

RIESGO GENÉTICO REPRODUCTIVO EN PORTADORES DE
REARREGLOS CROMOSÓMICOS

R.Coco, F. Coco Ludueña, M. Urquiza, J. Mincman, A. Gallo, F.
Gismondi y N. Neuspiller

Lab. Citogenética, Genética Molecular, Embriología, Dpto Ecografía
y Medicina Reproductiva

Fecunditas Instituto de Medicina Reproductiva afiliado a la Fac. de
Medicina de la Universidad de Buenos Aires

www.Fecunditas.com

RESUMEN

OBJETIVOS:

- a) Analizar los patrones de segregación y aneuploidías en espermatozoides de portadores de Translocaciones Recíprocas, Robertsonianas e Inversiones.
- b) Comparar las aneuploidías de los cromosomas no involucrados en el rearrreglo con el estudio de 10 controles con cariotipo y semen normales.
- c) Estimar la tasa de aneuploidía de todo el complemento gamético.
- d) Evaluar el riesgo genético reproductivo RGR en la pareja
- e) Predecir los resultados del procedimiento FIV/ICSI/PGD.

PACIENTES Y MÉTODOS:

Se estudiaron a ocho portadores de translocaciones recíprocas, tres translocaciones Robertsonianas, una inversión pericéntrica del 4 y tres inversiones del bloque heterocromático del 9.

Se estudiaron las segregaciones meióticas de los cromosomas involucrados en el rearrreglo y además los cromosomas responsables de las aneuploidías más frecuentes en espermatozoides eyaculados por FISH.

Para el estudio de los patrones de segregación del rearrreglo se usó una mezcla de sondas enumeradoras y teloméricas de los cromosomas involucrados en el rearrreglo. Para el análisis de las aneuploidías de los portadores y controles se usaron dos mezclas de sondas: las enumeradoras del 18, X e Y y las loci específicas del 13 y 21.

De acuerdo con los rearrreglos se aplicaron diferentes fórmulas matemáticas y se calcularon las tasas de aneuploidías espermáticas y los respectivos riesgos reproductivos de las parejas.

RESULTADOS:

Los porcentajes de segregaciones anormales variaron con el tipo de rearrreglo. El valor promedio en las translocaciones recíprocas fue 67,1% (r 47,9%-90%). Para las translocaciones Robertsonianas 35,9% (r 32,3%-40%). En la inversión pericéntrica del cromosoma 4 fue 14% y para los portadores de 9ph resultó 1,8% (r 0,7%-2,9%). La tasa promedio de espermatozoides euploides, considerando los posibles efectos intercromosómicos en los portadores de translocaciones recíprocas fue $24,3 \pm 15,5\%$, en las Robertsonianas $47,9 \pm 16\%$, en la inv(4) 80%, en las inv(9) $89 \pm 3,9\%$ y en los controles $89,9 \pm 3,8\%$. Teniendo en cuenta el RGR de la pareja el porcentaje de fecundación normal para los portadores de translocaciones recíprocas fue $18,6 \pm 11,7\%$, en las Robertsonianas $37,5 \pm 12,9\%$, en la inv(4) 60% y en las inv(9) $69,9 \pm 0,78\%$

CONCLUSIONES:

De los 15 portadores de rearrreglos, ocho accedieron al procedimiento ICSI/PGD. De los cuatro portadores de translocaciones recíprocas ninguno logró embarazo y dos de ellos no fueron transferidos con embriones. En cambio, los tres portadores de translocaciones Robertsonianas tuvieron 4 niños normales (uno tuvo mellizos). El portador de inv(9) fue transferido con tres embriones euploides y tuvo trillizos.

Concluimos que la evaluación previa del riesgo genético reproductivo es fundamental para que la pareja pueda decidir sobre el beneficio o no del procedimiento al cual pretende acceder.

Introducción

Está bien documentado la asociación entre anomalías cromosómicas constitucionales e infertilidad masculina. Numerosas fuentes de estudio citogenético en varones infértiles documentan que entre 10 y 15% tienen anomalías cromosómicas constitucionales.

Los rearrreglos cromosómicos estructurales balanceados representan aproximadamente el 20% de todas las anomalías cromosómicas. Las más frecuentes son las translocaciones Robertsonianas, translocaciones recíprocas e inversiones. Todas ellas se caracterizan por expresar en vida adulta esterilidad y/o infertilidad y de hecho, la frecuencia en población de infértiles está significativamente aumentada respecto de la población general de recién nacidos. Si bien aún no se conocen los motivos por los cuales causan infertilidad, se la relaciona con los disturbios de la sinapsis de los cromosomas homólogos que ocasionarían diferentes grados de detención en el proceso meiótico, que conducirían a azoospermia u oligozoospermia y de acuerdo con las posibilidades de segregación anormal podrían originar gametos anormales responsables de abortos o nacidos malformados.

Desde el advenimiento del análisis FISH en semen varios grupos están tratando de brindar un mejor asesoramiento en los portadores de rearrreglos cromosómicos balanceados, estudiando los patrones de segregación del multivalente meiótico y las aneuploidías de otros cromosomas no involucrados en el rearrreglo para verificar si el mismo puede interferir con la segregación de otros cromosomas, fenómeno conocido como efecto intercromosómico.

En el presente estudio, usando una combinación de sondas enumeradoras y teloméricas de los cromosomas involucrados en los

rearrreglos, estudiamos la segregación de 8 translocaciones recíprocas, 3 Robertsonianas, una inversión pericéntrica del 4 y 3 inversiones del bloque heterocromático del 9 (9ph). También se evaluó el probable efecto intercromosómico sobre los cromosomas 13, 18, 21, X e Y.

Pacientes y Métodos:

Quince varones no relacionados quienes consultaron por infertilidad de causa cromosómica (portadores de rearrreglos cromosómicos) fueron estudiados por FISH en semen con el propósito de estimar la producción de espermatozoides normales e inferir el riesgo genético reproductivo.

El semen de diez donantes voluntarios con espermograma normal fue utilizado como control para el análisis de las aneuploidías.

Procesamiento de la muestra de semen:

Las muestras fueron obtenidas por masturbación y los espermatozoides descondensados con DTT siguiendo el protocolo de Pang et al, 1999.

Los extendidos fueron envejecidos en horno de microondas durante 10 segundos o bien procesados a los 3 días de efectuado los extendidos de espermatozoides.

Los preparados fueron pretratados con 2XSSC con 1% de formol y deshidratados por pasajes en alcohol 70°, 85° y 100°.

Los preparados, previo al agregado de las mezclas de las sondas, fueron calentados 10 segundos en horno microondas. El volumen de sondas usados fue 10 ul por cada 18 mm² de superficie a hibridar. Los preparados fueron sellados con parafilm y colocados en el hibridador Hybrite de Vysis, siendo la temperatura de desnaturalización 69°C durante 8 minutos y la de hibridación 37°C durante 15 horas.

Los preparados fueron lavados tres veces a 42°C durante 10 minutos, primero en 50% de formamida en 2XSSC, luego en 2XSSC y luego en 2XSSC conteniendo

100 ul de Tween20. Posteriormente fueron sumergidos en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego enjuagados varias veces en agua deionizada. Una vez secados al aire fueron montados con DAPI II como contrateñido.

Las sondas usadas para evaluar segregación fueron:

Rearreglo	Mezcla de sondas
Cromosómico	
t(1;4)(p32;q25)	CEP 1+CEP 4 +tel 4q
t(1;19)(p11;p33)	CEP 1+tel 19p+tel19q
t(4;15)(q31;q26)	CEP 4+CEP 15+ tel 4q
t(2;7)(q21;q21)	CEP 2+CEP 7+ tel 7q
t(1;7)(p22;q35)	CEP 1+ CEP 7+ Tel 7q
t(12;16)(p12;q23)	CEP 12+CEP 16+ tel 12p
t(7;17)(p13;q12)	CEP 7+ CEP 17+ tel 17q
t(9;17)(q13;q12)	CEP 9+ CEP 17+ tel 9q
t(13;14)(q10;q10)	LSI 13+ tel 14q
Inv(4)(p14;q25)	CEP 4+tel 4p+tel 4q
9ph	CEP 9+tel 9p+tel 9q

Las sondas usadas para evaluar efecto intercromosómico fueron las mezclas CEP 18+CEP X+ CEP Y y LSI 13+LSI 21.

Análisis Microscópico:

Se usó un microscopio equipado con epifluorescencia con filtros simple banda para DAPI, FITC, Texas Red, Acqua y Yelow.

El análisis de las señales fluorescentes fue realizado con objetivo de inmersión 100X de fluorita bajo aceite libre de fluorescencia.

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

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

Criterios de Análisis:

Aneuploidías

Se registraron las señales de los espermatozoides recondensados. Se excluyeron aquellos poco o muy descondensados, como así también los superpuestos y con bordes indefinidos o irregulares.

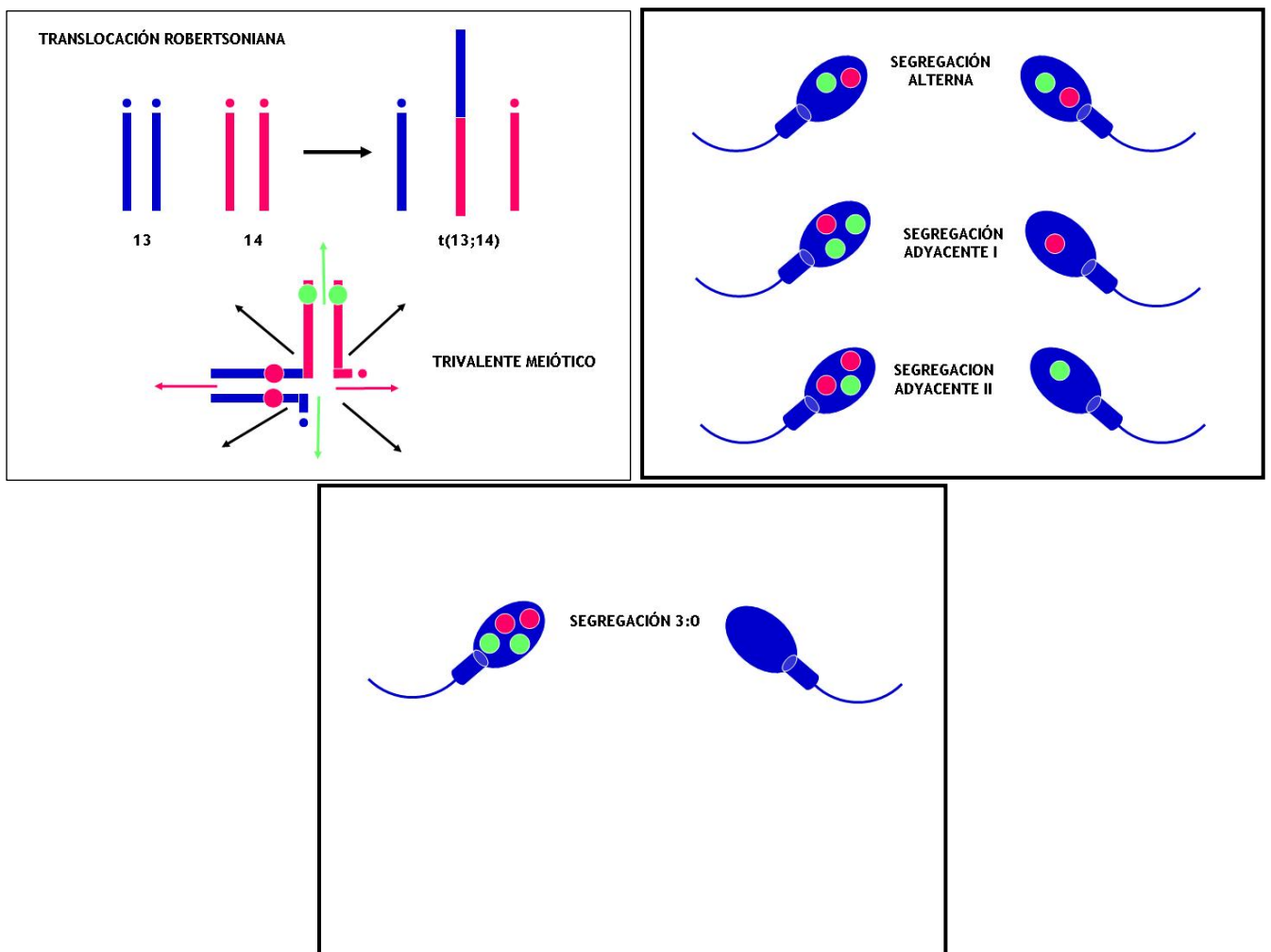
De acuerdo con los criterios de Martín & Rademarker, 1995 se consideraron como dos señales de un mismo cromosoma (disomía) aquellas separadas por una distancia mínima mayor al diámetro de una de las señales, mientras que dos señales separadas por una distancia menor o igual al diámetro de una de las señales como perteneciente a un único cromosoma. La ausencia de la señal de un cromosoma fue considerada una nulisomía para ese cromosoma. Los espermatozoides que no mostraban ninguna señal no se consideraron por no poder distinguirlos de la falla de hibridación por inadecuada decondensación o por no penetrar las sondas.

Un espermatozoide se consideró diploide cuando presentaba dos señales para cada uno de los cromosomas evaluados.

Patrones de Segregación de los Rearreglos Translocación Robertsoniana 13;14

Se usó la mezcla de dos sondas: una locus específica del 13 en color rojo y una telómerica 14qter en verde.

De acuerdo con las señales observadas se consideró como correspondiente a una de las posibles segregaciones del trivalente meiótico como se indica en el siguiente esquema.



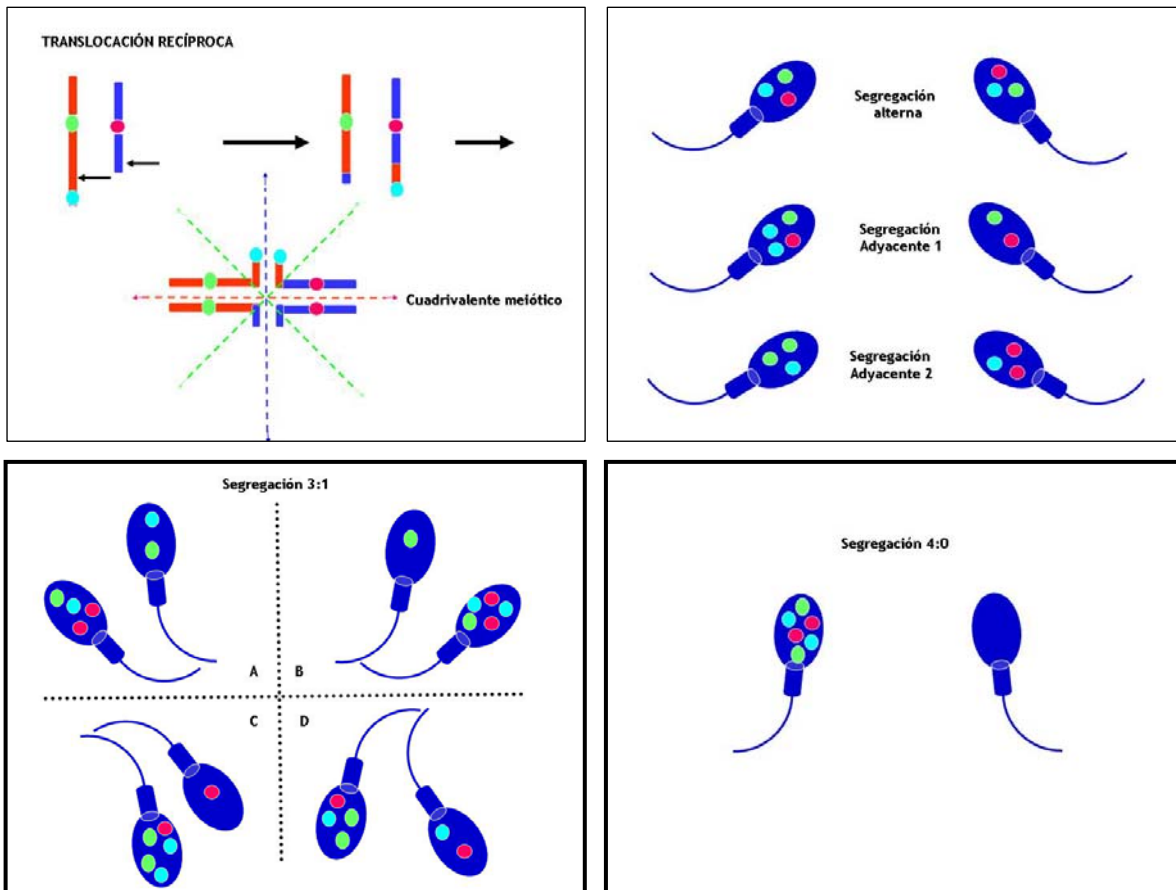
- a) alterna (una verde y otra roja) ,
- b) adyacente I (dos rojas y una verde o una sola señal verde),
- c) adyacente II (dos señales verdes y una roja o una sola señal roja) ,
- d) Segregación 3:0 no se tuvo en cuenta ya que el espermatozoide con dos verdes y dos rojas no se podría distinguir de un espermatozoide diploide y el que no tiene ninguna señal se podría confundir con un espermatozoide no hibridado.

La segregación alterna origina gametos cromosomicamente balanceados, en cambio las demás desbalanceados. Desde lo teórico un tercio de las segregaciones son normales.

Translocaciones Recíprocas:

Se usó la mezcla de tres sondas, dos enumeradoras y otra telomérica, de diferentes colores en lo posible.

De acuerdo con las señales observadas se consideró como correspondiente a uno de las cuatro posibles segregaciones del cuadrivalente meiótico como lo indica el siguiente esquema.



Se señala que la segregación 4:0 no se la consideró por no permitir la distinción entre una célula diploide y una no hibridada, respectivamente.

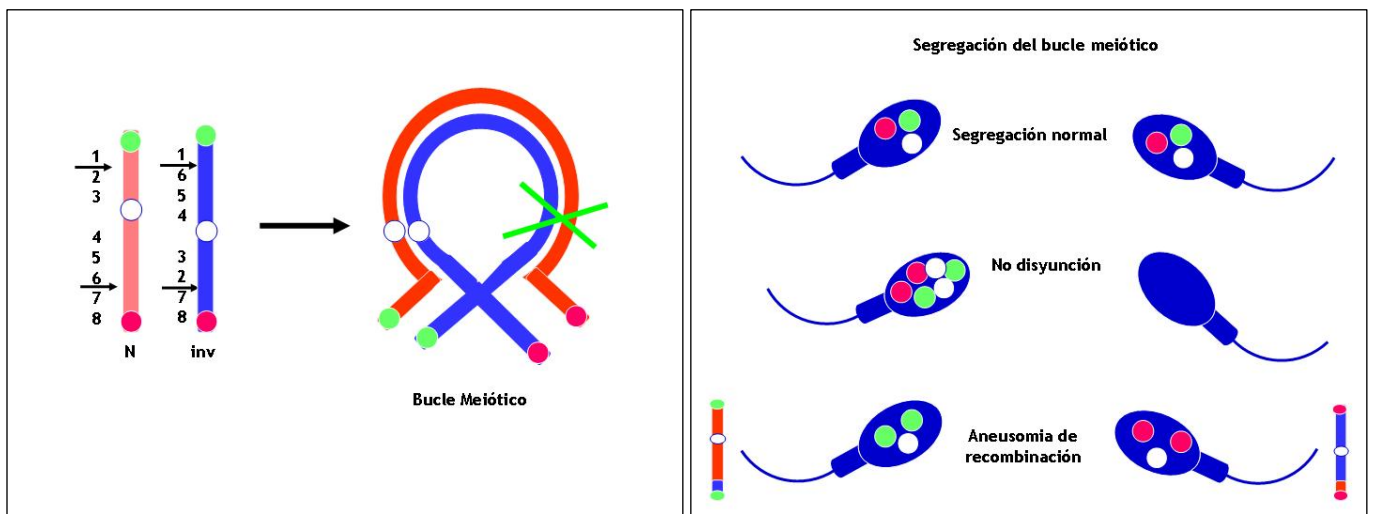
La segregación alterna origina espermatozoides balanceados, mientras que las demás todas anormales.

Desde lo teórico un 75% de las segregaciones son anormales.

Inversión Pericéntrica

Se usó la mezcla de tres sondas, centromérica y las teloméricas de ambos brazos, en lo posible de diferentes colores.

Como lo indica el siguiente esquema, de acuerdo con las señales observadas se consideró como correspondiente a segregación normal, no disyunción y aneusomía de recombinación. Se señala que para la no disyunción solo se consideró a los espermatozoides que presentaban las tres señales duplicadas y se la multiplicó por dos, ya que los que no presentaban señales fluorescentes podrían corresponder a espermatozoides no hibridados.



El riesgo de recombinación depende del cromosoma invertido y del tamaño del segmento invertido. Cuanto más grande más riesgo de recombinación.

Estimación de espermatozoides normales en los donantes con cariotipo normal

Se estimó el porcentaje de espermatozoides normales para todo el complemento asumiendo que los cromosomas autosómicos no estudiados se comportan similarmente a los estudiados. Para ello se aplicó la siguiente fórmula matemática:

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

En donde

P_n = porcentaje de espermatozoides con complemento normal

P_s = porcentaje de espermatozoides con cromosoma sexual normal.

P_e = media geométrica de los cromosomas estudiados, o sea $P_e = (P_{13}, P_{18}, P_{21})^{1/3}$.

Por lo tanto, $P_n = P_s \times [(P_{13} \times P_{18} \times P_{21})^{1/3}]^{22}$

Estimación de espermatozoides normales en los portadores de rearrreglos estructurales

a) Translocación Robertsoniana t(13;14)

$$P_n = P_s \times P_{sntR} \times [(P_{18} \times P_{21})^{1/2}]^{20}$$

En donde P_{sntR} es el porcentaje de segregación normal de los cromosomas 14 y 14, resto idem anterior.

En caso de constatarse efecto cromosómico para el cromosoma 21 o 18 se saca fuera del paréntesis y se elevaría el corchete a la 19.

b) Translocación Recíproca

$$P_n = P_s \times P_{sntr} \times [(P_{13} \times P_{18} \times P_{21})^{1/3}]^{20}$$

Donde P_{sntr} es el porcentaje de la segregación normal de los cromosomas involucrados en el translocación recíproca.

c) Inversión Pericéntrica

$$P_n = P_s \times P_{sninv} \times [(P_{13} \times P_{18} \times P_{21})^{1/3}]^{21}$$

En donde P_{sninv} es el porcentaje de segregación normal del cromosoma involucrado en la inversión.

Evaluación del riesgo genético reproductivo.

Se definió como riesgo genético reproductivo como la probabilidad de fecundación cromosómicamente anormal de la pareja.

El mismo se calculó teniendo en cuenta el porcentaje de espermatozoides anormales calculado a partir del resultado del FISH en semen y el porcentaje de ovocitos anormales de acuerdo con la edad de la mujer, estimándose 20% hasta los 30 años, 25% hasta los 35 años, 30% hasta los 40 años y 40% para las mayores de 40 años.

Para el cálculo del RGR se aplicó la siguiente fórmula:

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

Siendo

P_o = porcentaje de ovocitos anormales de acuerdo con la edad de la mujer.

P_e = porcentaje de espermatozoides anormales calculado por el análisis por FISH.

Resultados

En la tabla I figuran los resultados de los diferentes patrones de segregación de las translocaciones balanceadas.

Tabla I: Patrones de segregación de las translocaciones

rearrreglos	segregaciones			
	Alternativa	Adyac. 1	Adyac. 2	3:1
t(1;4)	19,9	23,7	8,9	47,5
t(1;19)	52,1	18,2	5,6	24,3
t(4;15)	42,5	33,7	6,9	16,9
t(2;7)	26,2	26,1	13,2	34,5
t(1;7)	39,0	10,9	14,1	36,0
t(12;16)	40,0	40,3	11,0	8,7
t(7;17)	32,2	33,0	5,6	29,2
t(9;17)	10,0	71,8	5,8	12,4
t(13;14)	64,5	15,4	20,1	
t(13;14)	67,7	17,1	15,2	
t(13;14)	60,0	18,5	21,5	

En el paciente con inversión pericéntrica del 4 se documentó aneusomía de recombinación en el 11,4% de los espermatozoides y aneuploidía del 4 (disomía x dos) en el 2,6% de los mismos.

En los pacientes con inversión pericéntrica del bloque heterocromático del 9 no se evidenció aneusomía de recombinación y en dos de ellos se encontró aumentada la tasa de aneuploidía del 9.

En la tabla II están resumidos los principales resultados del análisis de la segregación meiótica de los diferentes rearrreglos, el posible efecto intercromosómico de los mencionados rearrreglos sobre los cromosomas 13, 18, 21, X e Y y la estimación de la producción de espermatozoides normales .

Tabla II: Estimación de espermatozoides euploides en portadores de rearrreglos

Rearreglo Cromosómico	Segregación Anormal (%)	Posible Efecto Intercromosómico				Espermios Normales (%)
		13	18	21	XY	
t(1;4)	80,2	21,2	15,2	31,0	28,2	0,1
t(1;19)	48,1	0,5	0,8	0,7	0,2	45,3
t(4;15)	57,8	1,4	0,4	0,8	2,6	34,5
t(2;7)	73,8	1,0	0,4	0,8	0,7	22,4
t(1;7)	61,0	3,6	2,6	2,1	6,0	15,9
t(12;16)	60,0	0,6	1,3	0,4	0,8	36,6
t(7;17)	67,9	0,2	0	0	0,6	31,9
t(9,17)	90,0	0,1	0	0,1	0,3	8,0
t(13;14)	32,3	18,2	1,0	2,7	3,5	47,0
t(13;14)	35,7	8,8	0	0	0,7	64,4
t(13;14)	40,0	14,2	0,2	5,2	6,0	32,4
Inv(4)	14,0	1,0	0	0	0,6	80,0
9ph	0,7	0,4	0	0,4	0,2	93,7
9ph	2,9	1,0	0,1	0,2	0,6	88,0
9ph	1,8	1,4	0,2	0,2	0,2	86,3

En la misma puede apreciarse que la segregación anormal en los portadores de translocaciones recíprocas varió entre 48 y 90%, mientras que en las translocaciones Robertsonianas fue mucho menor, entre 32 y 40%. En la inversión pericéntrica del 4 fue de 14% y en las inversiones pericéntricas del bloque heterocromático del 9, en uno de los portadores la segregación del par 9 se comportó similarmente a la segregación de los autosomas en los varones normales, mientras que en los otros dos la tasa de aneuploidía fue mayor. En ninguno de los tres portadores 9ph se evidenció

aneusomía de recombinación, a diferencia de la inversión pericéntrica 4 en la que un 11,4% de los espermatozoides era recombinado para el 4 (deficiencia-duplicación parcial del cromosoma 4).

Con respecto al análisis de las aneuploidías de los otros cromosomas no involucrados en los rearrreglos, la translocación t(1;4) evidenció una alta tasa de aneuploidías para los tres autosomas y el par sexual. La translocación t(4;15) evidenció un moderado aumento para el 13 y el par sexual, mientras que la translocación t(1;7) evidenció un aumento para todos ellos. En cambio las translocaciones t(1;19), t(2;7), t(12;16), t(7;17) y t(9;17) evidenciaron tasas de aneuploidías similares a los de los varones controles. Dos de las tres translocaciones Robertsonianas t(13;14) evidenciaron un aumento en la tasa de aneuploidía del 21 y el par sexual.

Las tasas de aneuploidías, tanto de la inversión pericéntrica del 4 como las de las inversiones del 9 (9ph) fueron similares a los de los varones normales.

En la tabla III están calculados los riesgos reproductivos de los portadores de rearrreglos estructurales.

Tabla III: Posibilidad de Fecundación Normal de acuerdo al Riesgo genético Reproductivo.

Rearreglo	Edad pareja	% Aneup. Port.	% F.N.
t(1;4)	30	0,1	0,08
t(1;19)	32	45,3	33,9
t(4;15)	32	34,5	25,9
t(2;7)	34	22,4	16,8
t(1;7)	27	15,9	12,7
t(12;16)	33	36,6	27,4
t(7;17)	34	31,9	25,9
t(9,17)	34	8,0	6,0
t(13;14)	32	47,5	35,2
t(13;14)	30	64,4	51,5
t(13;14)	28	32,4	25,9
Inv(4)	33	80,0	60,0
9ph	32	93,7	70,3
9ph	29	88,0	70,4
9ph	25	86,3	69,0

En la tabla IV figuran las tasas de aneuploidías en los 10 donantes con cariotipo y semen normales las cuales fueron consideradas como controles normales.

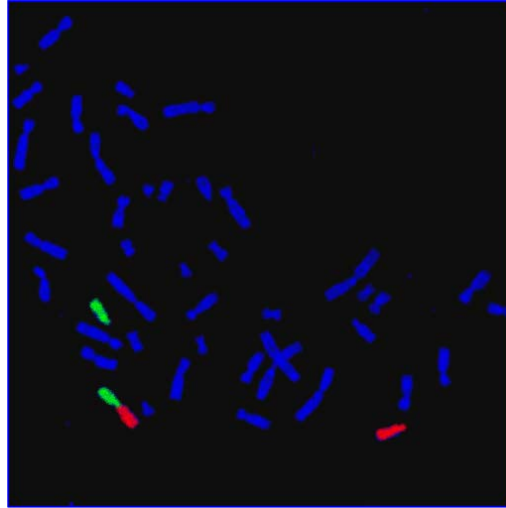
Tabla IV: Estimación de espermatozoides Aneuploides en controles

VARONES	% ANEUPLOIDÍAS				% ESPER. ANORM.
	13	18	21	XY	
A	0,6	0,1	0	0,4	5,4
B	0,1	0,1	0,3	0,5	4,2
C	0,2	0,3	0,3	0,2	5,9
D	0,9	0,2	0,2	0,9	9,9
E	0,5	0,4	1,0	0,7	13,7
F	0,9	0,4	0,8	0,6	14,3
G	0,8	0,3	0,2	0,9	9,1
H	0,5	0,3	1,0	0,8	12,4
I	0,5	0,3	1,0	0,9	13,2
J	0,8	0,2	0,7	1,2	12,8
Media	0,6±0,3	0,3±0,1	0,6±0,4	0,7±0,3	10,1±3,8

En la misma se puede ver que la tasa de aneuploidía para el cromosoma 13 varió entre 0,1 y 0,9, siendo el valor promedio $0,6 \pm 0,3$. Para el cromosoma 18 varió entre 0,1 y 0,4 siendo el promedio $0,3 \pm 0,1$. Para el cromosoma 21 varió entre 0 y 1,0 siendo el promedio $0,6 \pm 0,4$. Para el par sexual fue entre 0,2 y 1,2 y el promedio $0,7 \pm 0,3$. La estimación de aneuploidía para todo el complemento resultó ser $10,1 \pm 3,8$, asumiendo que los 19 cromosomas no estudiados se comportaron similarmente a los estudiados

CAPTURA DE LAS IMÁGENES:

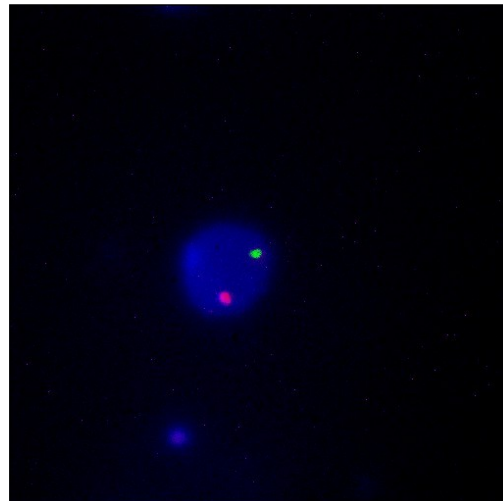
Metafase con translocación 13;14



Cromosomas 13 y 14 separados y el 13;14 fusionado

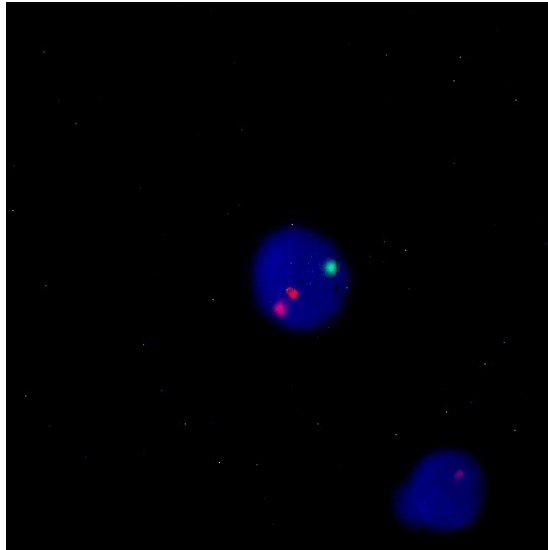
Para el estudio de la segregación del trivalente se usó la mezcla de sondas LSI 13 (verde) + Tel 14q (rojo).

Espermatozoide con segregación normal



Dos señales fluorescentes, una del #13 y otra del #14
(balanceado)

Espermatozoide con segregación adyacente 1



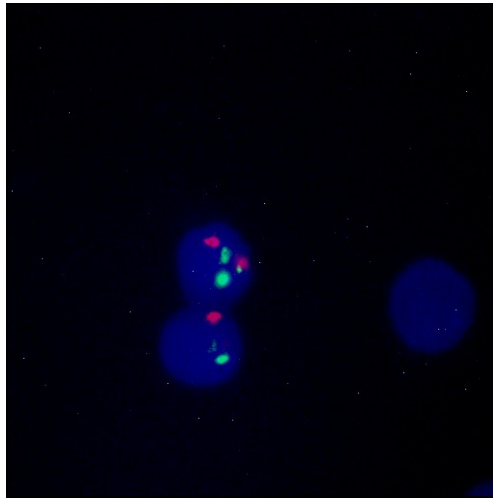
Tres señales fluorescentes, dos del #14 y una del #13 (disomía 14)

Espermatozoide con segregación adyacente 2



Tres señales fluorescentes, dos del # 13 y otra del #14(disomía 13)

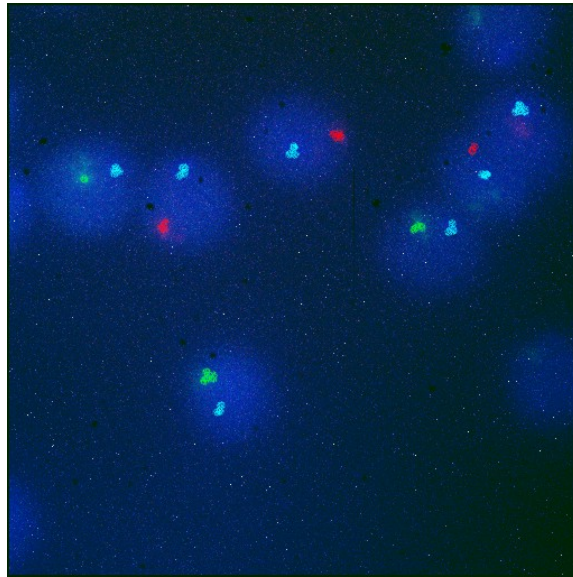
Segregación 3:0



Tres espermatozoides, uno con 4 señales (3:0), otro con 2 señales (alterna) y uno sin señales (probable 3:0 o no hibridado). Los dos clases de espermatozoides resultantes de segregación 3:0 (cuatro señales y ninguna) no se contabilizaron por no poder discernir entre un espermatozoide diploide y una célula somática y falla en la hibridación.

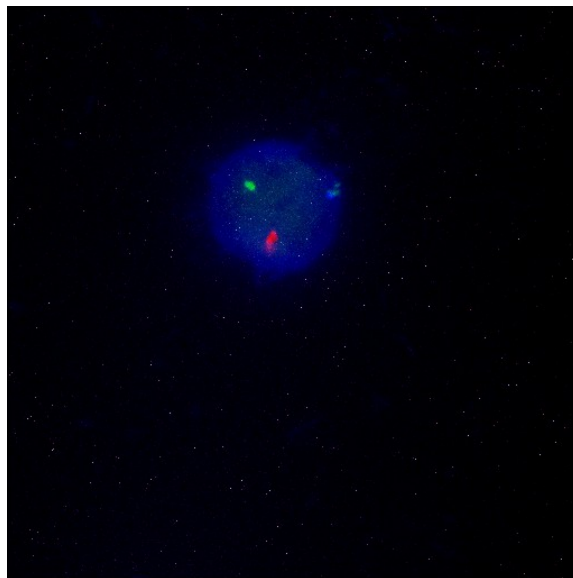
Para el análisis de aneuploidías se usaron dos mezclas de sondas, las enumeradoras del 18 (acqua)+X(verde)+Y(rojo) y las loci específicas del 13(verde) y 21(rojo).

Mezcla 18+X+Y



Los espermatozoides normales tienen dos señales, una del #18 y otra del #X ó del #Y.

No disyunción del par sexual



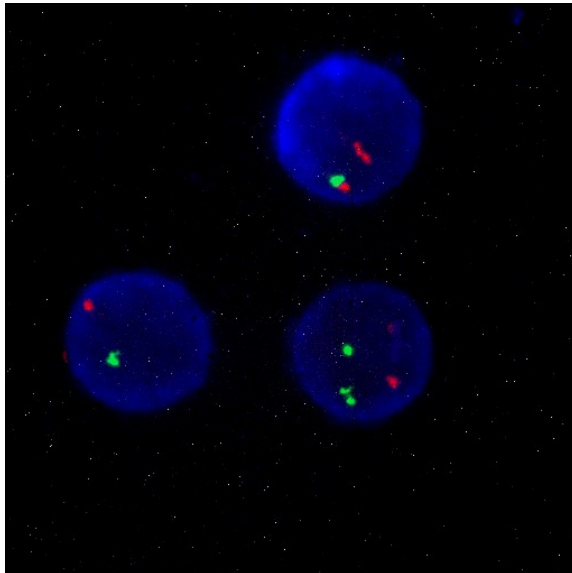
Tres señales, #18(acqua), # X(verde) e #Y (rojo)

Espermatozoide diploide



Cuatro señales, dos #18(acqua), un #X(verde) y un #Y(rojo)

Mezcla 13+21



Tres espermatozoides, uno con 2 señales rojas y una verde (disomía 21), otro don dos señales verdes y una roja (disomía 13) y el otro con una señal roja y otra verde (normal).

Discusión

Previo al advenimiento del FISH, la constitución cromosómica de los espermatozoides humanos se evidenciaba con la técnica del test de hamster, inseminando a los ovocitos desnudos del hamster con los espermatozoides humanos y sacrificando a los mismos para estudio cromosómico una vez verificada la fecundación (Rudak et al, 1978). La técnica fue de suma utilidad para conocer la tasa de aneuploidías en varones normales, infértiles, portadores de anomalías y en individuos expuestos a radiaciones y químicos. En la actualidad casi se la ha dejado 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 que si bien el ICSI podría ser una solución se debería contar con un piezoeléctrico para lograr fecundación.

La hibridación in situ fluorescente (FISH) si bien en nuestro medio aún 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 el número de determinados cromosomas, por lo menos laboriosa, más rápida y más fácil. La mayor desventaja es la limitación en el número de cromosomas que permite evaluar por espermatozoides, que de acuerdo a las mezclas de sondas y filtros disponibles varía entre dos y cinco. Obviamente que se podría analizar todo el complemento pero en espermatozoides diferentes tal como lo hicieron Rives et al, 1999 cuando documentaron uniformidad en las disomías de todos los cromosomas en espermatozoides de individuos con semen y cariotipo normal. Hallazgo ese que nos permitió estimar la aneuploidía de todo el complemento sin necesidad de estudiarlos a todos asumiendo que los no estudiados se comportan como los analizados. Durante la última década han aparecido numerosos trabajos de FISH en semen de varones fértiles e infértiles con OAT, pero comparativamente pocos de portadores de rearrreglos cromosómicos balanceados. De acuerdo con nuestro conocimiento hay 41 trabajos publicados en los que se pretendió conocer los patrones de segregación en espermatozoides de portadores de translocaciones recíprocas. Hay autores que solamente utilizaron sondas enumeradoras, por lo tanto no les fue posible diferenciar la segregación alterna de la adyacente 1, mientras que los que además usaron por lo menos una de las teloméricas de uno de

los segmentos involucrados en el rearrreglo lograron diferenciar la segregación alterna (normal) de las diferentes segregaciones anormales (adyacente 1, 2 y segregación 3:1).

En la tabla V figuran los diferentes modos de segregación meiótica de las translocaciones recíprocas comunicadas en la literatura.

Tabla V: Análisis de Segregación en portadores de Translocaciones Recíprocas.

Transloc.	Tipo de segregación			Segreg 3:1	Refer.
	Alterna	Adyac 1	Adyac 2		
t(1;11)	82,4		8,3	9,2	1
t(6;11)	73		9	3	2
t(6;11)	78		8	2,8	3
t(2;14)	80		5,2	5,8	4
t(1;8)	84,9		7,1	7,1	5
t(10;12)	84,2		11	4,4	6
t(1;10)	90,5		4,9	3,9	7
t(7;9)	86		10,4	3,0	8
t(7;18)	77,2		15,9	6,6	9
t(3;9)	88,3		5,4	5,9	10
t(3;9)	89,2		6	4,5	11
t(14;20)	51	19	21	4	12
t(1;y)	36	64			13
t(2;18)	43,6	29,8	10,5	12,8	14
t(8;9)	44,4	41	3,1	9,4	15
t(5;8)	45,1	38,3	7	6,6	16
t(7;8)	56,7	25,1	11,1	7,1	17
t(3;11)	44,3	15,8	6,6	28,9	18
t(11;22)	27,4	17,6	12,5	40,1	19
t(11;22)	29,2	21,2	15,1	34,6	20
t(y;16)	51	36		12	21
t(5;7)	49,7	32,4	16,2	1,7	22
t(4;8)	30,5	28,5	20,5	19,5	23
t(15;17)	51,2	35,3	8,8	2,8	24
t(15;17)	49,4	37,7	7,9	3	25
t(15;17)	48,1	40,3	8,5	2,4	26
t(15;17)	52,7	34,4	10,7	1,5	27
t(17;22)	19	12,9	5,8	46,8	28
t(1;13)	37	29	8,2	23,3	29

t(1;18)	29,2	9,2	16,6	43,2	30
t(1;6)	37,4	43,1	7,7	10,7	31
t(2;18)	31,1	28,8	16	24,2	32
t(3;4)	23,9	14,7	24,5	34,2	33
t(5;15)	45,9	44,1	0,7	8,3	34
t(6;9)	23,6	14,1	40,1	21,9	35
t(8;22)	23,8	15	19	41,7	36
t(11;22)	21,8	14,4	31,5	30,3	37
t(15;22)	18,6	15,9	16	43,3	38
t(2;6)	49,9	42,4	2,5	4,2	39
t(7;8)	62,8	17,6	12,8	6,5	40

1-Spriggs & Martin, 1994; 2-3-4 Rousseaux et al, 1995; 5-Prigent & Vigié, 1996 ; 6-Estop et al, 1997 ; 7-Van Hummelen et al, 1997 ; 8-9-Pellestor et al, 1997 ; 10-11-Honda et al, 1999 ; 12-13-Mennicke et al, 1997 ; 14-15-Estop et al, 1998 ; 16-Blanco et al, 1998 ; 17-Mercier et al, 1998 ; 18-Martini et al, 1998 ; 19-Estop et al, 1999 ; 20-Van Assche et al, 1999 ; 21-Giltay et al, 1999 ; Cifuentes et al, 1999 ; 23-Oliver-Bonet et al, 2001 ; 24-27-Cora et al, 2002 ; 28-Geneix et al, 2002 ; 29-38-Escudero et al, 2003; 39-Lim et al, 2003; 40-Morel et al, 2004

En la presente serie de 8 translocaciones recíprocas estudiadas por nosotros, se señala que ninguna de ellas fue previamente documentada por otros autores. Sin embargo el promedio de segregación alterna encontrada (segregación normal) de 32.7% no difiere del promedio de las 30 translocaciones recíprocas similares reportadas, la cual es 37,8%.

En la tabla VI figuran los resultados de los diferentes modos de segregación meiótica en portadores de translocaciones Robertsonianas evaluados por FISH en semen.

Tabal VI: Análisis de Segregación en portadores de fusiones céntricas.

Transloc.	Segregación		referencia
	Alternativa	adyacente	
t(14;21)	72,2	18	41
t(21;22)	60	36	42
t(14;21)	88,4	11,2	43
t(13;14)	73,6	23,3	44
t(13;14)	77,4	19,1	45
t(13;14)	81,3	18,1	46
t(13;14)	82,6	16,32	47
t(13,14)	88,9	10,8	48
t(13;14)	91	9	49
t(13;14)	80	10	50
t(13;14)	87,1	12,9	51
t(14,21)	91,3	8,7	52
t(14;21)	92,8	7,2	53
t(14;21)	93	7	54
t(13;14)	86,5	12,6	55
t(13;14)	87,5	12,2	56
t(13;14)	83	14,5	57
t(13;14)	84,5	14,2	58
t(13;14)	88,1	11,4	59
t(13;14)	88,2	11,1	60
t(13;14)	87,7	11,6	57

41-Rousseaux et al,1995; 42-Mennicke et al,1997; 43-Honda et al,2000; 44-45-Escudero et al,2000; 46-48-Morel et al,2001 ; 49-54-Frydman et al,2001 ; 55-60-Anton et al,2004

Con respecto a las translocaciones robertsonianas el promedio de segregación normal, si bien es mucho más alta que en las translocaciones recíprocas, en nuestra serie de tres es algo menor que el promedio de lo previamente comunicado por otros autores, la cual fue 64 y 84,8 %, respectivamente. Probablemente la disimilitud en los resultados se debe a las diferentes sondas utilizadas. Al respecto tenemos que señalar que el valor promedio hallado por nosotros concuerda más con lo previamente publicado por Escudero et al., y Alves et al. Además 7 de las 15 translocaciones Robertsonianas reportadas pertenecen a un mismo autor, quién precisamente tiene los resultados más altos de segregación normal.

Respecto de las inversiones pericéntricas analizadas, excluyendo las del bloque heterocromático del 9, de acuerdo con nuestra búsqueda bibliográfica hay un solo trabajo similar al nuestro, el de Jaarola et al quienes estudiando una inversión pericéntrica del 8 encuentran una tasa de cromosomas 8 recombinados del 13,1%. En el caso de la inversión del cromosoma 4 en nuestra serie, el porcentaje de cromosoma 4 recombinado fue bastante similar 11,4%, probablemente el tamaño del segmento invertido, a pesar de corresponder a otro cromosoma, sea la razón de tal similitud.

Igualmente de acuerdo con nuestra búsqueda bibliográfica encontramos un solo trabajo sobre inv(9)(p11;q13) o de 9ph como se denomina con la última nomenclatura cromosómica, el de Colls et al, 1997 quienes al igual que nosotros no documentan el riesgo de cromosomas 9 recombinados. Probablemente la ausencia de quiasmas en la región heterocromática sea la razón para la no existencia del fenómeno de aneusomía de recombinación. Tampoco nosotros encontramos efecto intercromosómico sobre otros cromosomas, pero a diferencia de ellos, en dos portadores 9ph se documentó más riesgo de disomía 9 y en uno de ellos un suave efecto sobre la disyunción del 13.

Otro propósito del presente trabajo fue estudiar el posible efecto intercromosómico o sea el efecto del reordenamiento en la disyunción de otros cromosomas. La comparación de nuestros hallazgos con los previos comunicados es complicado debido a que no todos los autores lo han evaluado, los cromosomas evaluados son diferentes y por sobre todo porque no está bien aclarado como fueron pesquisados los portadores y como era la calidad del semen. Este último dato es de suma importancia debido a que está bien documentado una mayor tasa de aneuploidía en la OAT. Por lo tanto, si los portadores tienen OAT severa uno no puede discernir si el aumento de las aneuploidías es por efecto intercromosómico o por la alteración del microambiente hormonal intratesticular. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, independiente de su origen, lo importante es saber si están también afectados los demás cromosomas que no intervienen en el rearrreglo. Ese dato obviamente adquiere mayor importancia en las translocaciones recíprocas, donde aumentaría aún más las posibilidades de aneuploidía. Por ello, a diferencia de los demás autores, nos parece más práctico estimar la aneuploidía de todo el complemento que solamente la aneuploidía de los estudiados. Cabe consignar que el portador t(1;4) en quién se

documentó un fuerte efecto intercromosómico había consultado por aborto a repetición y su calidad espermática prácticamente era normal y de hecho los embarazos los habían logrado sin ayuda médica.

Como los portadores de rearrreglos estructurales son candidatos para el PGD y el resultado del mismo depende del número de embriones libre de afección, no solo hay que tener en cuenta la posibilidad de gametos anormales por parte del portador del rearrreglo, sino también los de su pareja. En la tabla III puede apreciarse como disminuye aún más las posibilidades de fecundación normal en las parejas de mayor edad. Por lo tanto, una pareja joven y fértil beneficiaría a un portador con riesgo genético propio alto, mientras que una pareja añosa y poco fértil disminuiría aún más sus posibilidades, y en esos casos lo más conveniente sería que no accedieran al PGD.

Si bien el FISH en semen tiene sus limitaciones, es una excelente herramienta para evaluar el riesgo genético reproductivo especialmente en los portadores de rearrreglos estructurales. De los 15 portadores de rearrreglos estructurales, 8 accedieron al PGD. De los ocho, cuatro obtuvieron su objetivo en el primer ciclo de PGD. Fueron las tres translocaciones Robertsonianas y uno de las tres inversiones del 9. Los otros cuatro casos fueron las translocaciones $t(1;4)$, $t(9;17)$, $t(1;19)$ y $t(1;7)$. De las cuatro translocaciones, tres no fueron transferidas con embriones, los portadores de $t(1;4)$ y $t(9;17)$ debido a que todos los embriones resultaron anormales como se preveía con la evaluación previa del riesgo, en cambio el portador de $t(1;19)$ produjo embriones euploides pero no fueron transferidos debido a que resultaron no evolutivos por (incompetencia citoplasmática de los ovocitos. En cambio, el portador de $t(1;7)$ fue transferido con un solo embrión pero no implantó.

Conclusiones:

El FISH en semen es útil en la evaluación del riesgo genético reproductivo que conllevan los portadores de rearrreglos cromosómicos estructurales y en la predicción de los resultados del procedimiento PGD.

Referencias:

- 1- Alves et al, 2002: Prenat Diagn 22(12): 1153-1162.
- 2- Antón et al, 2004: Human Reproduction 19(6): 1345-1351.
- 3- Blanco et al, 1998: Cytogenetics and Cell Genetics 83: 275-280.
- 4- Cifuentes et al, 1999: Eur J Hum Genet 7(2): 231-238.
- 5- Colls et al, 1997: Hum Genet 99(6): 761-765.
- 6- Cora et al, 2002: Journal of Andrology 23: 793-798.
- 7- Escudero et al, 2000: Prenatal Diagnosis 20: 599-602.
- 8- Escudero et al, 2003: Fertility and Sterility 79: 1528-1534.
- 9- Estop et al, 1992: Human Genetics 89: 425-429.
- 10- Estop et al, 1995: Cytogenetics and Cell Genetics 70: 80-87.
- 11- Estop et al, 1997: European Journal of Human Genetics 5: 78-82.
- 12- Estop et al, 1998: Cytogenetics and Cell Genetics 83: 193-198.
- 13- Estop et al, 1999: Human Genetics 104: 412-417.
- 14- Frydman et al, 1999: Cytogenetics and Cell Genetics 85: 50
- 15- Frydman et al, 2001: Human Reproduction 16: 2274-2277.
- 16- Geneix et al, 2002: Human Reproduction 17: 325-331.
- 17- Giltay et al, 1999: Cytogenetics and Cell Genetics 84: 67-72.
- 18- Honda et al, 1999: Human Genetics 105: 428-436.
- 19- Honda et al, 2000: Human Genetics 106: 188-193.
- 20- Lim et al, 2003: American journal of medical Genetics 117: 172-176.
- 21- Martin & Rademarker, 1995: Molecular Reproduction and Development 42: 89-93.
- 22- Martini et al, 1998: Human Genetics 102: 157-165.
- 23- Mennicke et al, 1997: International Journal of Andrology 20: 11-19.
- 24- Mercier et al, 1998: Human Genetics 102: 446-451.
- 25- Morel et al, 2001: Cytogenetics and Cell Genetics 92: 63-68.
- 26- Morel et al, 2001: Molecular Human Reproduction 7: 483-488.
- 27- Morel et al, 2004: International Journal of Andrology 27: 178-182.
- 28- Morel et al, 2004: Fertility and Sterility 81: 682-685.

- 29- Oliver-Bonet et al, 2001: European Journal of human Genetics 9 : 395-403.
- 30- Oliver-Bonet et al, 2002: Molecular Human Reproduction 8: 958-963.
- 31- Pang et al, 1999: Human Reproduction 14: 1266-1273.
- 32- Pellestor et al, 1997: Cytogenetics and Cell Genetics 78: 202-208.
- 33- Prigent & Viguié, 1996: IXeme Colloque de L'Association des Cytogeneticiens de Langue Francaise, Paris.
- 34- Rives et al, 1999 : Human Genetics 105 : 266-272.
- 35- Rousseaux et al, 1995 : Human Genetics 96 : 655-660.
- 36- Rousseaux et al, 1995 : Cytogenetics and Cell Genetics 71 : 240-246.
- 37- Rudak et al, 1978: Nature 274: 911-913.
- 38- Spriggs & Martin, 1994: Molecular Reproduction and Development 38: 247-250.
- 39- Van Hummelen et al, 1997: American Journal of Human Genetics 61: 651-659.