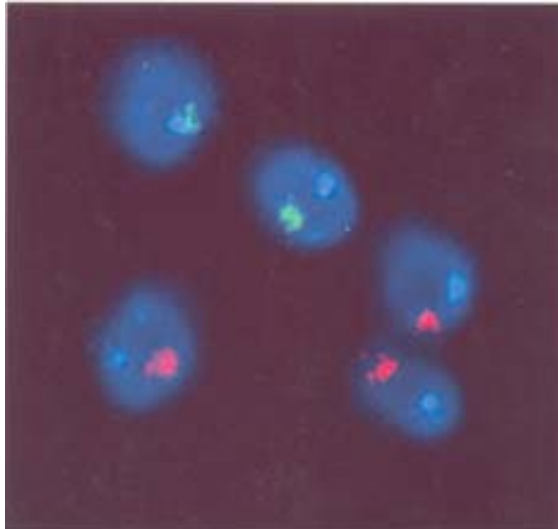


**ANÁLISIS DE ANEUPLOIDÍAS POR FISH EN ESPERMATOZOIDES DE VARONES
INFÉRTILES QUE ACCEDEN A LA MICROINYECCIÓN DE ÓVULOS CON
ESPERMATOZOIDES (ICSI).**



Universidad Nacional de Misiones
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales.

CIAUDIA MARCELA SARTORI

Buenos Aires, 2000.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Claudia M. Sartori', with a horizontal line underneath.

Claudia M. Sartori
Tesista

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Roberto Cocco', with a horizontal line underneath.

Dr. Roberto Cocco
Director

**El presente trabajo se desarrolló en el
Laboratoio de Genética y Reproducción
de FECUNDITAS Medicina Reproductiva.
Noviembre del 2000. Capital Federal.**

Para acceder al título de Licenciado en Genética

SUMARIO

I. RESUMEN

II. INTRODUCCION

III. OBJETIVOS

IV. PACIENTES Y METODOS

V. RESULTADOS

VI. DISCUSION VII. CONCLUSIONES

VIII. ILUSTRACIONES

IX. BIBLIOGRAFIA

INDICE

Resumen

Abstract

Introducción	1
Objetivos	6
Pacientes y Métodos	7
Pacientes	8
Métodos	10
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente Criterios de análisis	12
Estimación de espermatozoides normales en varones con cariotipo normal	17
Evaluación del riesgo reproductivo	19
Análisis de datos	21
Resultados	25
Métodos ensayados	
Análisis de segregación en pacientes con anomalías numéricas y estructurales	26
Pacientes que accedieron a ICSI	31
Discusión	35
Conclusiones	41
Ilustraciones	
Bibliografía	
Agradecimientos	

RESUMEN

La utilización de la técnica de hibridación *in-situ* fluorescente (FISH) para el estudio de cromosomas de espermatozoides de varones normales, infértiles, con o sin espermogramas anormales y portadores de anomalías cromosómicas, permite el análisis de segregación y aneuploidía de determinados cromosomas.

El estudio de los cromosomas 13,18,21,X e Y, provenientes del semen de varones infértiles con cariotipo mitótico normal, permitió estimar la proporción de espermatozoides anormales y evaluar el riesgo reproductivo en los mismos.

La relación entre los resultados de FISH y los resultados de ICSI demostró que el 60% de varones con menos del 25% de espermatozoides aneuploides lograron embarazos evolutivos, mientras que ninguno de los que tenían más del 25% lo lograron.

Los análisis de los patrones de segregación y aneuploidias en portadores de anomalías cromosómicas también nos permitió evaluar la probabilidad de concepción normal y ganar la mayor eficiencia diagnóstica en el Diagnóstico Genético Preimplantatorio (DGP). De los dos pacientes con rearrreglos equilibrados que accedieron al mismo, uno logró embriones normales para transferir, en cambio el otro no logró ninguno de acuerdo con las predicciones de la evaluación con FISH.

Si bien la gran limitación del FISH es no permitir el análisis del complemento cromosómico completo de un espermatozoide, el uso de varias mezclas de sondas es la mejor técnica de la cual se dispone en la actualidad para estimar el riesgo reproductivo.

ABSTRACT

Fluorescent *in-situ* hybridization technique (FISH) for the study of normal and infertile males sperm chromosomes, having normal or abnormal semen samples and being carriers of chromosomal anomalies, allows the segregation and aneuploidy analysis of settled chromosomes.

FISH studies for chromosomes 13,18,21,X and Y, belonging to infertile males semen with normal mitotic karyotype, allowed us to estimate normal sperm proportion and the reproductive risk.

The relation between FISH and ICSI results, showed that 60% of males with less than 25% of aneuploidy sperm, achieved ongoing pregnancies, meanwhile none could of those having over 25%.

Segregation and aneuploidy pattern analysis in carriers of chromosomal abnormalities also allowed us to evaluate the normal conception probability and gain the ultimate diagnostic efficiency in preimplantational genetic diagnosis (PGD) Of the 2 patients with balance rearrangements that accessed to PGD, one achieved normal embryos to transfer but the other one did not, according to the FISH evaluation.

Although the greatest limitation of the FISH technique is the lack for a complete chromosome analysis in one espermatozoid, the use of several probe mixes is the best technique we actually have that allows us to estimate the reproductive risk.

INTRODUCCION

El humano, a diferencia de otras especies, se caracteriza por una baja fecundidad. Las parejas con probada fertilidad que desean tener otro hijo tienen un 25% de chance por ciclo menstrual. Leridon en 1977 infirió que de 100 concepciones, solamente 35 llegan a término. Hertig en 1967 estimó que el 85% de los ovocitos pueden fecundar, el 70% de los mismos implantar y solamente el 42% ser los responsables de la primera falta menstrual. Edmonds y col. en 1982 con los dosajes de las concentraciones de gonadotrofina coriónica en orina indicaron que la fecundación ocurría en aproximadamente el 60% de las parejas y que el 52% de esas concepciones no lograban alcanzar las doce semanas de embarazo. En trabajos mas recientes está documentado que más del 80% de las mujeres fértiles sin cuidados anticonceptivos tienen determinaciones hormonales de embarazo positivas días antes de la fecha menstrual. De esas, sólo 30% van a tener la falta de la menstruación y entre 20 y 25% tienen un embarazo clínico reconocido de las cuales solamente el 18% llegará a término dando lugar a un nacido vivo.

Con los procedimientos de fertilización *in-vitro* también se ha documentado que la tasa de embarazo por ciclo es aproximadamente un 30% pero la tasa de niños nacidos vivos es entre 12 y 18% (Sharma *et al.* 1986). Este alto porcentaje de muerte embrionaria temprana podría ser la responsable de la baja fecundidad humana. Si bien varios factores pueden causar la pérdida de los embarazos, las anomalías cromosómicas adquieren la mayor relevancia. Mientras la incidencia de anomalías cromosómicas en recién nacidos es 0,6%, se la ha encontrado 100 veces aumentadas en abortos espontáneos del primer trimestre (Boue *et al.*, 1975,1985; Hassold *et al.*, 1980). Sin embargo, el verdadero nivel de anormalidad cromosómica puede ser aún mayor y probablemente ser letales antes de la implantación. Esas concepciones generalmente no son detectadas, excepto que la fecunda-

ción ocurra *in-vitro* y que los embriones detenidos sean estudiados cromosómicamente. Varias fuentes de estudios citogenéticos en productos de abortos espontáneos han permitido establecer una tasa promedio de anomalías cromosómicas del 50% correspondiendo el 96% a anomalías numéricas y 4% a anomalías estructurales. La mayoría de las anomalías numéricas se originan de novo debido a no disyunción meiótica en un progenitor o a una no disyunción mitótica post fecundación. Koehler y colaboradores (Koehler *et al*, 1996) con estudios moleculares para determinar el origen de las aneuploidías sugieren que la no disyunción materna es la principal causa de las trisomías autosómicas, mientras que la paterna lo es para las aneuploidías de los cromosomas sexuales. En cambio las anomalías estructurales, la mayoría de las veces, son transmitidas por progenitores portadores de rearrreglos estructurales. Por otro lado, los estudios cromosómicos realizados en parejas con abortos a repetición señalan una mayor incidencia de rearrreglos equilibrados respecto de la población general. Con el aumento de la edad materna, la frecuencia de abortos espontáneos y el porcentaje de los mismos cromosómicamente anormales también incrementa (Schulman *et al.*, 1995).

Si bien es cierto que en los productos de aborto se han encontrado a todas las trisomías autosómicas, excepto la del cromosoma 1, su contraparte, es decir, las monosomías correspondientes a cada una de las trisomías no se han hallado, excepto la monosomía del X. Se puede inferir que muy probablemente las monosomías son más letales que las trisomías y por ende se perderían antes o inmediatamente después de la implantación sin llegar a reconocerse el embarazo. La proporción de concepciones aneuploides disminuye a medida que progresa el embarazo, presumiblemente debido a una fuerte selección que elimina las constituciones desequilibradas. De hecho, Boue y colaboradores (Boue *et al.*, 1985) documentaron que el porcentaje de aneuploidía varía con la edad gestacional, desde un 9% a las tres semanas, un 5% a las diez semanas y solamente un 0,5% a término. Durante los primeros días después de la concepción la proporción de

aneuploidías, es mucho más alta y la selección en contra de las células anormales solamente comienza en la transición entre mórulablastocisto, es decir entre el día cuatro y quinto (Evsikov & Verlisnky, 1998). Estudios bien recientes pertenecientes a Wells & Delhanty en Noviembre del 2000, evidenciaron con el estudio de CGH (Hibridización Genómica Comparativa) que las tres cuartas partes de los embriones estudiados poseían células aneuploides, porcentaje mucho mayor que el hallado en estudios previos (50-58%) detectadas por el análisis de FISH (hibridación *in-situ* con sondas cromosómicas fluorescentes) para determinados cromosomas. Además el trabajo de Wells & Delhanty demuestra que cuando las células son aneuploides varios cromosomas están involucrados. Esta comprobación es muy importante ya que significa que existe una probabilidad muy alta de detectar a un embrión anormal aún cuando es estudiado con un número pequeño de sondas. De hecho el mismo grupo con una vasta experiencia en el diagnóstico preimplantacional de embriones con tres sondas X, Y y 1, o sea un octavo del total del genoma detectaron más de la mitad de los embriones anormales. Los autores evidenciaron aneuploidias rarísimas o nunca vistas en gestaciones más avanzadas tales como monosomías o nulisomías de cromosomas grandes.

La revisión de varias fuentes de estudios citogenéticos en ovocitos humanos inseminados no fertilizados de ciclos inducidos provenientes de programas de fertilización *in vitro* reveló que la frecuencia de anomalías cromosómicas varía entre 3 y 56%, con una frecuencia promedio de 24% (Coco R., 1997). Si bien aún no está dilucidado si la alta proporción de anomalías en ovocitos se debe a factores intrínsecos o extrínsecos de la gametogénesis, lo concreto es que la tasa es mucho mayor que la encontrada en espermatozoides humanos la cual es entre 10-15%. Las anomalías documentadas en gametas humanas estarían significando que la posibilidad de concepción anormal por falla de la gametogénesis es no menor a 35%, y si

se tuvieran en cuenta los errores que ocurren en la fertilización y los post mitóticos se elevaría a un 50%.

La experiencia lograda con el cultivo prolongado de los embriones en los programas de fertilización *in-vitro* ha permitido establecer que menos del 50% de los huevos fecundados alcanzan el estadio de blastocisto en el quinto día. Además, el estudio citogenético de los embriones detenidos evidencia que la mayoría de esas detenciones son por problemas cromosómicos. De hecho, la mayoría de los embarazos logrados en FIV (fertilización *in-vitro*) con transferencia de tres embriones son únicos. Por lo tanto el proceso *in-vivo* parece no diferenciarse demasiado de lo que ocurre *in-vitro*.

En la década del 90 surgió la posibilidad de tratar al factor masculino asistiendo micromanipulativamente la fertilización, técnica denominada ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides), con resultados muy promisorios. Si bien es verdad que es el mejor método para el tratamiento del factor masculino severo, también es cierto que no todos se benefician con el mismo y además que la tasa de los nacidos con anomalías cromosómicas está aumentada, sobre todo la de los cromosomas sexuales, por ser las autosómicas letales. Como en el factor masculino severo la causa cromosómica tiene relevancia, se torna imperioso determinar previo al tratamiento cual es el riesgo reproductivo para que los pacientes puedan decidir qué hacer. Obviamente que el propósito no sería discriminarlos, sino que accedan al procedimiento conociendo las chances concretas para lograr el embarazo y si cuentan con riesgo genético aumentado, saber que pueden recurrir al diagnóstico genético preimplantatorio.

En la actualidad es posible el análisis de los cromosomas de los espermatozoides con la técnica de hibridación *in-situ* con sondas cromosómicas fluorescentes (FISH). Si bien es verdad que posee la limitación de no permitir estudiar aún a todo el complemento cromosómico, es el mejor análisis para evaluar la proporción de espermatozoides anormales. De hecho, los resultados obtenidos en varones normales

concuerdan con los previos obtenidos con la técnica de fertilización en ovocitos de hámster. Otra ventaja es que permite un mayor número de espermatozoides analizables respecto de la técnica de fertilización de ovocitos de hámster (Rudak *et al.*, 1978).

OBJETIVOS

1°) Puesta a punto del estudio de los espermatozoides con la técnica de FISH (hibridación *in-situ* fluorescente).

2°) Evaluación de los resultados de la hibridación con que dan lugar a las aneuploidias mas frecuentes (13, 18, 21, X e Y) sobre extendidos de espermatozoides directos y luego de la decondensación *in-situ* o *in-vitro* con DTT.

3°) Análisis de las aneuploidias de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y en varones infértiles que accedieron a ICSI.

4°) Estimación de la producción de espermatozoides cromosómicamente normales luego de analizarlos con las cinco sondas mencionadas.

5°) Evaluación del riesgo reproductivo de los varones infértiles estudiados.

6°) Análisis de los patrones de segregación en los portadores de anomalías cromosómicas numéricas y estructurales.

PACIENTES Y METODOS

PACIENTES

Se estudiaron a pacientes que concurrieron a Fecunditas Instituto de Medicina Reproductiva para diagnóstico y tratamiento de la infertilidad masculina.

Se realizó el estudio del semen con FISH en:

- a) Dos pacientes con semen normal para la puesta a punto de la metodología.
- b) Un paciente de 40 años de edad, infértil con oligoastenoteratozoospermia (OAT), portador de un mosaico 46,XY(12%)/47,XYY(88%). Como antecedente había realizado un procedimiento de ICSI fallido con 4 embriones transferidos resultando en un aborto espontáneo en primer trimestre.
- e) Un paciente de 37 años de edad, infértil con OAT portador de una translocación Robertsoniana t(13;14)(q10;q10).
- d) Un paciente de 35 años de edad, con espermograma normal portador de una translocación t(2;7)(q24;q22) que consulta por 7 abortos espontáneos con el antecedente de una hija normal no estudiada citogenéticamente.
- e) Un paciente de 34 años de edad, con espermograma normal portador de translocación t(1;4)(p32;q25) con antecedentes de 5 abortos espontáneos, dos de ellos con estudio cromosómico anormal, uno con una segregación adyacente 1 anómala y otro con trisomía 18. Los tres primeros no fueron estudiados citogenéticamente.

- f) Diez pacientes infértiles con semen anormal quienes accedieron al procedimiento terapéutico de microfertilización asistida (ICSI). La totalidad de espermatozoides móviles normales (TMN) varió desde 0 hasta 5×10^6 espermatozoides/ml. Se consigna que un TMN menor de 1×10^6 espermatozoides/ml corresponde a un semen de mala calidad, entre 1 a 5×10^6 espermatozoides/ml de regular calidad, mayor a 5×10^6 espermatozoides/ml de buena calidad y mayor de 10×10^6 espermatozoides/ml a un semen de muy buena calidad.

MÉTODOS

Las muestras de semen fueron obtenidas por masturbación y se conservaron en Test Yolk unas horas hasta ser procesadas.

a) FISH sobre extendidos de espermatozoides sin tratamiento: El eyaculado se lavó en PBS (buffer fosfato salino), el pellet de espermatozoides se trató con CIK 0,075 M y posteriormente se fijo con Carnoy I. Los extendidos se realizaron con la técnica estándar de secado al aire el día en que se iban a hibridar. La suspensión celular se conservó a -20°C .

b) FISH sobre extendidos de espermatozoides decondensados *in*

vitro:

Al eyaculado se le agregó el mismo volumen de PBS a pH 7 Y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 500 G durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y al pellet se le agregó 1 ml de PBS conteniendo 6 mM de EDTA a pH 7. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente y al pellet se le agregó 1 ml de DTT

2mM en PBS y se incubó 45 minutos a 37°C. Durante la incubación se resuspendió 2 a 3 veces el preparado con una pipeta pasteur fina. Se centrifugó y al pellet se agregaron 2 ml de PBS dejándolo 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente y al pellet se agregaron 5 ml de fijador Carnoy I, dejándolo durante 30 minutos. Se lavaron otras dos veces más en fijador fresco. Se resuspendió en un pequeño volumen de fijador, aproximadamente 0,5 ml (variable de acuerdo con el pellet) y se conservó a -20°C hasta realizar los extendidos, los cuales se realizaron con la técnica estándar de secado al aire el día de la hibridación. La decondensación fue evaluada con microscopio de contraste de fase sin colorear los preparados.

e) FISH sobre extendidos de espermatozoides decondensados *in-situ*: El eyaculado se lavó en PBS. El pellet de espermatozoides se trató con CIK 0,075 M y posteriormente se fijó con Carnoy I. Los extendidos se realizaron con la técnica estándar de secado al aire. Los preparados se hibridaron en fresco o se conservaron congelados a -20°C hasta realizar los extendidos. Antes de la hibridación los extendidos fueron lavados en 2xSSC durante 2 minutos para remover el exceso de fijador, luego fueron incubados a 37°C durante 5 minutos en PBS con 20 mM de DTT. Luego fueron lavados en 2xSSC nuevamente durante 2 minutos.

d) FISH sobre extendidos decondensados *in-vitro* mas solubilización del ADN *in-situ*: Al eyaculado se agregó el mismo volumen de PBS a pH 7 Y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 500 G durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y al pellet se le agregó 1 ml de PBS conteniendo 6 mM de EDTA a pH 7. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente y al pellet se le agregó 1 ml de DTT (ditiotritiol) 2mM en PBS y se incubó 45 minutos a 37°C.

Durante la incubación se resuspendió 2 a 3 veces el preparado con una pipeta pasteur fina. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante, se agregaron 2 ml de PBS dejándolo 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente y se agregó al pellet 5 ml de fijador Carnoy I, dejándolo durante 30 minutos. Se lavaron dos veces más en fijador fresco, después de centrifugar y descartar el sobrenadante se agregó un pequeño volumen de fijador aproximadamente 0,5 ml (variable de acuerdo con el pellet). La suspensión celular se conservó a -20°C hasta realizar los extendidos, los cuales se realizaron con la técnica estándar de secado al aire el día de la hibridación. Los extendidos fueron sumergidos en NaOH 3 M durante 1,5 a 2 minutos a temperatura ambiente. La decondensación de los núcleos espermáticos fue observada con microscopio de contraste de fase sin colorear los preparados.

HIBRIDACIÓN *IN-SITU* FLUORESCENTE

Tratamiento previo a la hibridación

Los extendidos se envejecieron en horno microondas durante 10 segundos. Posteriormente fueron sumergidos en 2XSSC con 1% de Formol durante cinco minutos y deshidratados con alcohol etílico 70, 85 y 100% durante dos minutos en cada uno de ellos, luego se dejaron secar al aire.

Hibridación

Se hibridaron con sondas centroméricas, loci específicas y teloméricas, de acuerdo con el propósito del estudio. Los preparados se calentaron 10 segundos en horno microondas y se montaron con las mezclas de sondas. Diez microlitros de mezclas de sondas se colocaron por cada 18 mm² de cubreobjeto, el cual se montó sobre el preparado. Se sellaron los bordes con cemento de pegar y se hibridaron en el hibridizador HYBRITE de Vysis, siendo la temperatura de desnaturalización 69°C durante 8 minutos y la de hibridación 37°C durante 15 hs.

Lavados

Se quitaron los cubreobjetos de los preparados y se realizaron tres lavados; el primero en 2XSSC (cloruro de sodio citrato) con 50% de formamida durante 10 minutos, seguido por un lavado en 2XSSC también durante 10 minutos y el último en 2XSSC con 0,01% de Tween-20 durante 10 minutos; cada uno de ellos a 42°C. Posteriormente fueron sumergidos en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y enjuagados 2 a 3 veces en agua deionizada. Se dejaron secar al aire. Los extendidos se montaron con cubreobjetos de 24 x 24 mm conteniendo 10 microlitros de DAPI 11 como contra colorante.

Análisis Microscópico

Se usó un microscopio Nikon equipado con epifluorescencia con filtros simple, doble y triple para DAPI, FITC, y Texas Red.

El análisis fue realizado con objetivos de inmersión 100X de fluorita bajo aceite libre de fluorescencia.

Las señales fluorescentes con cada uno de los filtros simples fueron capturadas por una videocámara fría (Xillix microimager) y posteriormente compuestas con el software de imágenes Multifluor de BOI (Biological Detection Inc).

Se analizaron no menos de 1000 espermatozoides por mezcla de sondas y se registraron las aneuploidias y los distintos patrones de segregación observados en los pacientes estudiados.

CRITERIOS DE ANALISIS

Aneuploidías

Se registraron las señales fluorescentes de los núcleos de los espermatozoides decondensados. Se excluyeron los espermatozoides poco o muy decondensados, como así también los superpuestos y con bordes indefinidos. De acuerdo con los criterios de Martín & Rademaker (1995) dos señales de un mismo color separadas por una distancia menos que el diámetro mayor de uno de los dominios fue registrada como única señal. En cambio, se consideraron como dos señales de una misma sonda (disomía) sólo cuando los dominios de las señales eran de igual brillo y estaban separadas por una distancia mínima igual al diámetro de la mayor. La ausencia de señal de una sonda fue considerada como nulisomía para ese cromosoma. los espermatozoides que no mostraron señal para ninguna de las sondas usadas no se registraron debido a que podían ser el resultado de falta de hibridación por inadecuada decondensación. Un espermatozoide fue considerado diploide cuando tenía dos señales de cada una de las sondas usadas.

Patrones de segregación para los padentes con Rearreglos Equilibrados

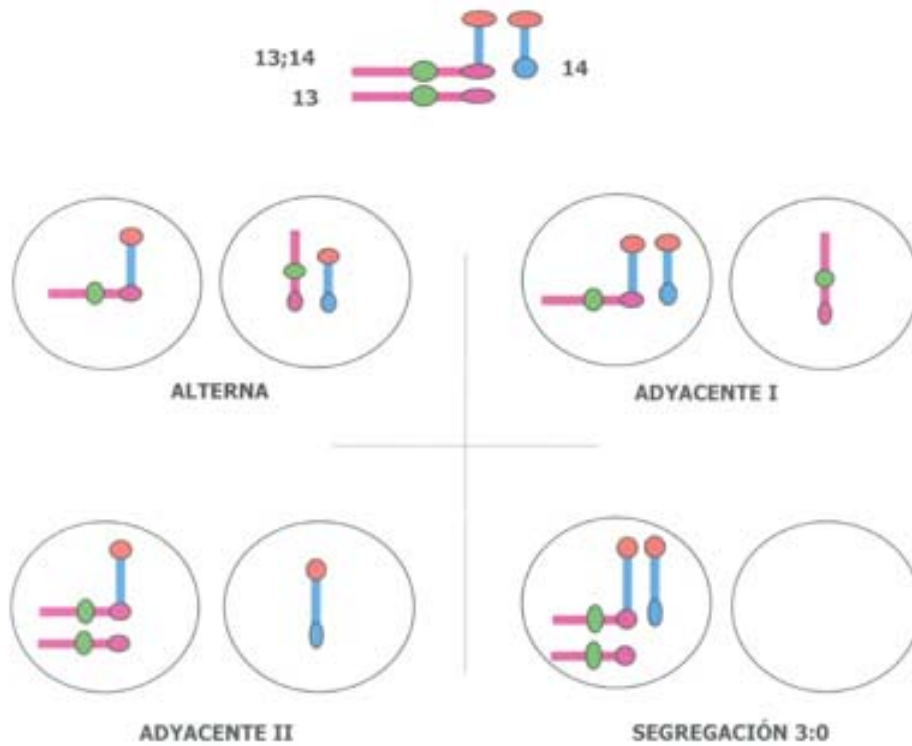
Para evaluar el patrón de segregación de los cromosomas de los portadores de translocaciones recíprocas, se utilizaron distintas sondas de acuerdo con el tipo de translocación y los cromosomas involucrados en la mismas.

Para la **translocación Robertsoniana t(13;14)(q10;q10)** se utilizaron dos sondas con fluorocromos distintos; una sonda locus específica para el cromosoma

13 cuya señal era de color verde. Para el cromosoma 14 se utilizó una sonda telomérica (14 qter) cuya señal era de color rojo.

Se consideró a un espermatozoide como perteneciente a uno de los 3 posibles patrones de segregación de acuerdo con el siguiente esquema.

Segregación del tivalente (13:14)



Segregación alterna: cuando en el núcleo se observaron dos señales, una de color rojo y otra verde.

Segregación adyacente 1: espermatozoides con tres señales: dos señales de color rojo y una verde ó espermatozoides con una única señal verde.

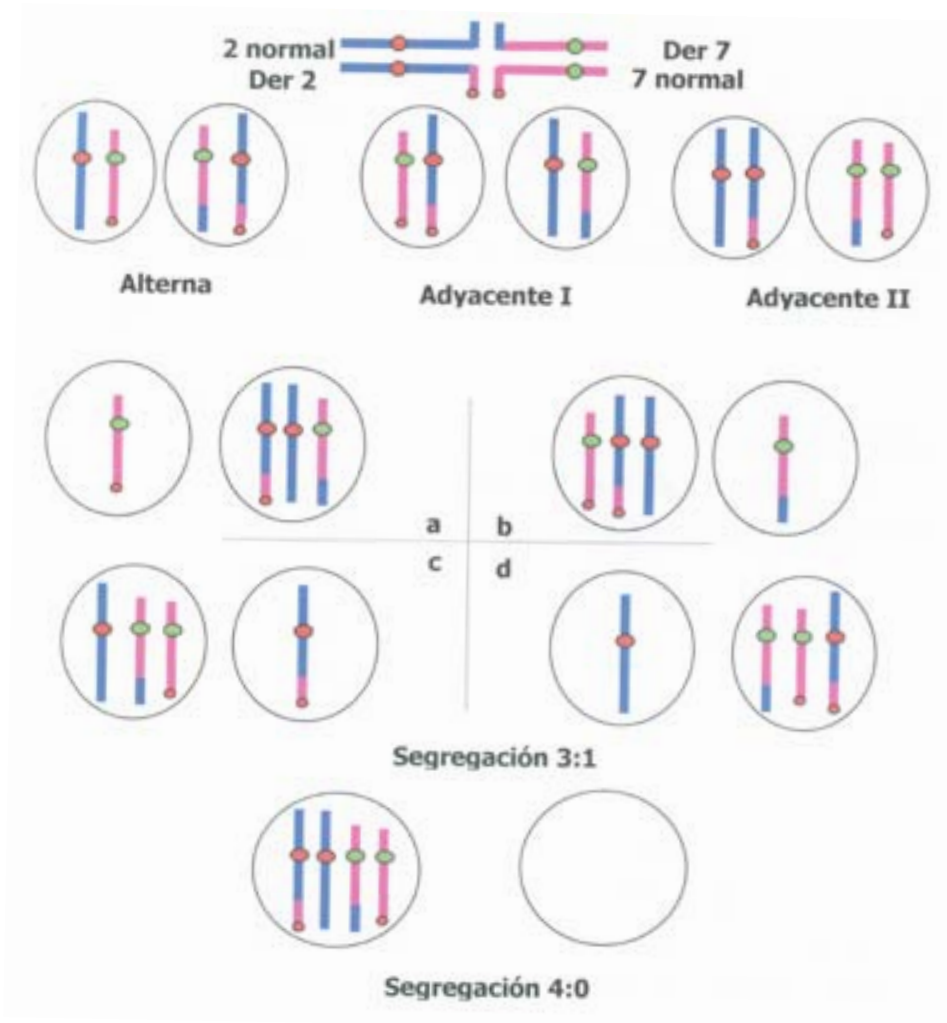
Segregación adyacente II: espermatozoides con tres señales: dos señales de color verde y una roja ó espermatozoides con una única señal roja.

Segregación 3:0: espermatozoides con 4 señales; dos de color verde y dos de color roja. Los que no tenían señales no se consideraron.

Para la **Translocación t(2;7)(q24;q22)** se utilizaron sondas centroméricas para ambos cromosomas con distintos fluorocromos: el cromosoma 2 de color rojo y el cromosoma 7 verde. Además se utilizó una sonda telomérica para el cromosoma 7 (7qter) de color rojo, observada a poca distancia de los centrómeros de ambos cromosomas y tamaño menor que las señales centroméricas.

Se consideró a un espermatozoide como perteneciente a uno de los cuatro posibles patrones de segregación de acuerdo con el siguiente esquema:

segregación del cuadrivalente t(2;7)



Alternativa: tres señales, una señal verde y dos de color rojo, siendo una de menor tamaño, con cromosomas 2 y 7 normales cuando la señal roja de menor tamaño estaba ubicada cerca de la señal verde. Con ambos cromosomas translocados (equilibrados) cuando las dos señales de color rojo estaban ubicadas a poca distancia.

Adyacente I: cuatro señales, una verde y tres de color rojo, dos de ellas de menor tamaño, o bien dos señales, una roja y otra verde.

Adyacente II: tres señales de color rojo, siendo una de menor tamaño, o bien tres señales, dos de color verde y una roja pequeña.

Segregación 3:1 :

- a) Dos señales, una verde y otra roja de tamaño pequeño, o bien cuatro señales, una verde y tres de color rojo, siendo una más pequeña.
- b) Una señal verde o bien cinco señales, una verde y cuatro de color rojo, siendo dos más pequeñas.
- c) Dos señales de color rojo, siendo una más pequeña, o bien cuatro señales, dos de color verde y dos de color rojo, siendo una de menor tamaño.
- d) una señal roja o bien cinco señales, dos de color verde y tres de color rojo, siendo dos más pequeñas.

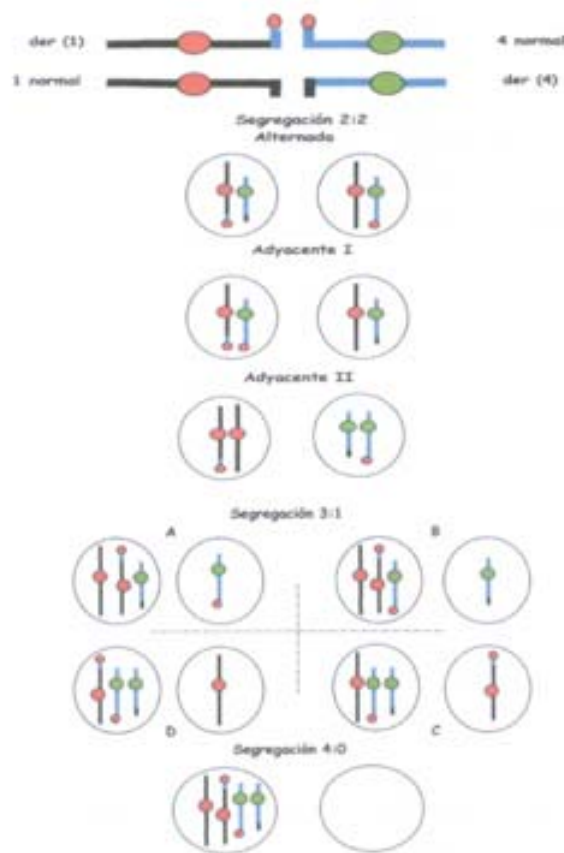
Segregación 4:0 : Seis señales, dos de color verde y cuatro de color rojo, siendo dos más pequeñas, o bien sin señales en un área de buena hibridación.

Se excluyeron todas las demás señales que no fueron anteriormente mencionadas como las correspondientes a los errores de no disyunción de la segunda división.

La segregación 4:0 fue constatada, aunque no se la consideró en los cálculos debido a que podía corresponder el mismo patrón a una diploidía o a una célula somática. Sólo se consideraron a los núcleos con patrón de segregación 4:0 a aquellos con seis señales y se los multiplicó por dos debido a que el patrón sin marcas podría deberse a falta de hibridación.

Translocación t(1;4)(p32;q25) Para estimar la segregación del cuadrivalente meiótico se usaron tres sondas: centromérica del cromosoma 1 conjugada con rojo, sonda centromérica del cromosoma 4 conjugada en verde, y sonda telomérica del brazo largo del cromosoma 4 conjugada en rojo. Se consideró a un espermatozoide como perteneciente a uno de los cuatro posibles patrones de segregación de acuerdo con el siguiente esquema.

Segregación del cuadrivalente t(1;4)



Alternas: tres señales, una señal verde y dos de color rojo, siendo una de menor tamaño. Con cromosomas 1 y 4 normales cuando la señal roja de menor tamaño estaba ubicada cerca de la señal verde. Con ambos cromosomas translocados (equilibrados) cuando las dos señales de color rojo estaban ubicadas a poca distancia.

Adyacente I: cuatro señales, una verde y tres de color rojo, dos de ellas de menor tamaño, o bien dos señales, una roja y otra verde.

Adyacente II: tres señales de color rojo, siendo una de menor tamaño, o bien tres señales, dos de color verde y una roja pequeña.

Segregación 3:1 :

- a) Dos señales, una verde y otra roja de tamaño pequeño, o bien cuatro señales, una verde y tres de color rojo, siendo una más pequeña.
- b) Una señal verde o bien cinco señales, una verde y cuatro de color rojo, siendo dos más pequeñas.
- c) Dos señales de color rojo, siendo una más pequeña, o bien cuatro señales, dos de color verde y dos de color rojo, siendo una de menor tamaño.
- d) Una señal roja o bien cinco señales, dos de color verde y tres de color rojo, siendo dos más pequeñas.

Segregación 4:0 :

Seis señales, dos de color verde y cuatro de color rojo, siendo dos más pequeñas, o bien sin señales en un área de buena hibridación.

Se excluyeron todas las demás señales que no fueron anteriormente mencionadas como las correspondientes a los errores de no disyunción de la segunda división. La segregación 4:0 fue constatada, aunque no se la consideró en los cálculos debido a que podía corresponder el mismo patrón a una diploidía o a una célula somática.

Solo se consideraron a los núcleos con patrón de segregación 4:0 a aquellos con seis señales y se los multiplicó por dos debido a que el patrón sin marcas podría deberse a falta de hibridación.

ESTIMACION DE ESPERMATOZOIDES NORMALES EN VARONES CON. CARIOTIPO MITOTICO NORMAL

Se considera a un espermatozoide como normal cuando los 23 cromosomas (22 autosómicos mas el sexual) son normales.

Como en el presente estudio evaluamos a 5 cromosomas (13, 18, 21, X e Y), se puede estimar la probabilidad de normalidad de todo el complemento cromosómico aplicando la fórmula:

$$P_n = P_s \times (P_e)^{22}$$

Suponiendo que exista independencia entre los cromosomas y que el comportamiento de los cromosomas no evaluados sea similar a los estudiados, en donde:

P_s = porcentaje de espermatozoides con cromosomas sexuales normales

P_e = media geométrica de normalidad de los cromosomas estudiados, o sea;

$$P_e = (P_{13}, P_{18}, P_{21})^{1/3}$$

P_{13} = porcentaje de espermatozoides con cromosoma 13 normal.

P_{18} = porcentaje de espermatozoides con cromosoma 18 normal.

P_{21} = porcentaje de espermatozoides con cromosoma 21 normal.

Estimación de espermatozoides normales en varones con rearrreglos equilibrados

- a) Para la **translocación t(13;14)**, como se documentó un fuerte efecto intercromosómico para el par 21, se aplicó la siguiente fórmula:

$$P_n = P_s \cdot P_{\text{Rea.}} \cdot P_{21} [(P_{18})]^{19}$$

P_s = porcentaje de espermatozoides con cromosoma sexual normal.

$P_{\text{Rea.}}$ = porcentaje de espermatozoides con segregación equilibrada del trivalente t(13;14).

P_{21} = porcentaje de espermatozoides con cromosoma 21 normal.

P_{18} = porcentaje de espermatozoides con cromosoma 18 normal.

- b) Para la **translocación t(2;7)**, como el análisis de aneuploidía de los cromosomas 13, 18 y 21 fue similar se aplicó la siguiente fórmula:

$$P_n = P_s \cdot P_{\text{Rea.}} \cdot [(P_{13}, P_{18}, P_{21})^{1/3}]^{20}$$

P_s = porcentaje de espermatozoides con cromosoma sexual normal.

$P_{\text{Rea.}}$ = porcentaje de espermatozoides con segregación equilibrada de cuadrivalente t(2.;7).

P_{13} = porcentaje de espermatozoides con cromosoma 13 normal.

P_{21} = porcentaje de espermatozoides con cromosoma 21 normal.

P_{18} = porcentaje de espermatozoides con cromosoma 18 normal.

c) Para la **translocación t(1;4)** como el porcentaje de aneuploidía para los cromosomas 1, 4, 13, 18 y 21 fue similar, se aplicó la siguiente fórmula:

$$P_n = P_s \cdot [(P_1, P_4, P_{13}, P_{18}, P_{21})^{1/5}]^{22}$$

P_s = porcentaje de espermatozoides con cromosoma sexual normal.

P_1 = porcentaje de espermatozoides con cromosoma 1 normal ó translocado.

P_4 = porcentaje de espermatozoides con cromosoma 4 normal ó translocado.

P_{13} = porcentaje de espermatozoides con cromosoma 13 normal.

P_{21} = porcentaje de espermatozoides con cromosoma 21 normal.

P_{18} = porcentaje de espermatozoides con cromosoma 18 normal.

EVALUACION DEL RIESGO REPRODUCTIVO

Se calculó teniendo en cuenta el porcentaje de espermatozoides anormales estimado y el porcentaje de ovocitos anormales. Como el porcentaje de aneuploidia en ovocitos varía de acuerdo con la edad se estimó el mismo en 20% hasta 30 años de edad, 25% hasta 35 años, 30% hasta 40 años y 40% o más para las mayores de 40 años.

Por lo tanto la probabilidad de concepciones normales dependerá del porcentaje de gametas anormales de la pareja, como se esquematiza en el siguiente tablero

♀ \ ♂	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○
●	●●	●●	●●	●●	●●	○●	○●	○●	○●	○●
●	●●	●●	●●	●●	●●	○●	○●	○●	○●	○●
●	●●	●●	●●	●●	●●	○●	○●	○●	○●	○●
○	○●	○●	○●	○●	○●	○○	○○	○○	○○	○○
○	○●	○●	○●	○●	○●	○○	○○	○○	○○	○○
○	○●	○●	○●	○●	○●	○○	○○	○○	○○	○○
○	○●	○●	○●	○●	○●	○○	○○	○○	○○	○○
○	○●	○●	○●	○●	○●	○○	○○	○○	○○	○○
○	○●	○●	○●	○●	○●	○○	○○	○○	○○	○○

○ Normal
● Anormal

Probabilidad de concepción normal: 35 %

Para el cálculo de probabilidades se aplicó la siguiente fórmula:

$$P = (P_o \cdot P_e) / 100 + P_o - (P_o \cdot P_e / 100) + P_e - (P_o \cdot P_e / 100)$$

Siendo:

P_o = porcentaje de ovocitos anormales estimado de acuerdo a la edad de la mujer

P_e = porcentaje de espermatozoides anormales evaluados por FISH.

ANALISIS DE DATOS

Relación entre resultados de procedimiento ICSI y del análisis de aneuploidía con FISH en espermatozoides

Se registraron los porcentajes de aneuploidías correspondientes a 10 varones infértiles quienes accedieron al ICSI. Se estimó el porcentaje de espermatozoides normales y el riesgo reproductivo que conllevaba cada uno de ellos y estos datos se relacionaron con el logro de embarazo evolutivo.

Análisis de porcentaje de espermatozoides anormales

Para comparar los porcentajes de espermatozoides anormales entre los que lograron embarazos y los que no lo lograron se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney. Para normalizar los porcentajes de espermatozoides anormales se aplicó la transformación angular $y = \arcsen \sqrt{X}$. Con los datos transformados, se aplicó el test F para analizar la igualdad de las varianzas y luego se aplicó el test de Student con la corrección de Welch.

Análisis de porcentaje de cromosomas sexuales anormales

Se relacionaron los porcentajes de espermatozoides con cromosomas sexuales anormales entre los grupos con y sin embarazo. Para normalizar los porcentajes de cromosomas sexuales anormales se aplicó la transformación angular $Y = \arcsen \sqrt{X}$. Con los datos transformados, se aplicó el test F para analizar la igualdad de las varianzas. Luego se aplicó el test de Student de una cola.

Análisis de porcentaje de cromosomas autosómicos anormales

Se calculó el porcentaje de espermatozoides con cromosomas autosómicos anormales con la media geométrica de los evaluados.

Se normalizaron los datos con la transformación angular $Y = \arcsen \sqrt{X}$. Se aplicó el test F para analizar la igualdad de las varianzas. Luego se aplicó el test de Student con la corrección de Welch.

Relación entre la tasa de embarazos con el porcentaje de espermatozoides anormales

Los pacientes estudiados se dividieron en 2 grupos: los que tenían más de 25% de espermatozoides anormales y los que tenían menos de 25%.

Para comparar la relación entre la tasa de embarazo y el porcentaje de espermatozoides anormales, como el número de casos era pequeño se aplicó el Test exacto de Fisher de una cola.

RESULTADOS

1) METODOS ENSAYADOS

A: *FISH sobre extendidos de espermatozoides sin tratamiento*: No satisfactorio fundamentalmente por la baja eficiencia de hibridación y la visualización no clara de las señales en un núcleo tan pequeño.

B: *FISH sobre extendidos de espermatozoides decondensados in-vitro*: Satisfactorio en general cuando la muestra es normal. No así para muestras severamente alteradas donde obviamente la decondensación tiene un valor funcional del espermatozoide. (Ver figura 1A)

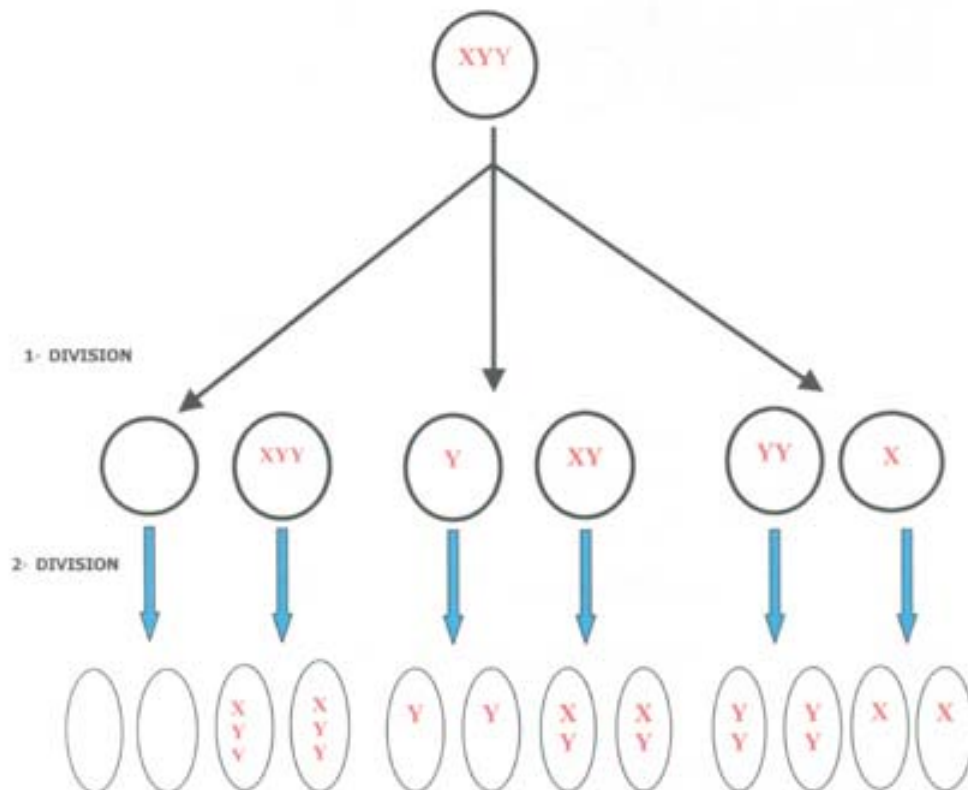
C: *FISH sobre extendidos de espermatozoides decondensados in-situ*: No satisfactorio por la no uniformidad en la decondensación y la gran cantidad de detritus que impiden una buena visualización de las señales. (Ver figura 1B)

D: *FISH sobre extendidos decondensados in-vitro mas solubilización del ADN in-situ*: Fue la combinación ideal para muestras con espermogramas muy alterados.

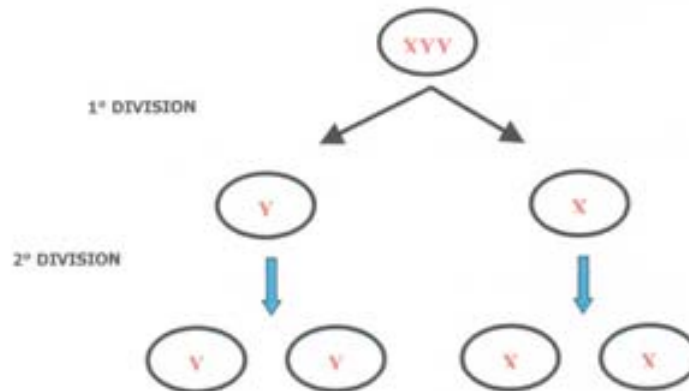
2) ANALISIS DE SEGREGACION EN PACIENTES CON ANOMALIAS NUMERICAS Y ESTRUCTURALES:

a) *Paciente mosaico XY/XYY (Ver figura 2A)*

Posible segregación del XYY sin pérdida del Y extra



Segregación del XYY con pérdida del Y extra



Análisis de Aneuploidía (Figuras: 2B, 2C, 2D, 2E, 2F)

Cromosomas Analizados	% Aneuploidias	
	XYY	Control
13	5,9	0,5
21	3	1,1
18	2,6	0,3
XY	7,7	0,7

CROMOSOMAS SEXUALES ANORMALES

Constitución	% espermatozoides
XY	2,43
XX	0,10
YY	3,35
XXYY	0,10
XXY	0,11
XYY	0,40
0	1,21

La estimación de espermatozoides cromosómicamente normales dio: 38,9%. La posibilidad de concepción normal con la pareja, admitiendo una tasa promedio de óvulos anormales del 25% para mujeres menores de 35 años, dio: 45,83 %.

b) Análisis de segregación y aneuploidía en un portador de translocación Robertsoniana t(13;14) (Ver figura 3A)

Patrones de segregación del trivalente t(13;14)

(Figuras: 3B, 3C, 3D, 3E)

Segregación		Señales	Porcentaje de espermatozoides
ALTERNA			67,66
ADYACENTE	I		31,14
	II		
3:0		 AUSENTES	1,20

Análisis de Aneuploidia

Cromosomas	% Aneuploidia
13	30,18
18	0,99
21	22,73
Sexuales	3,47

La estimación de espermatozoides cromosómicamente normales dio: 42,09% La posibilidad de concepción normal, admitiendo una tasa promedio de óvulos anormales del 30% para la edad de su mujer de 35 años, dio: 33,66%.

c) *Análisis de segregación y aneuploidía en un portador de translocación t(2;7) (Ver figura 4)*

Patrones de segregación del cuadrivalente t(2;7)

(Figuras: 6 A, B, C, D y E)

Segregación	Señales	Espermatozoides	%
ALTERNA		262	26,5
ADYACENTE I		261	26,4
ADYACENTE II		132	13,6
3:1		331	33,5
4:0		14	
	AUSENTES		

Análisis de Aneuploidía

Cromosomas	% Aneuploidía
13	1,0
18	0,4
21	0,8
Sexuales	0,7

La estimación de espermatozoides cromosómicamente normales dio: 22,5%. La posibilidad de concepción normal, admitiendo una tasa promedio de óvulos anormales del 30% para la edad de su mujer de 35 años, dio: 22,5%.

d) Análisis de segregación y aneuploidia de un portador de translocación t(1.:4) (Ver figura 5)

Patrones de segregación del cuadrivalente t(1;4)

Segregación	Señales	Espermatozoides	%
ALTERNA		218	24,0
ADYACENTE I		240	26,4
ADYACENTE II		104	11,4
3:1		348	38,2
4:0		104	

Análisis de Aneuploidia

Cromosomas	% Aneuploidia
13	21,5
18	15,2
21	31,0
Sexuales	28,2

La estimación de espermatozoides cromosómicamente normales dio: 1,13%

La posibilidad de concepción normal, admitiendo una tasa promedio de óvulos anormales del 25% para la edad de 31 años de su mujer dio: 0,79%.

3) PACIENTES QUE ACCEDIERON A ICSI

Pacientes	% Aneuploidia				% espermatozoides normales	Riesgo Reproductivo	EMB	NE	AE
	13	18	21	XY					
01	0,9	1	0,9	2,8	79,2	55,44	Si		
02	0,9	1,1	1	0,4	80,4	56,28	Si		
03	1,9	0,1	1,1	0,6	79,2	55,44	Si		
04	0,5	0,3	1,1	0,7	86,8	60,76			Si
05	3,1	0,7	2,6	0,8	61,7	43,19			Si
06	2,8	1,6	1,7	4,6	60,8	42,56			Si
07	2,3	2,8	1,9	2,6	57,9	40,53			Si
08	2	2,9	7,3	5,8	17,0	11,90			Si
09	0,5	0,9	1,1	2,8	81,0	56,70		Si	
10	2	1,1	1,4	3,6	68,7	48,09		Si	

EMB = Embarazo

NE = No embarazo

AE = Aborto espontáneo

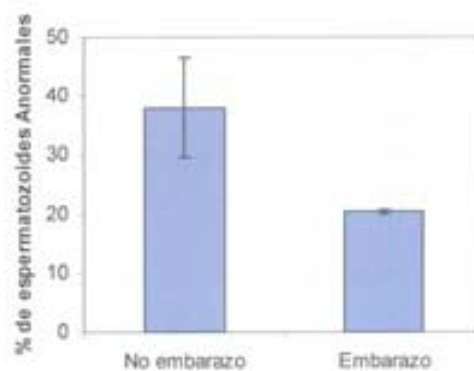
ANALISIS DE PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES ANORMALES

	No embarazo	Embarazo
n	7	3
Media	38,01	20,40
Desvío estándar	22,60	0,69
Error estándar	8,54	0,40
Mediana	38,3	20,8

Test $F_{6;2} = 827,21$ ($p < 0,001$)

Test de Student: $t = 2.026$ con 6 grados de libertad y $P = 0,0446$

El promedio del porcentaje de espermatozoides anormales de los que lograron embarazo es significativamente menor que el de los que no lograron embarazo. ($P < 0,05$).



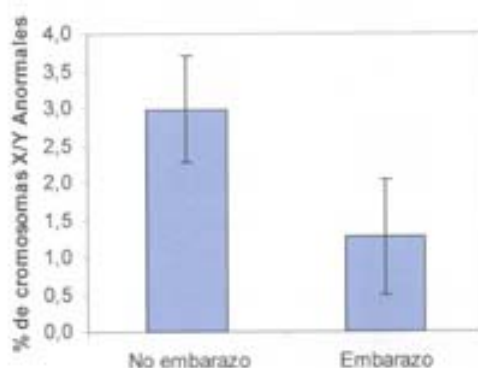
ANÁLISIS DE PORCENTAJE DE CROMOSOMAS SEXUALES ANORMALES

	No embarazo	Embarazo
n	7	3
Media	2,99	1,27
Desvío estándar	1,87	1,33
Error estándar	0,71	0,77

Test $F_{6;2} = 1,119$

Test de Student: $t = 1,510$ con 8 grados de libertad y $P = 0,085$.

No se halló diferencia significativa entre el promedio del porcentaje de cromosomas sexuales anormales de los que lograron embarazo y de los que no lograron embarazo.



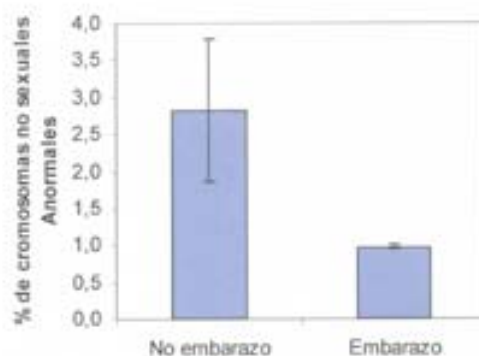
ANALISIS DE PORCENTAJE DE CROMOSOMAS AUTOSÓMICOS ANORMALES

	No embarazo	Embarazo
n	7	3
Media	2,83	0,97
Desvío estándar	2,54	0,06
Error estándar	0,96	0,03

Test $F_{6;2} = 597,7$ ($p < 0,002$)

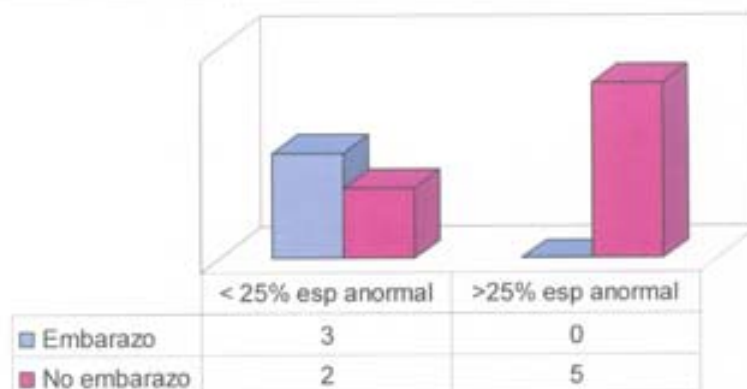
Test de Student: $t = 2.074$ con 6 grados de libertad y $P = 0,042$.

El promedio del porcentaje de cromosomas autosómicos anormales de los que lograron embarazo es significativamente menor que el de los que no lograron embarazo. ($P < 0,05$).



RELACION ENTRE LA TASA DE EMBARAZO CON EL PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES ANORMALES

	Embarazo	No embarazo	Total	Tasa embarazo
< 25% esp anormal	3	2	5	60%
>25% esp anormal	0	5	5	0%



Test exácto de Fisher de una cola: P = 0,083 (no significativo)

La tasa de embarazo en los que tienen <25% de espermatozoides anormales es significativa mente mayor que la de los que tienen > 25% de espermatozoides anormales con P = 0,083

DISCUSION

Anterior al FISH, la constitución cromosómica de espermatozoides se determinaba con la fertilización *in vitro* de espermatozoides humanos con ovocitos de hámster desnudos. La misma fue de gran utilidad, sobre todo a nivel académico, ya que permitió conocer la tasa de anomalías cromosómicas en espermatozoides de varones normales, de varones infértiles y de portadores de anomalías cromosómicas. En la actualidad prácticamente se la dejó de lado debido a que es una técnica cara, de difícil reproducibilidad por la escasa cantidad de figuras metafásicas analizables y por sobre todo no aplicable en los casos de semen severamente dañado.

La hibridación *in situ* fluorescente, si bien también es cara por el valor de las sondas cromosómicas, frente a sus resultados se ha convertido en la técnica de elección cuando se desea conocer la constitución cromosómica de determinados cromosomas. El inconveniente mayor es que es útil para un determinado número de cromosomas por espermatozoide entre 3 y 5 de acuerdo con las sondas y filtros disponibles.

Como trabajo para mi tesina me propuse poner a punto la técnica de análisis de espermatozoides por FISH. Como la estructura cromatínica del espermatozoide es muy compacta, para que pueda penetrar la sonda y posteriormente ver la señal sin dificultades, conviene decondensar a los espermatozoides. El método de elección fue la decondensación *in vitro*. Como ésta es una característica de la funcionalidad de los espermatozoides, para las muestras de semen muy alteradas que tienen poca decondensación, lo ideal es ayudar a la decondensación *in vitro* con hidróxido de sodio una vez hecho el extendido. Si bien a veces un espermatozoide poco decondensado o no decondensado puede presentar señales, para minimizar los errores de visualización conviene efectuar el análisis en los que se han decondensado y que presentan bordes definidos, descartando los muy pequeños o los sobredecondensados ya que podrían confundirse con células somáticas. Teniendo en cuenta estas consideraciones, hemos estudiado a varios

pacientes y cuando uno fija los criterios, los resultados son bastante concordantes entre observadores. De hecho la mayoría de los laboratorios cuenta con protocolos en lo que se respeta esas consideraciones para poder uniformar los criterios de análisis.

Como mi tesina la he realizado en un Instituto especializado en reproducción, el interés fue estudiar a los espermatozoides de varones infértiles con o sin espermogramas anormales por FISH triple y doble color, con sondas de los cromosomas 13, 18, 21 X e Y para aquellos varones con cariotipo mitótico normal para estimar la producción de espermatozoides normales, y con sondas específicas en aquellos con anomalías cromosómicas mitóticas, con el propósito de determinar la segregación de los mismos y además evaluar el efecto sobre la separación de los cromosomas 13,18,21, X e Y.

Una vez estimada la producción de espermatozoides normales se calculó el riesgo reproductivo o mejor dicho la probabilidad de concepción normal. Esto último adquiere relevancia antes de acceder a los procedimientos de reproducción asistida para que puedan decidir sobre posibilidades concretas y en caso de tener riesgo aumentado poder optar por el diagnóstico genético preimplantatorio (DGP).

Respecto al paciente portador de una anomalía numérica XYY es bien establecido que la mayoría de los portadores del síndrome XYY son fértiles y no transmiten el cromosoma Y extra a su descendencia. Una minoría son infértiles y se ha inferido que el cromosoma Y extra durante la meiosis podría alterar a la misma produciendo una detención de la misma (azoospermia) o dar lugar a espermatozoides con disomía sexual XY, YY o sin cromosoma sexual; con riesgo por ende para descendencia afectada con síndrome de Klinefelter (47,XXY), a un varón 47,XYY ó una mujer con síndrome de Turner (45/X). Este riesgo potencial aún no se ha corroborado debido a que estos pacientes en época pre ICSI eran estériles. Si accedieran al ICSI habría que tenerlo en cuenta y de hecho nuestros resultados nos permite inferir que si bien en la mayoría se pierde el cromosoma Y extra hay un riesgo incrementado no solo para los cromosomas sexuales sino también para los autosómicos.

Estos resultados son concordantes con los previos comunicados, es decir la mayoría de los espermatozoides contienen un solo Y. En este caso, si bien no preocupaba tanto el riesgo de XYY para la descendencia, como el de los demás cromosomas, debido a que el paciente tenía una totalidad de espermatozoides móviles normales (TMN) muy bajo. El riesgo reproductivo estimado fue 42,77%. El paciente tenía como antecedente un ICSI previo con 4 embriones transferidos sin lograr el embarazo. A pesar del riesgo reproductivo optó por acceder nuevamente al ICSI. En este segundo intento solamente se lograron 2 embriones y tampoco embarazó. Los resultados de presente estudio fue motivo de presentación en las Jornadas de Obstetricia y Ginecología SOGIBA-2000 (Sartori & Coco, 2000).

En el paciente con translocación Robertsoniana (13;14), la proporción de espermatozoides con segregación equilibrada alterna fue 67%. No existe comunicado en la literatura análisis de los patrones de segregación en portadores de fusiones céntricas con FISH. En cambio existen seis estudios comunicados de los cuales 5 fueron realizados con la fertilización en ovocitos de hámster y 1 en ovocitos de ratón. La proporción de espermatozoides con segregación anómala varió de 8 a 50% de las metafases analizables (Martín RH. 1988). En el presente caso además se constató un fuerte efecto intercromosómico sobre el cromosoma 21. Teniendo en cuenta el porcentaje de segregación normal del trivalente y los porcentajes de aneuploidía para los cromosomas 18, 21, X e Y, se estimó la producción de espermatozoides normales en 42,9% y la chance de concepción normal con su esposa con cariotipo normal y 35 años de edad en 33,66%. La pareja accedió a un ICSI, debido que el marido tenía un TMN muy bajo y se efectuó el DGP en 5 embriones al tercer día de desarrollo con sondas para los cromosomas 13, 14 y 21. Dos de ellos resultaron normales y fueron transferidos. Por lo tanto el número de embriones con segregación equilibrada concordó con la evaluación pre-concepcional. Este caso fue aceptado para ser presentado en el Congreso de la Sociedad Argentina de Investigación clínica en Noviembre del año 2000 (Coco *et al.*, 2000).

En el portador de la translocación t(1;4), si bien la proporción de espermatozoides con segregación equilibrada fue 24%, se observó un fuerte efecto intercromosómico sobre los cromosomas 13, 18, 21, X e Y. La proporción de espermatozoides normales en el portador fue estimado en menos del 1%, por lo tanto la posibilidad de concepción normal fue bajísima. La pareja ya había experimentado 5 abortos espontáneos, dos de ellos cromosómicamente anormales, uno con una segregación desequilibrada y otro con 1 trisomía 18. La pareja, igualmente decide intentar suerte con el DGP. De la biopsia de 8 embriones al tercer día de edad el resultado del mismo fue: 3 embriones con segregación adyacente 1, 3 con segregación 3:1, 1 con segregación adyacente II y un embrión tetraploide. Este caso fue motivo de presentación en el Congreso de la Sociedad Argentina de Esterilidad y Fertilidad en Abril del 2000 (Coco *et al.*, 2000).

En el portador de la translocación (2;7), la proporción de espermatozoides con segregación equilibrada fue de 26% y no se observó efecto intercromosómico sobre los cromosomas estudiados. Por lo tanto la estimación de producción de espermatozoides normales fue 28%. Como la pareja tiene una hija normal y 7 abortos espontáneos están decidiendo entrar al programa de diagnóstico genético preimplantatorio.

El estudio de FISH es un excelente análisis para estimar el riesgo concreto en los portadores de anomalías. Como su utilización es reciente hay pocos estudios realizados documentados en la literatura. De 16 translocaciones recíprocas estudiadas con FISH, sólo en 10, de acuerdo con las sondas utilizadas, se estimaron los diferentes patrones de segregación como en el presente estudio.

Los patrones de segregación encontrados variaron desde 27,4 a 56,7% para la segregación alterna, de 15,9 a 42,5% para la segregación adyacente T, de 3,1 a 12,5% para la segregación adyacente II y 1,7 a 40,1% para la segregación 3:1. Mientras que en los seis restantes no lograron diferenciar entre alterna y adyacente I debido a las sondas utilizadas. Martín R. en una recopilación de 16 portadores de translocación recíproca estudiados con la técnica de fertilización de

ovocitos de hámster, documenta que la proporción de espermatozoides desequilibrados varió desde 8 a 77% (Martín, 1990).

En el presente estudio también se evaluó si el multivalente meiótico podía interferir sobre la separación de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y, y se documentó un fuerte efecto intercromosómico para todos ellos en la t(1;4), y en la t(13;14) para el cromosoma 21. De las 16 translocaciones recíprocas estudiadas con FISH comunicadas, en 10 se evaluó el efecto intercromosómico para diferentes cromosomas y solo en 4 se documentó efecto intercromosómico.

Autores	Translocación	Alternas	Adyacente I	Adyacente II	3:1	4:0	Efecto Intercromosómico
Stop, 98	t(2;18)	43,6	29,8	10,5	12,8	No est.	No est.
	t(8;9)	44,0	41,0	3,1	9,4	No est.	No est.
	t(11;22)	27,4	17,6	12,5	40,1	No est.	No est.
Cifuentes, 99	t(5;7)	49,7	32,4	16,2	1,7	No est.	Sin
Van Hummelen, 97	t(1;10)	48,0	42,5	4,9	3,9	No est.	No est.
Blanco, 98	t(5;8)	45,1	38,3	6,97	6,56	No est.	Sin
Martini, 98	t(3;11)	44,3	15,9	6,5	28,9	0,8	Sin
Mercier, 98	t(7;8)	56,74	25,10	11,10	7,06	No est.	Con
Presente estudio	t(1;4)	21,5	23,6	10,2	34,5	10,2	Con
	t(2;7)	26,3	26,1	13,2	33,2	1,2	Sin
Giltay, 99	t(Y;16)		51,0	87,0	12,0	No est.	No est.
Honda, 99	t(3;9)		88,4	5,4	5,9	No est.	Sin
	t(3;9)		89,2	6,0	4,5	No est.	Sin
Rousseaux, 95	t(6;11)		88,0	9,0	3,0	< 1	con
	t(2;14)		89,0	5,2	5,8	No est.	con
Stop, 99	t(10;12)		84,2	10,9	4,4	No est.	No est.

Recientemente Stop y colaboradores en Noviembre del 2000 (Stop *et al.*, 2000), comunican la evaluación del efecto intercromosómico en 9 portadores de translocación recíproca: t(10;12)(p26;p13), t(2;18)(p21;q11), t(3;19)(p25;q12), t(5;8)(q33;q13), t(11;22)(q23;q11), t(3;4)(p25;p16), t(8;9)(q24;q32),

t(10;18)(q24;p11) y t(4;10)(q33;p12). Los autores al comparar los porcentajes de aneuploidía de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y no encontraron diferencias significativas respecto de los controles normales. Sin embargo a pesar de no hallar diferencias significativas, a los autores les llamó la atención la mayor frecuencia de aneuploidía del par sexual y del 21 respecto de la de los cromosomas 13 y 18.

Si bien el objetivo del ICSI es lograr descendencia genética en varones con mala calidad espermática lamentablemente no todos tienen esa chance. Para beneficiarse con el procedimiento o para que el procedimiento sea terapéutico debería asegurarse por los menos un embrión normal. La evaluación del riesgo reproductivo, o mejor dicho conocer antes de acceder al procedimiento cual es la chance de lograr embriones normales sería lo más conveniente antes que se decidieran por el mismo. La proporción de espermatozoides normales en los 10 pacientes estudiados que accedieron al ICSI varió desde 17% a 86,6%. De los 10 pacientes 5 tenían una producción de espermatozoides anormales menos del 25% y de estos cinco, tres (60%) consiguieron el embarazo evolutivo, en cambio, los otros 5 con más de 25% de espermatozoides anormales, ninguno logró embarazo evolutivo. Este trabajo fue aceptado para ser presentado en SAIC en, Noviembre del 2000 (Coco *et al*, 2000). Los resultados hallados concuerdan con los previos comunicados por Pang y colaboradores en 1999 (Pang *et al*, 1999) quienes documentaron que ninguno de los 9 pacientes con oligoastenoteratozoospermia y estudiados con FISH en semen, los cuales accedieron varias veces al procedimiento ICSI, lograron el embarazo por tener frecuencias de aneuploidias muy incrementadas en los espermatozoides.

Por lo tanto en el factor masculino severo antes de acceder al procedimiento sería conveniente realizar este tipo de estudios para saber si el ICSI es el mejor camino para lograr el nacimiento del hijo normal. Si bien la gran limitación es no permitir el análisis de todos los cromosomas en un espermatozoide indudablemente es el mejor método para evaluar riesgo reproductivo.

CONCLUSIONES

Los resultados del estudio de semen con FISH nos permitió concluir que:

- Es una metodología que permite conocer el porcentaje de aneuploidía de determinados cromosomas.
- Es ideal para evaluar los patrones de segregación en portadores de anomalías cromosómicas.
- Tiene ventajas respecto de la técnica de fertilización de ovocitos de hámster con espermatozoides humanos, por ser más económica y permitir analizar en núcleos no metafásicos mayor cantidad de espermatozoides.
- Es la mejor técnica que se tiene en la actualidad para evaluar el riesgo reproductivo en el varón.

ILUSTRACIONES

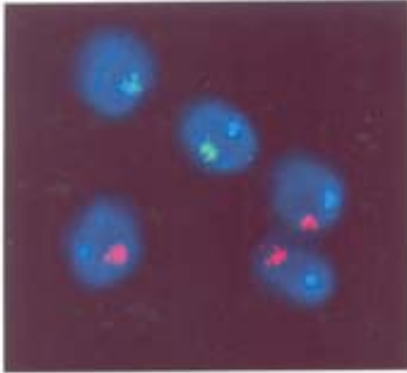


Fig. 1A: Espermatozoides bien decondensados (Método B)

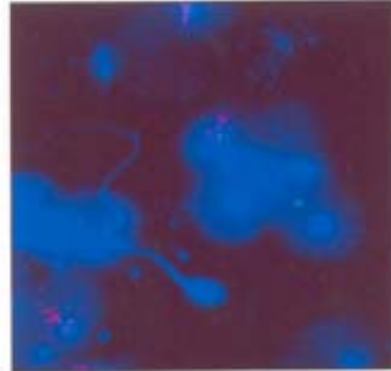


Fig. 1B: Espermatozoides no decondensados (Método C)

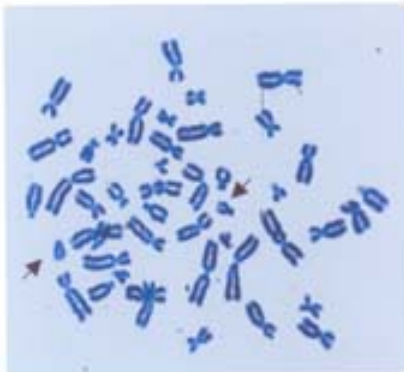


Fig. 2A: Metafase paciente XYY.
(Flecha cromosoma Y)

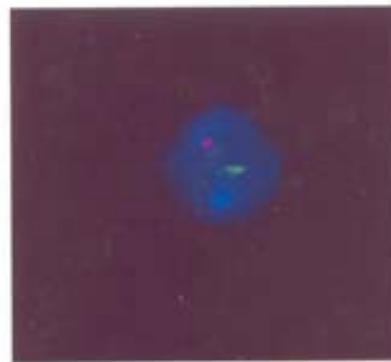


Fig. 2B: Espermatozoide 18XY
(18 señal azul, Y señal roja
X señal verde)

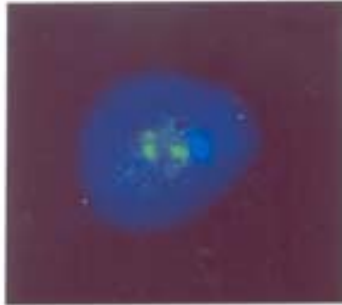


Fig.2C: espermatozoide 18XX.
(18 señal azul, X señal verde)

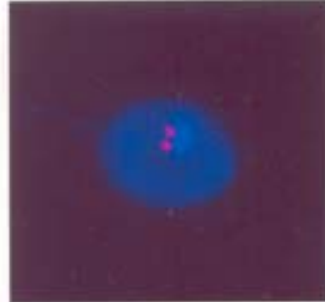


Fig. 2D: espermatozoide 18YY.
(18 señal azul, Y señal roja)

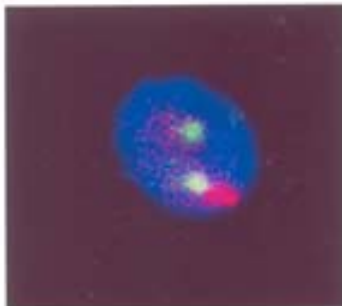


Fig.2 E: espermatozoide 2(21)13.
(21 señal verde, 13 señal roja)

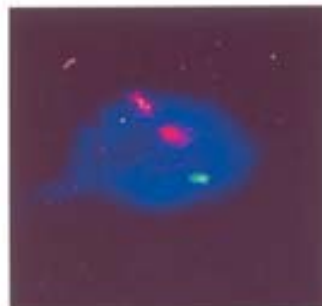


Fig.2 F: espermatozoide 2(13)21.
(21 señal verde, 13 señal roja)



Fig. 3A. Metafase paciente
t(13;14).(Flecha cromosoma
(13,14).

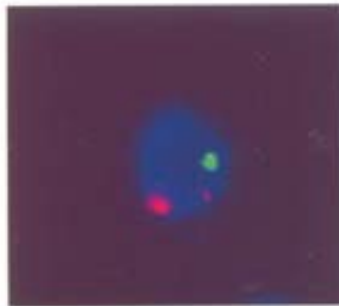


Fig.3B: Espermatozoide con
Segregación Alterna (13 señal
verde, 14 señal roja)

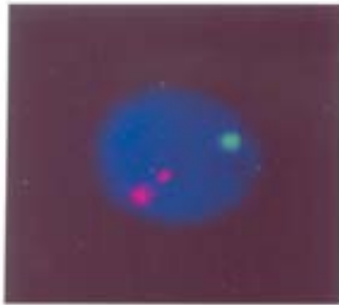


Fig. 3C: Espermatozoide con Adyacente I. (13 señal verde, 14 señal roja).

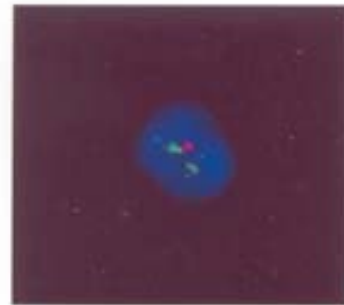


Fig. 3D: Espermatozoide con Segregación Adyacente II. (13 señal verde, 14 señal roja)

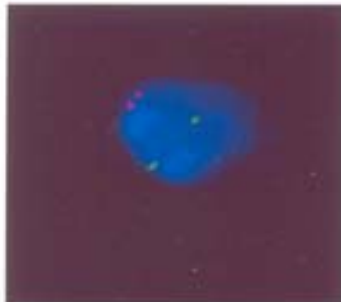


Fig. 3E: Espermatozoide con Segregación 3:0. (13 señal verde, 14 señal roja).



Fig. 4: Metafase paciente t(2;7)

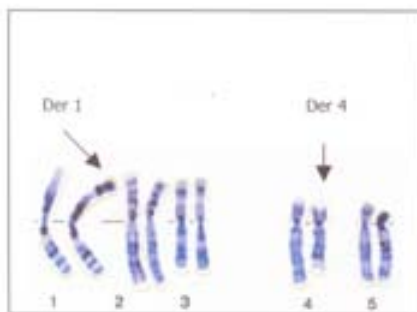


Fig. 5: Cariotipo parcial paciente t(1;4).

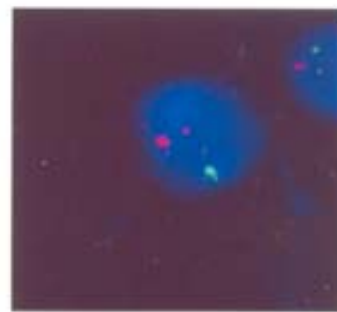


Fig. 6A: Espermatozoide con Segregación Alterna.

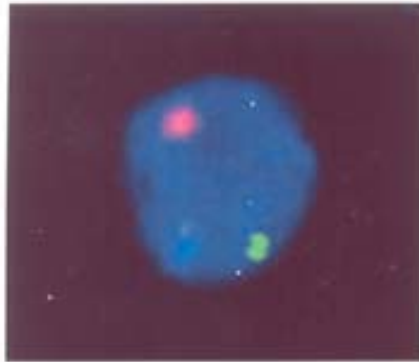


Fig. 6B: Espermatozoide con Segregación Adyacente I.

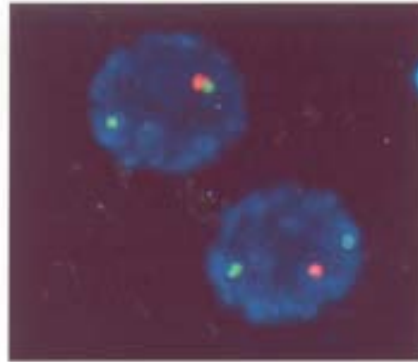


Fig. 6C: Espermatozoide con Segregación Adyacente II.

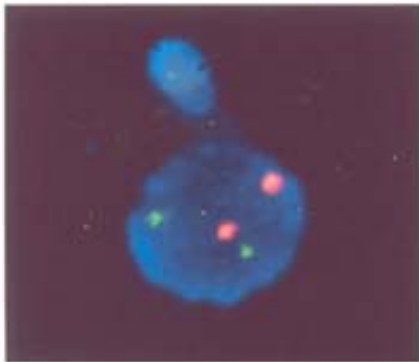


Fig. 6D: Espermatozoide con Segregación 3:1

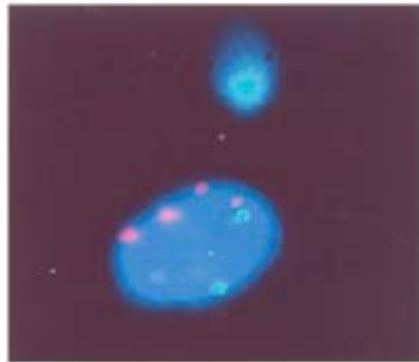


Fig. 6E: Espermatozoide con Segregación 4:0

BIBUOGRAFIA

Blanco J, Egozcue J, Clusellas N, Vidal F (1998): FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and interchromosomal effects in carriers of structural rearrangements: result in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenet Cell Genet*, **83**(3-4):275-280.

Boue A, Boue J. and Gropp A. (1985) Cytogenetics of pregnancy wastage. *Adv. Hum. Genet.*, **14**, 1-57.

Boue J, Boue A. and Lazar P. (1975) Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology*, **12**, 11-26.

Cifuentes P, Navarro J, Blanco J, Vidal F, Miguez L, Egozcue J, Benet J(1999): Cytogenetic: analysis of sperm chromosomes and sperm nuclei in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) t_y *in situ* hybridisation. *Eur J Hum Genet.*, **7**(2):231-238.

Coco R, Gallo A, Muhlmann M, Provenzano S. (2000) Estudio preconcepcional en un heterocigota de translocación t(1;4) (p32;q25). análisis de segregación y aneuploidia por fish doble y triple color. *Reproducción año XV* 3:145-156.

Coco R, Sartori C, Coco F, Gallo A, Neuspiller N. (2000) Estimación del riesgo reproductivo en varones con semen anormal usando FISH para las aneuploidías más frecuentes. Abstract del XLV Congreso de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica.

Coco R, Sartori C, Coco F. (2000) Análisis de segregación y aneuploidías por FISH en espermatozoides de un portador de translocación Robertsoniana t(13;14). Abstract del XLV Congreso de la Sociedad Argentina de Investigación clínica.

Coco R. (1997). Fertilidade e infertilidade Humana. Editado por Badalotti M, Telöken C, Petracco A. Editora Medica y Científica Limitada. Pg: 669-693.

Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF. *et al.* (1982) Early embryonic mortality in women. *Fertil. Steril.*, **38**, 447-453.

Estop AM, Cieply K M, Munne S, Feingold E. (1999): Multicolor fluorescence *in situ* hybridization analysis of the spermatozoa of a mate heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Hum Genet.*, **104**(5):412-417.

Estop A M, Cieply K M, Wakim A, Feingokl E. (1998); Meiotic products of two reciprocal translocations studied by multicolor fluorescent *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet.*, **83** (3-4); 193-198.

Estop A M, Van Kirk V, Cieply K,(1995): Segregation analysis of four translocation, t(2;18), t(3;15), t(5;7), and t(10;12) by sperm chromosome studies and a review of the literature. *Cytogenet Cell Genet.*, **70**(1-2):80-87.

Evsikov S. and Verlinsky Y. (1998) Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Hum. Reprod.*, **13**,3151-3155.

Giltay JC, Kastrop PM, Tiemessen CH, van Inzeo WG, Scheres JM, Pearson PL(1999): Sperm analysis in a subfertile male with a Y;16 translocation, using four-color FISH. *Cytogenet Cell Genet.*, **84** (1-2)67-72.

Hassold T, Chen N, Funkhouser J. *et al.* (1980) A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann. Hum. Genet.*,**44**, 151-176.

Hertig AT, (1967): In Comparative Aspects of Reproductive failure. Springer-Verlag. New York. Ed. Bermischke K.

Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Honda N, Hara T, Ohama K(1999): Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers, t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triplecolor fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Genet*, **105**(5):428-436.

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

Lerldoo H, (1977) In Human fertility: Basic Components University of Chicago Press. Chicago. Martin R, (1991) Preimplantation Genetics. Edited por; Yury Verlinsky. Editorial Plenum Press. New York. Pg: 91.

Martín RH. and Rademaker A. (1995) Reliability of aneuploidy estimates in human sperm: results using two different scoring criteria. *Nat. Reprod. Devel.* **42**, 89-93.

Martini E, von Bergh AR, Coonen E, de Die-Smulders CE, Hopman A H, Ramaekers FC, Geraedts J P(1998): Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3;11Xq27.3;q24.3) by triple FISH. *Hum Genet*, **102**(2):157-165.

Mercier S, Morel F, Feilman F, Roux C, Bresson JL (1998): Molecular analysis of the chromosomal equipment in spermatozoa of a 46, XY, t(7;8)(q11.21;cen) carrier by using fluorescence *in situ* hybridization. *Hum. Genet*, **102** (4): 446-451.

Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, Keams WG (1999): Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* **14** (15):1266-1273.

Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Devillard F, Lespinasse J, Sele B (1995): Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocation: analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, **71**(3):240-246.

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

Sartori C. & Coco R. (2000) Análisis cromosómico en espermatozoides de una varón Infértil 46,XY/47,XYY por FISH. Jornadas de Obstetricia y Ginecología. Sociedad de Obstetricia y Ginecología de Buenos Aires.

Schulman JD. *et al.* (1996) Genetic aspects of in vitro fertilization. *Ann. NY Acad. Sci.*, **442**, 466.

Sharma V, Riddle A, Ford N. *et al.* (1986) Pregnancy failure in *in vitro* fertilization. *Lancet*, **i**, 1391.

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

Wells D. and Delhanty JDA., (2000) Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol. Hum. Reprod.*, **6**,1055-1062.

AGRADECIMIENTOS

A mi Director, el Dr. Roberto Coco por haberme dado la posibilidad de trabajar con él, por el tiempo dedicado a mi formación, por todo lo que me ha enseñado y sobretodo por su calidez.

A la Dra. Alicia Gallo, por su compañía, su preocupación, por la fuerza y el apoyo constante, por hacerme sentir menos sola, por su dulzura y calidez, por aceptar ocupar ese lugar y por todo lo que me ha enseñado.

A mis compañeros de laboratorio: por su compañerismo y apoyo; a Yudith ... "por la mano" y especialmente a Verónica por toda su ayuda. A Irma Coco y Fabián Coco por compartir su lugar de trabajo y su buena onda. Especialmente a Martín por su amistad.

A mis amigas: Alejandra, Karina, Valeria y Violeta; por escucharme, por sus consejos, su compañía, apoyo y tanta buena onda, por demostrarme tanto cariño y sobretodo por hacer que cada día sea muy especial por las cosas que compartimos día a día. Gracias.

A Sara, por compartir lo cotidiano y por su compañía.

A Mariano por haber estado siempre.

A Andrea, Patricia y Graciela; por las largas horas de estudio compartidas y la amistad.

A Silvia y Conrado por estar siempre a mi lado, por acompañarme en las buenas y en las malas, por ser verdaderos amigos, por confiar en mí y sobretodo por traer al mundo a mis dos grandes amoresEmillano y Erich.

...a ARIES.

... a mis hermanas, por todo su amor y apoyo.

...especialmente a a mis padres por haberme dado la posibilidad de estudiar, por confiar en mí, por su apoyo incondicional, su amor y por toda la felicidad.