siempre ahí, en los buenos y malos momentos, por cuidarme siempre. Por tu cariño infinito.

A mi tío Manolo, por tener para mí siempre las puertas abiertas, por preocuparte siempre por mí, por tu cariño, por los buenos momentos y las risas compartidas, por mi primer marichi.

A mis primos María y Daniel, “mis nenes” porque veros crecer ha sido uno de los mejores regalos que me ha dado la vida.

A Emilio, por compartir conmigo todos los días, por hacerme sonreír, por intentar comprenderme, por tus palabras de ánimo y apoyo, y por tu infinita paciencia.







