



**FISH EN SEMEN PARA EVALUAR ANEUPLOIDIAS
CROMOSOMICAS**

**RIESGO GENETICO REPRODUCTIVO DEL
VARON INFERTIL**

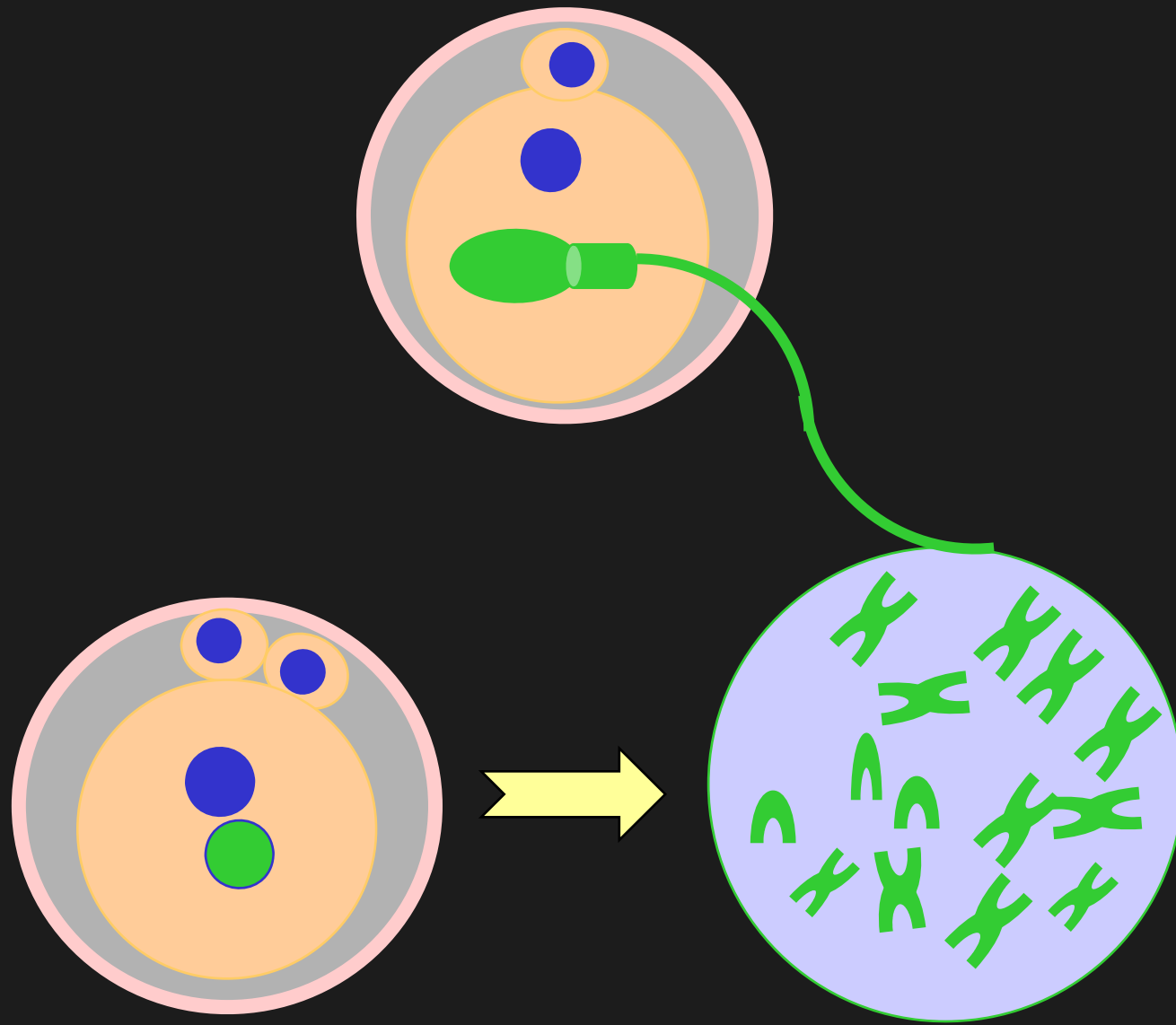
Dr Roberto Coco

Fecunditas

Estudio de Aneuploidías en espermatozoides

- ❖ Técnica de Inseminación de ovocitos de hamster
- ❖ FISH en espermatozoides
- ❖ Aneuploidía por PCR múltiple

Técnica del Hamster





**ANOMALIAS CROMOSOMICAS EN ESPERMATOZOIDES
DE DONANTES
TECNICA DE HAMSTER**

AUTORES	Nº ESPERMAS	DONANTES	% ANOMALIAS
Martín et al, 90	5629	83	10.8
Brandriff et al, 85	2468	11	9.4
Kamiguchi & Mikamo, 86	1091	4	13.9
Pellestor & Sele, 89	787	6	9.3
Navaro et al, 90	503	?	10.3

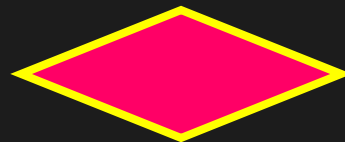
EN LA ACTUALIDAD

EL ESTUDIO CROMOSÓMICO

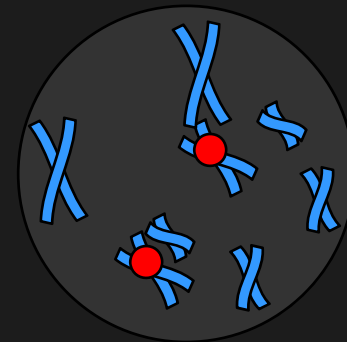
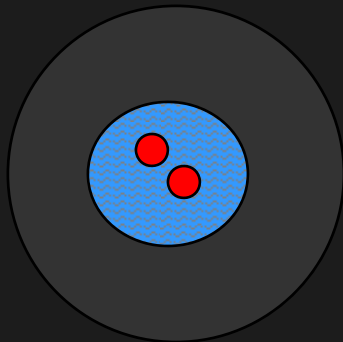
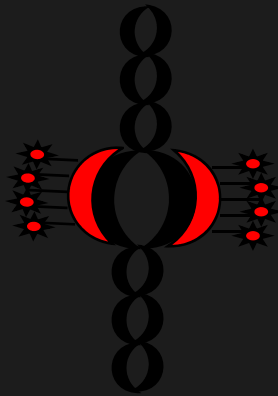
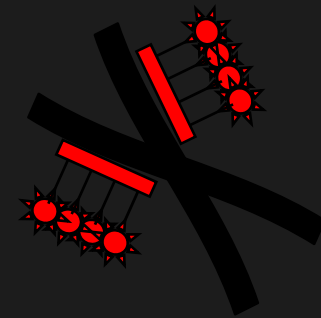
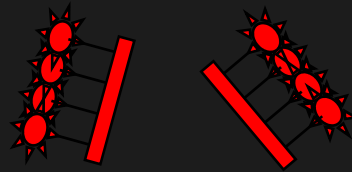
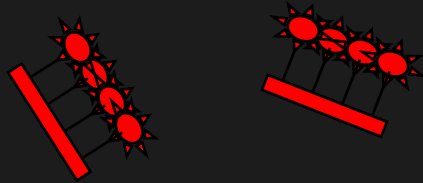
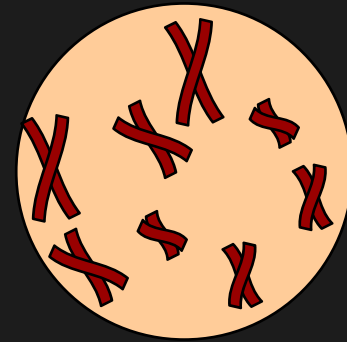
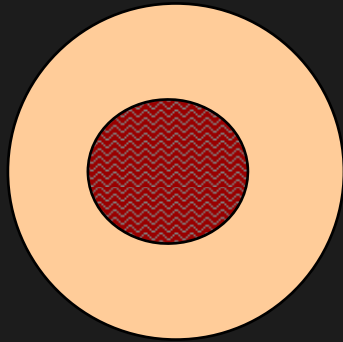
CON LA TÉCNICA DEL HAMSTER

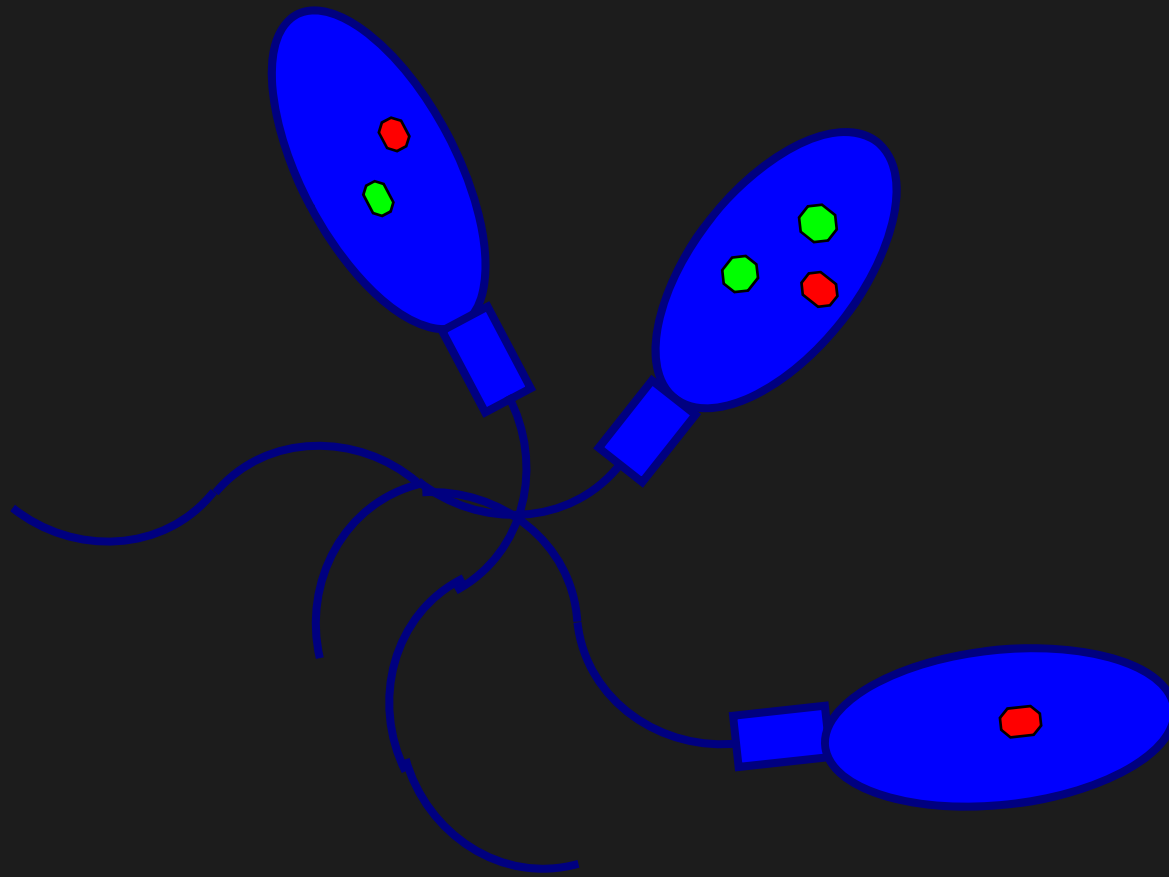
HA SIDO REEMPLAZADA CON

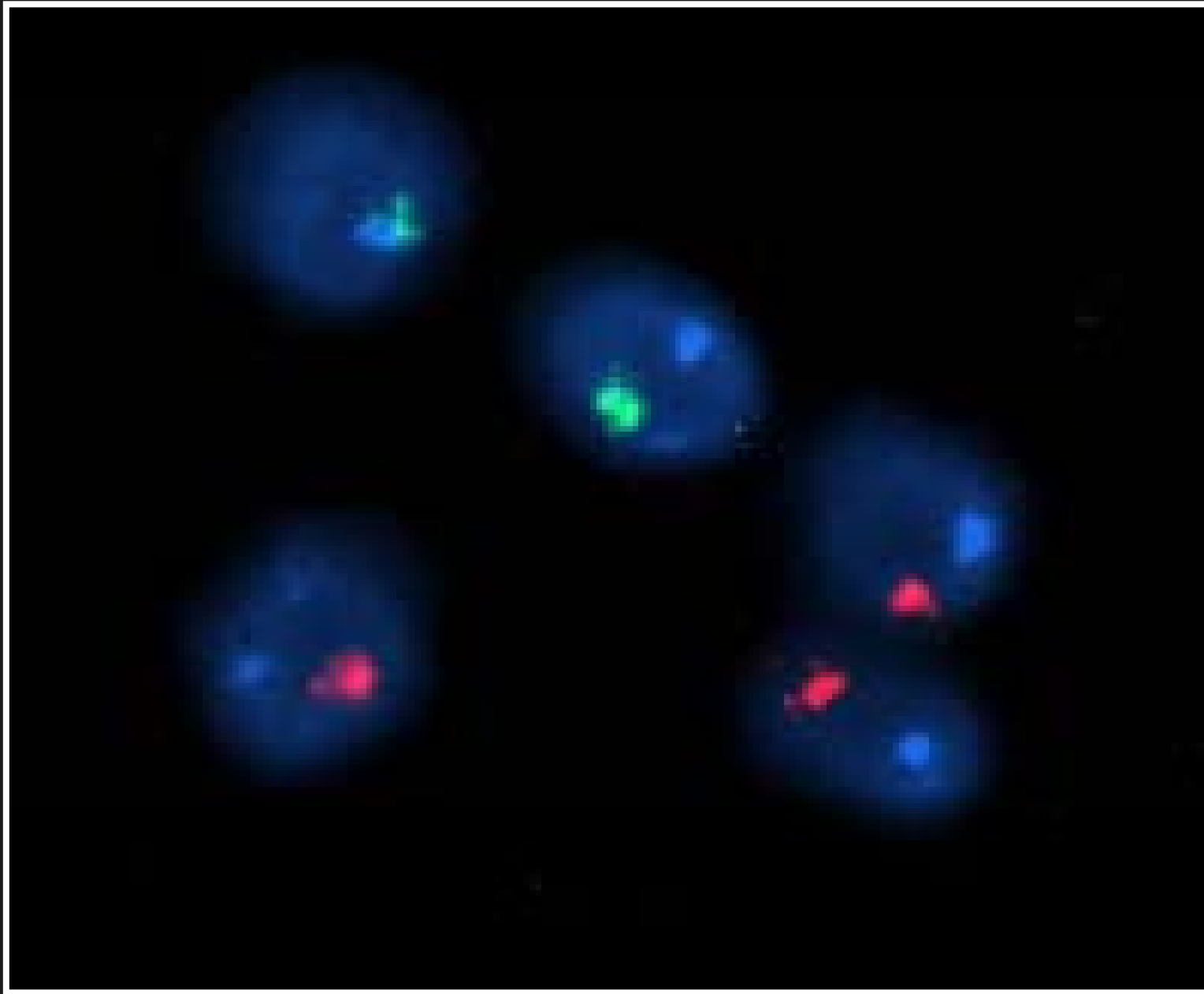
LA TÉCNICA DE FISH



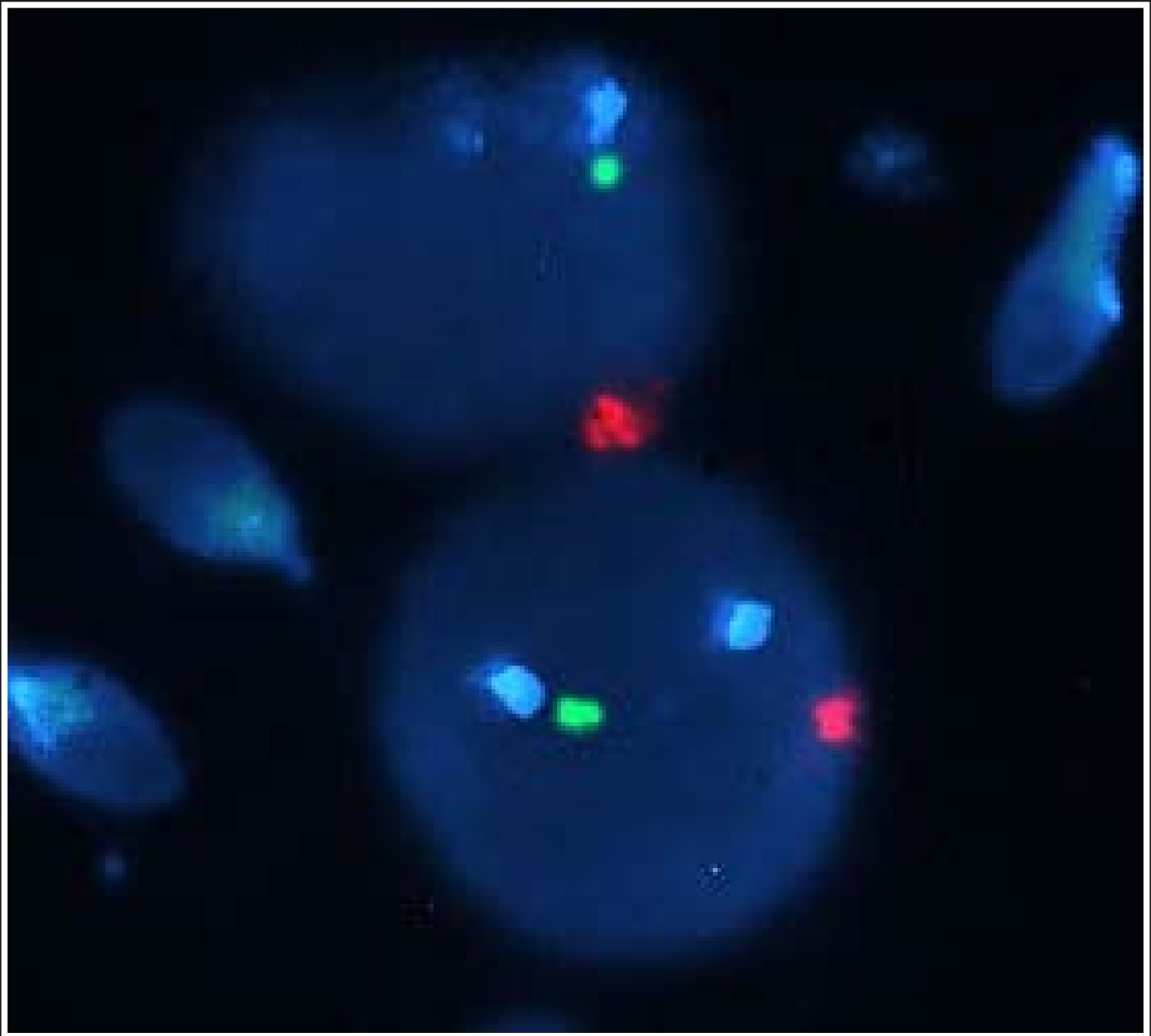
FISH

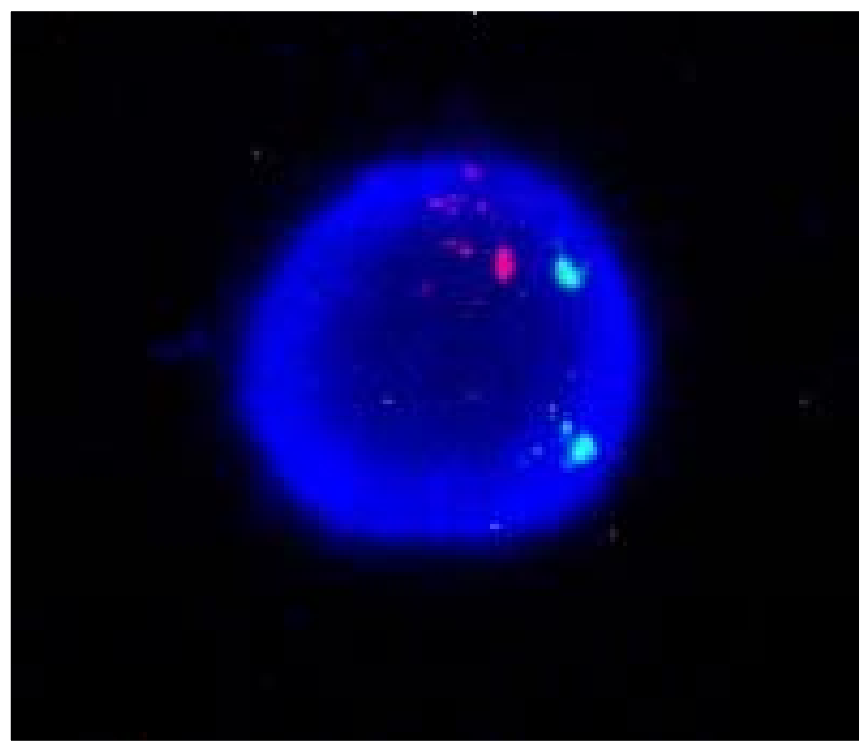




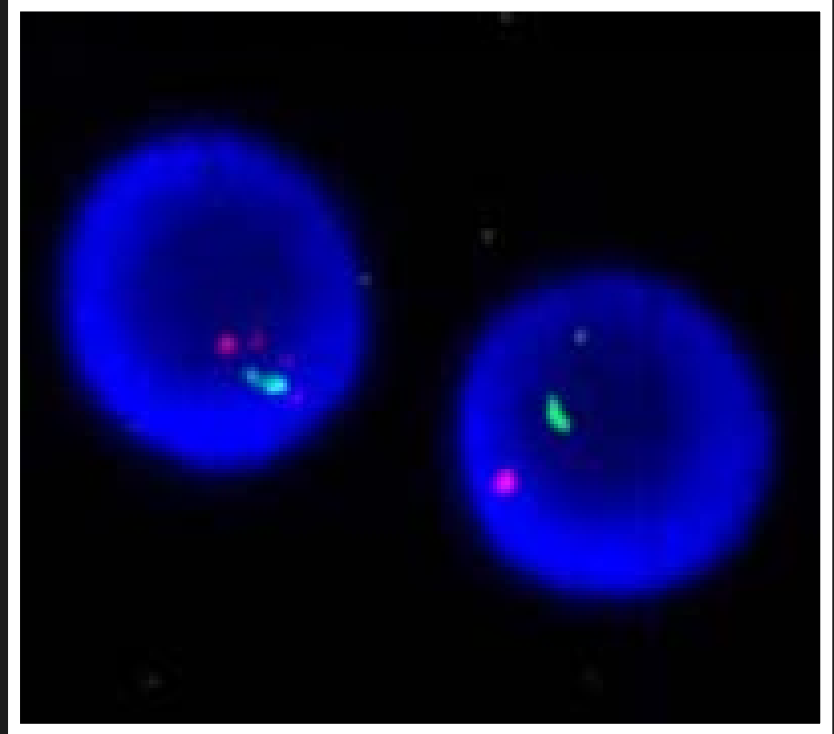


18,XY

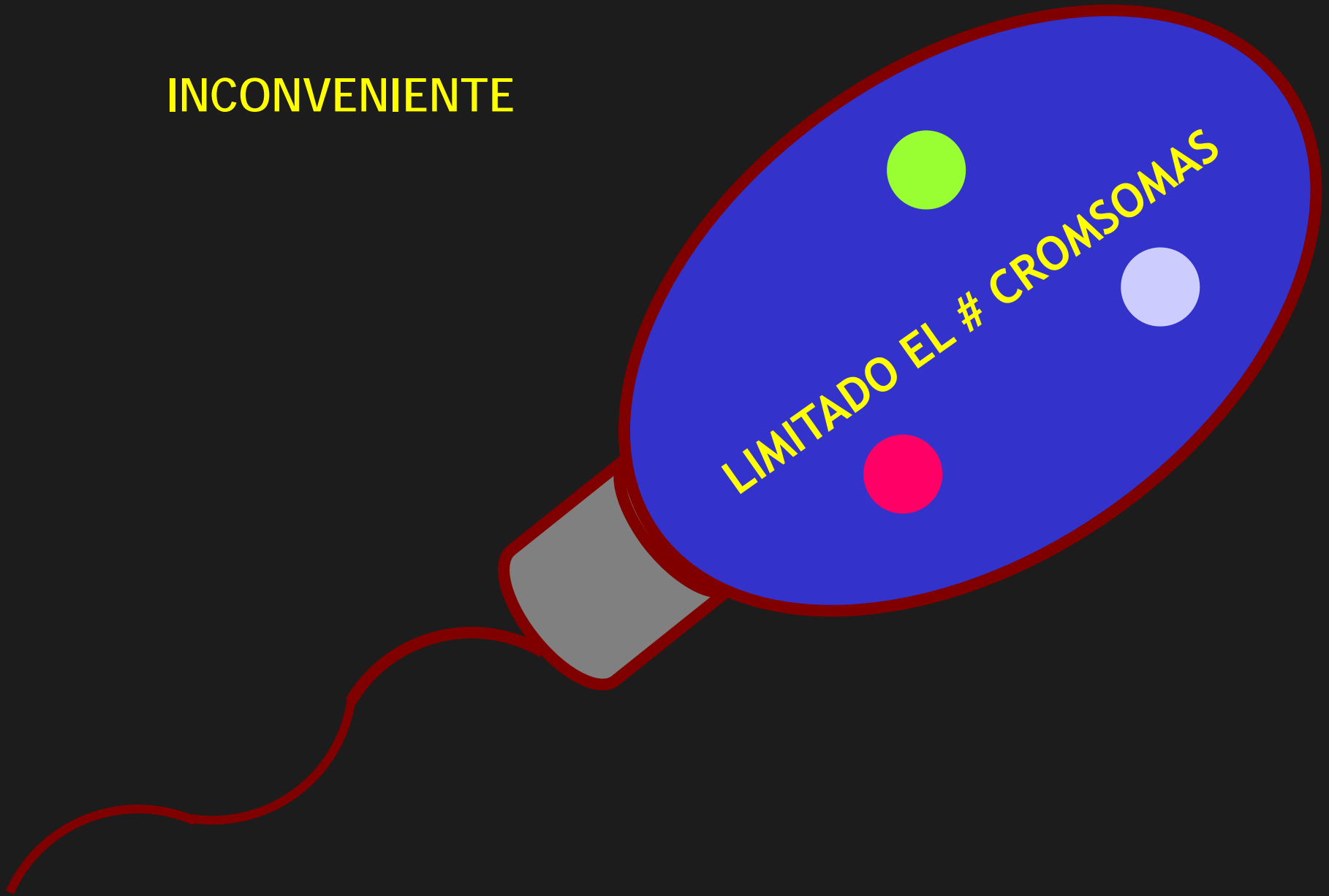




13,21



INCONVENIENTE



Rives et al, 1998 evaluaron todo el complemento
en 4 donantes



UNIFORMIDAD
DISOMÍAS AUTOSÓMICAS



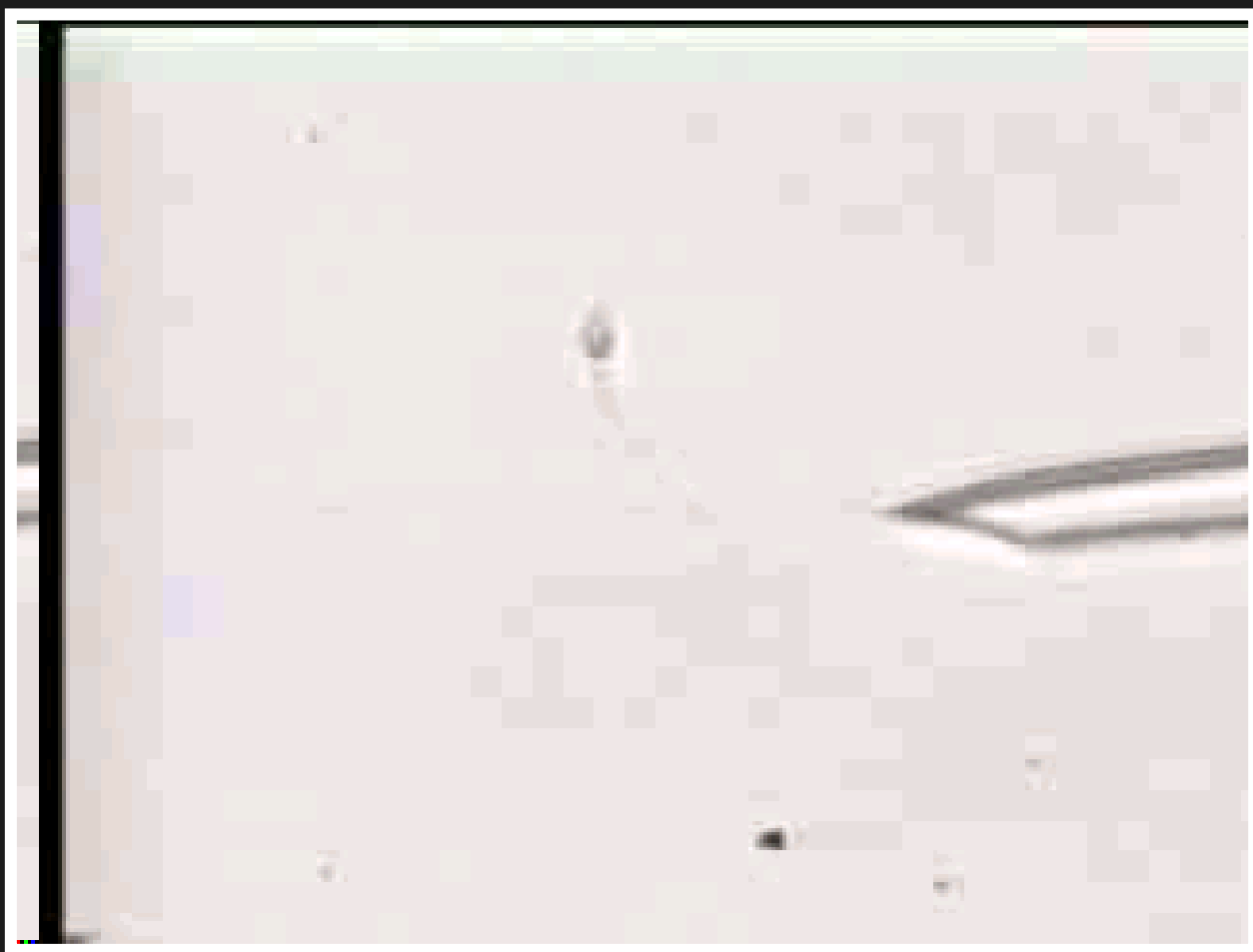
ESTIMAR EL % DE ANEUPLOIDIA
DE TODO EL COMPLEMENTO
SIN ESTUDIAR A TODOS

FISH EN SEMEN DE VARONES NORMALES

VARONES	% ANEUPLOIDÍAS				% ESPERMAS ANORMALES
	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

$\% \text{ Espermias Anormales} = \% \text{ crom.sex anorm.} \times [(\% \text{ cromos. estudiados})^{1/3}]^{22}$

Tasa de Aneuploidía = 10,1% ± 3,8



Pang et al, 1999

*Detection of aneuploidy for chromosomes
4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X e Y by FISH
In spermatozoa from 9 patients with OAT undergoing ICSI*

Grupos Estudiados	% Aneuploidía
OAT (9)	33 - 74
Control (4)	4.1 - 7.7

5 hicieron 6 ciclos de ICSI



Ningun Embarazo

FISH EN ESPERMATOZOIDES DE VARONES QUE ACCEDIERON AL ICSI

n = 10 pacientes con factor masculino

3 embarazos

5 abortos espontáneos

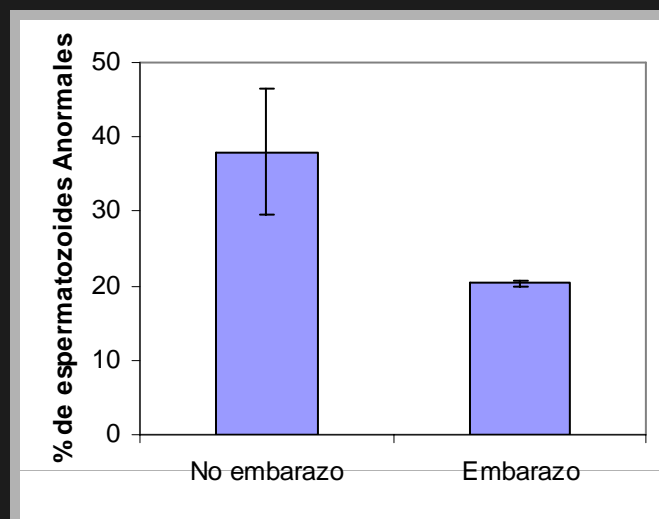
2 no embarazo

Grupo I = E (n = 3)

Grupo II = NE + AE (n = 7)

Porcentaje de espermatozoides anormales

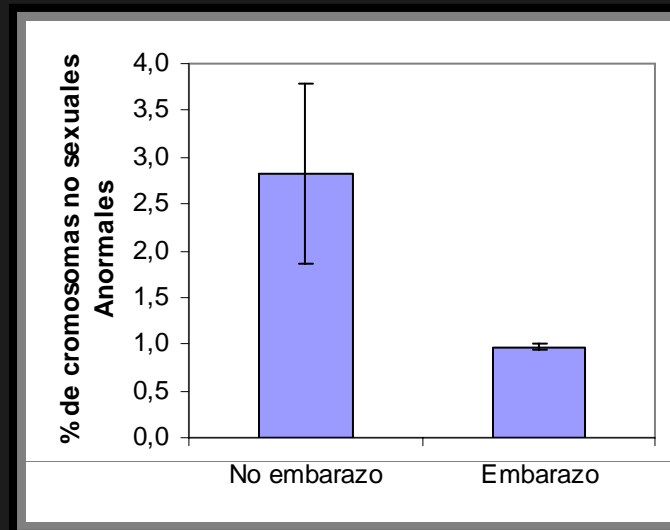
	GRUPO I (%)	GRUPO II (%)
X	20.40	38.01
DS	0.69	22.60
ES	0.40	8.54
Mediana	20.8	38.3



$P < 0.05$

ANEUPLOIDIAS AUTOSOMICAS

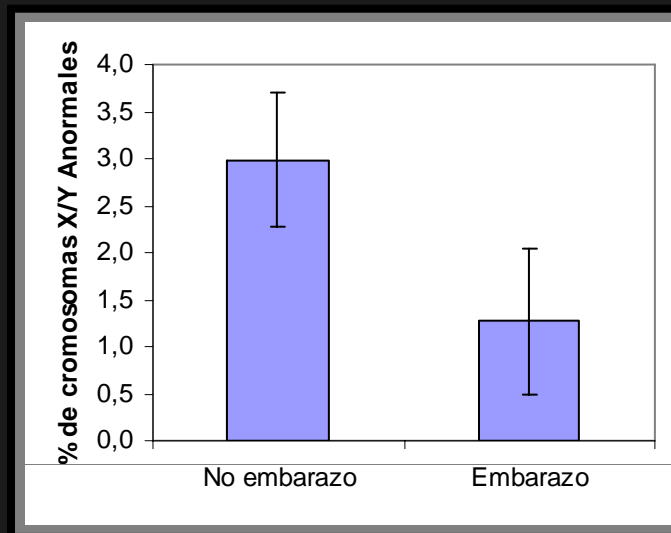
	GRUPO I (%)	GRUPO II (%)
X	0.97	2.83
DS	0.06	2.54
ES	0.03	0.96



$P < 0.05$

ANEUPLOIDIAS SEXUALES

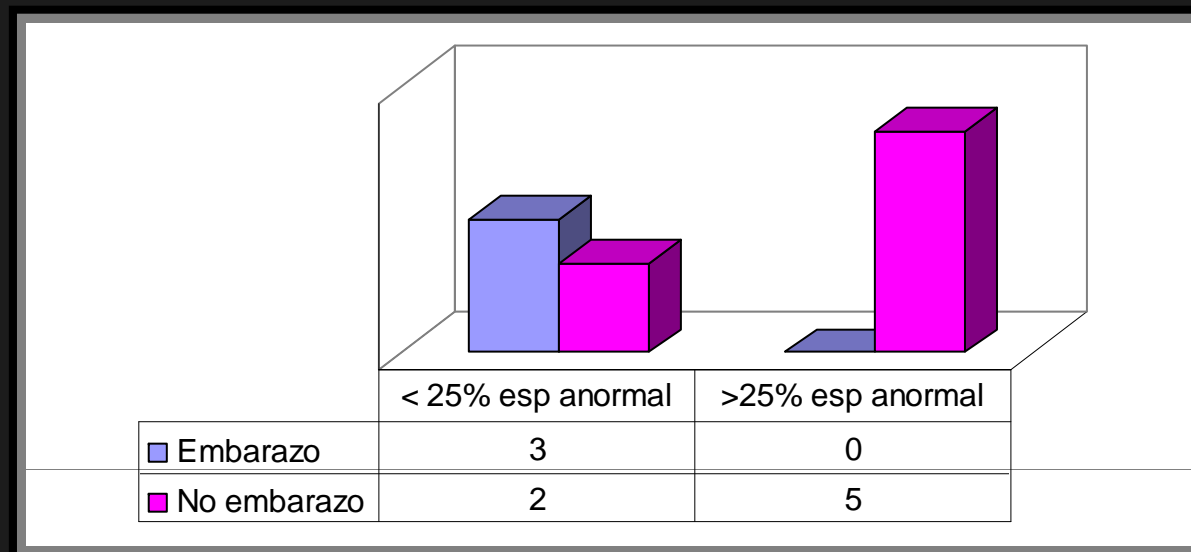
	GRUPO I (%)	GRUPO II (%)
X	1.27	2.99
DS	1.83	1.87
ES	0.77	0.71



P = NS

EMBARAZO Y ESPERMATOZOIDES ANEUPLOIDES

% Esp. Anormales	EMB	NO EMB	TOTAL	% EMB
< 25 %	3	2	5	60
> 25%	0	5	5	0



$P = 0.083$

FISH EN SEMEN EN 53 PACIENTES CON OAT

Dos mezclas de sondas: CEP 18,X,Y y LIS 13,21

Estimación espermatozoides anormales

$$XYa \times [(13a \times 18a \times 21a)^{1/3}]^{22}$$

RECuento

A: $< 5 \times 10^6$ (n= 16)

B: > 5 y $< 20 \times 10^6$ (n=13)

C: $> 20 \times 10^6$ (n=24)

MOVILIDAD

A: $< 20\%$ ($n=39$)

B: $> 20\%$ ($n=14$)

MORFOLOGÍA

A: $< 15\%$ (n=24)

B: $> 15\%$ (n=29)

TOTALIDAD ESPERMATOZOIDES MÓVILES NORMALES

Rto x Mov x Morf

A: $< 1 \times 10^5$ (n=33)

B: $> 1 \times 10^5$ y $< 1 \times 10^6$ (n=13)

C: $> 1 \times 10^6$ (n= 7)

Recuento espermático y Aneuploidías

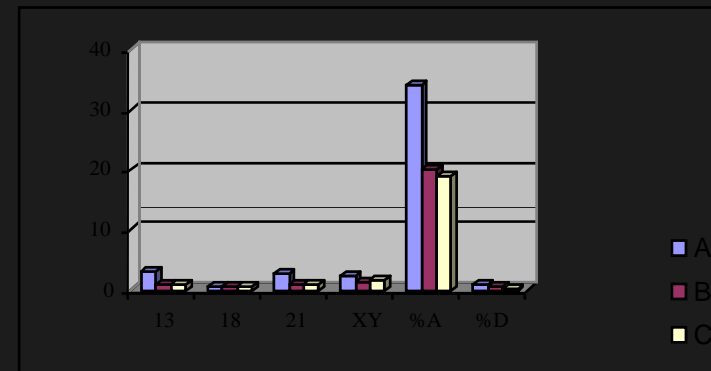
grupo	13	18	21	XY	E. Aneu.	% Dipl.
A	3,86 ^b	0,73	2,78	2,44	34,75 ^b	0,80
B	1,34 ^a	0,73	1,19	1,22	20,70 ^a	0,59
C	1,24 ^a	0,62	1,13	1,63	19,88 ^a	0,36

A: $\leq 5 \cdot 10^6/\text{ml}$

B: $> 5 \cdot 10^6/\text{ml} - < 20 \cdot 10^6 /\text{ml}$

C: $> 20 \cdot 10^6/\text{ml}$

a # b



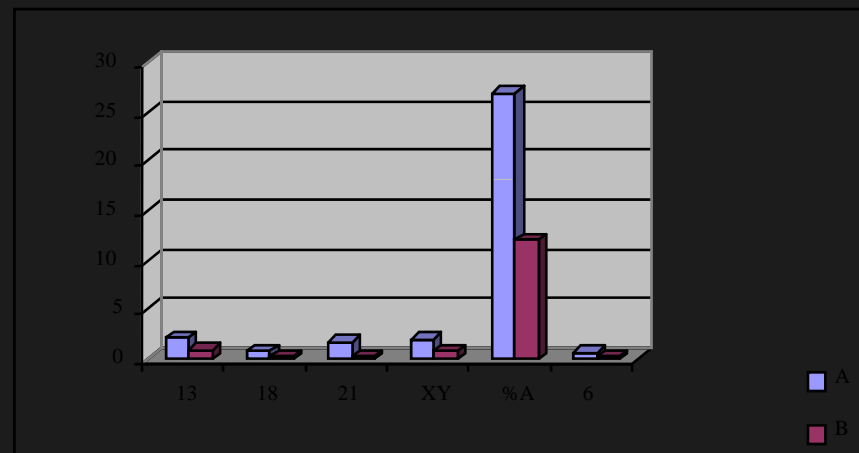
Movilidad Espermática y Aneuploidías

grupo	13	18	21	XY	E. Aneu.	% Dipl.
A	2,10	0,73	1,74	1,99	26,98	0,61
B	0,97	0,34	0,34	0,81	12,26	0,28

A: <20%

B: >20%

A # B



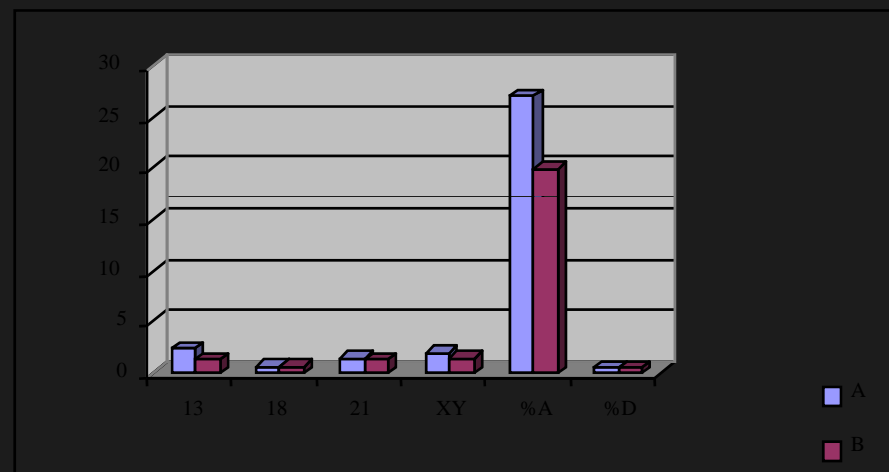
Morfología espermática y Aneuploidías

grupo	13	18	21	XY	E. Aneu.	% Dipl.
A	2,40	0,65	1,53	2,01	27,26	0,53
B	1,39	0,63	1,30	1,49	20,64	0,54

A: < 15%

B: > 15%

A=B



TNM y Aneuploidías

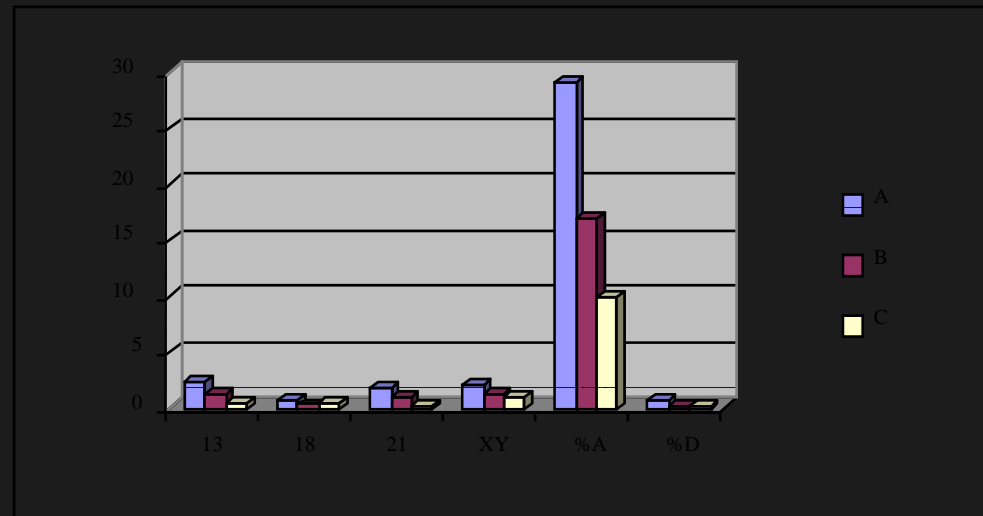
grupo	13	18	21	XY	E. Aneu.	% Dipl.
A	2,36	0,79	1,85	2,10	29,01	0,73
B	1,28	0,37	0,91	1,23	17,65	0,26
C	0,42	0,46	0,16	0,91	9,93	0,20

A: $<1 \cdot 10^5/\text{ml}$

B: $>1 \cdot 10^5/\text{ml} < 1 \cdot 10^6/\text{ml}$

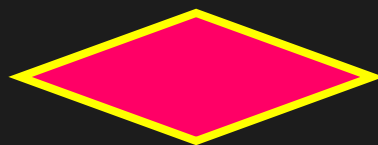
C: $>1 \cdot 10^6/\text{ml}$

A # B # C
 excepto par 18 y diploidía
 entre grupo B y C

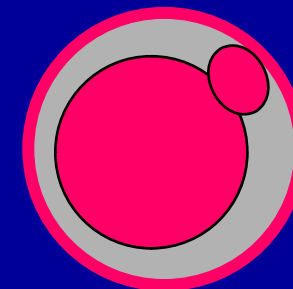
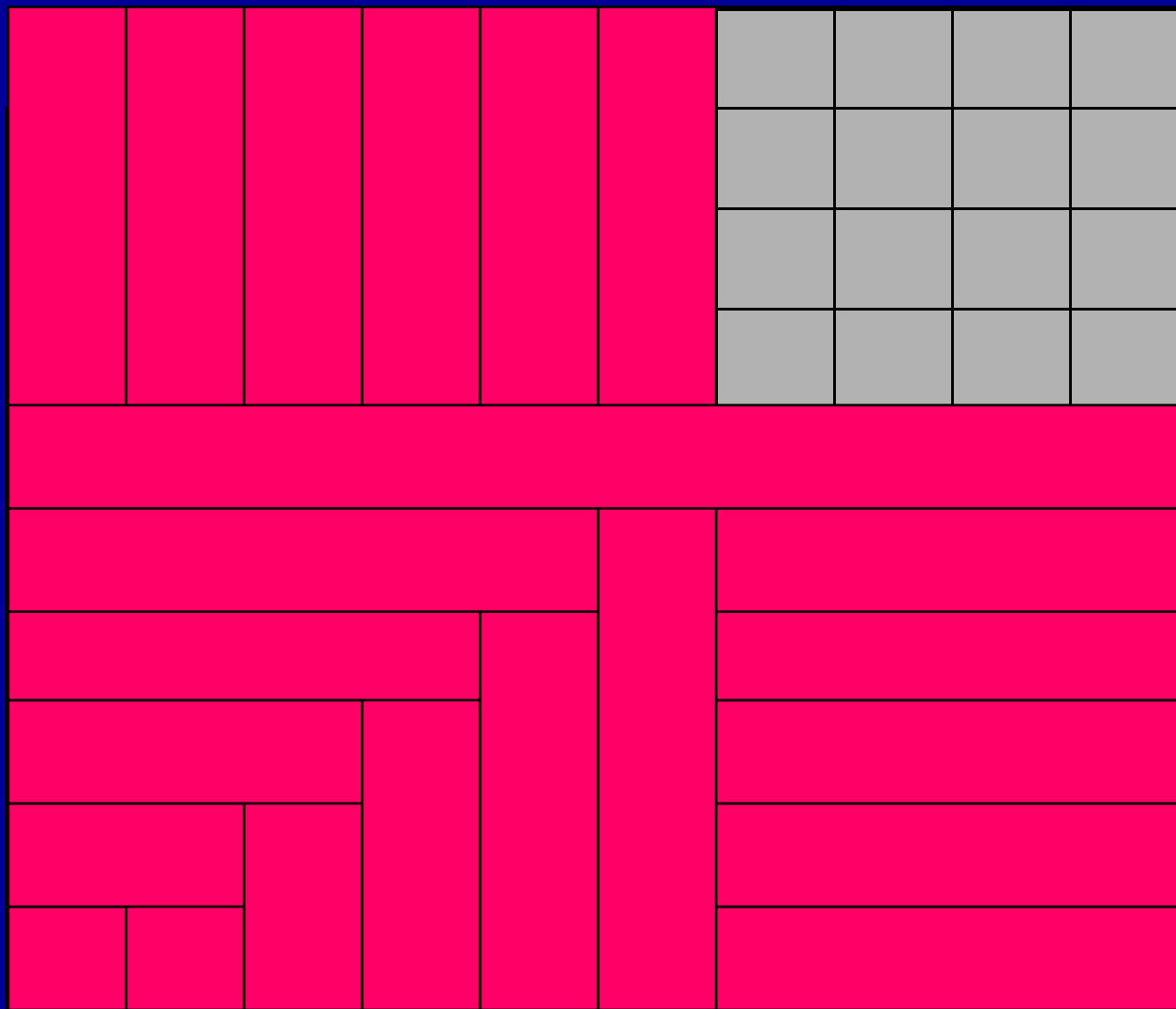
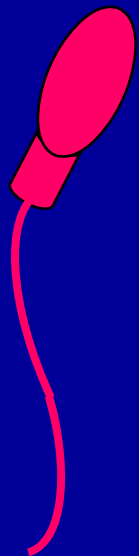


FISH EN SEMEN

	TASA DE ANEUPLOIDIA				
GRUPO	13	18	21	XY	TOTAL
OAT N:53	1,9±2,59	0,64 ±0,64	1,56 ±2,40	1,70 ±1,41	24,62 ±18,09 R:4 a 83%
NORMAL N:10	0,58±0,28	0,26±0,11	0,55±0,39	0,71±0,29	10,09 ±3,78 R:4,2 a 14,3%



POSIBILIDADES DE FECUNDACIÓN



Posibilidades de Fecundación

% Ovulos anormales	% Espermatozoides anormales
20	10
porcentaje fecundación normal: 72,00	

Errores de Fertilización: 1 - 5%

Errores post Fertilización: 5 - 15%

Probabilidad Fertilización Anormal: ~ 50%

De los 53 pacientes estudiados

37 realizaron ICSI

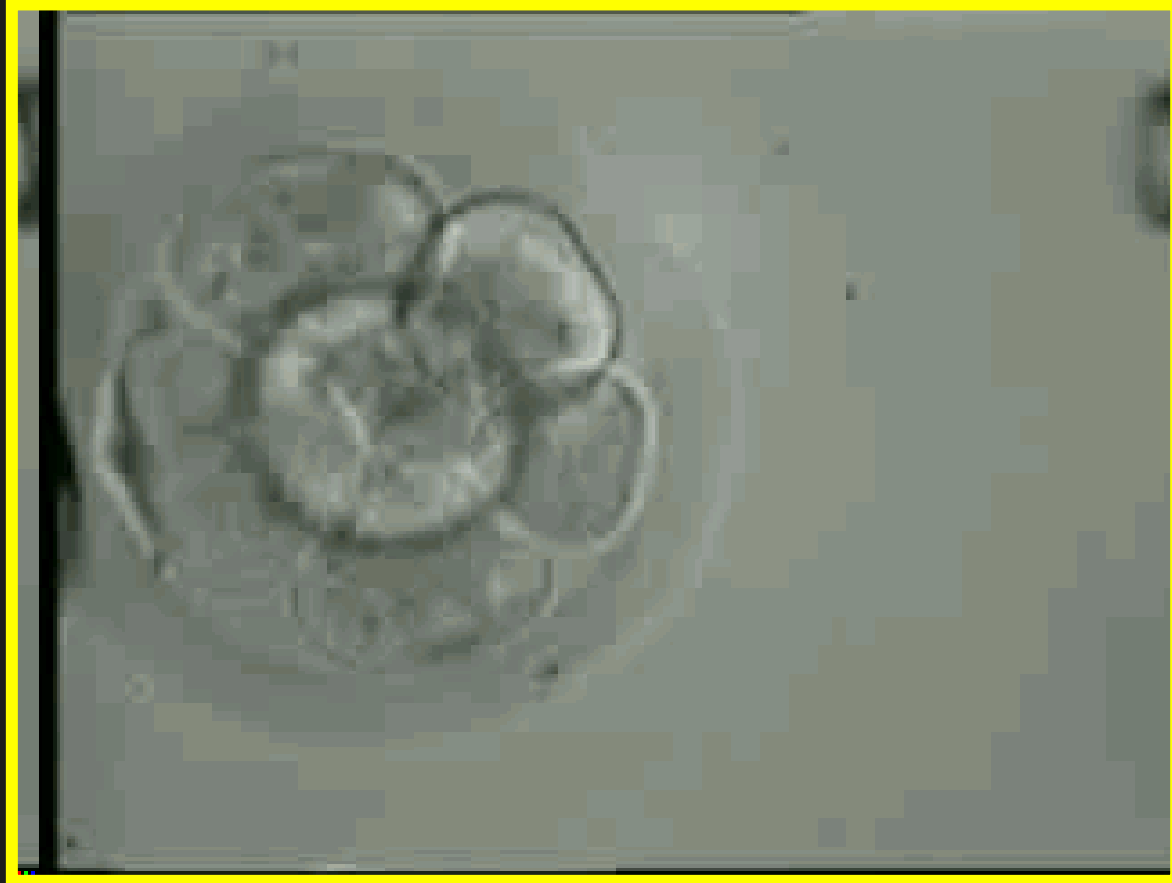


12 EMBARAZOS

10 con < 25% aneuploidías

2 con > 25% aneuploidías + PGD





Aneuploidías y parámetros espermáticos

Autor	Aneup.	Parám.	Nº	Result.
Bernardini, 98	1,17	Teratoz.	6	+
Rives, 99	1,13,14, 18,21,22 X,Y	Rto. Mov. Morf.	50	- + +
Vegetti, 2000	13,18,21 X,Y	Rto. Mov. Morf.	15	+ + +
Ushijima, 2000	X,Y	Teratoz.	8	+
Colagero, 2001	13,18,21 X,Y	Rto. Mov. Morf.	41	+ + +

Cont.

Autor	Aneup.	Parám.	N°	Result.
Viville,2000	1,X,Y	Globoz.	5	-
		Macrosc.	4	+
Acar,2000	8,10,X,Y	OAT	6	+
Harkonen,01	1,7,18,X, Y	Teratoz.	20	+
Colagero,01	8,12,18, X,Y	Rto.	19	+
		Mov.		+
		Morf.		+
Colagero,2001	13,18,21 X,Y	Rto.	41	+
		Mov.		+
		Morf.		+

Cont.

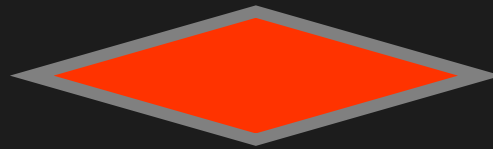
Autor	Aneup	Parám.	N°	Result.
Rubio,01	13,18,21 X,Y	0AT	21	+
Templado,02	13,18,21 X,Y	Teratoz.	9	+
Martin,03	1,15,21, X,Y	Globoz.	1	-
Lewis-Jones,03	18,X,Y	Teratoz.	3	+
Vicari,03	8,12,18, X,Y	Teratoz.	3	+
Schmid,03	18,X,Y	Oligoz.	3	+
Coco,02	13,18,21 X,Y	Rto.		+
		Mov.	53	+
		Morf.		-

Aneuploidía espermática en azoospermia

Autor	Control	Obstruct. (n)	No Obst. (n)
Bernardini, 2000	1,47 (10)	4,84 (6)	19,27 (3)
Levron, 2001	1,60 (6)	8,20 (10)	19,60 (9)
Palermo, 2002	1,50 (14)	1,80 (8)	11,40 (5)

Aneuploidía espermática en Aborto Recurrente

Autor	Aneuploidía	Nº	Resultado
Rubio,01	13,18,21,X,Y	59	+
Douglas,03	13,18,21,X,Y	24	+
Carrel,03	13,18,21,X,Y	24	+



Aneuploidía Espermática y Resultado del ICSI

Menor tasa de aneuploidía espermática



Mayor tasa de embarazo

Coco et al, 2000= 10 ciclos

Colagero et al, 2001= 18 ciclos

Rubio et al, 2001= 38 ciclos

Burello et al, 2003= 48 ciclos

Griffim et al, 2003

Should men undergoing ICSI be screened for Chromosome Abnormalities in their Sperm?

1-Habitualmente realiza ICSI ?

Si 156

No 34

1a- Se informa sobre:

a- cariotipo	Si	126	No	28	No seguro	2
b- AZF		65		55		6
c- FISH semen		18		128		10

2- Existe riesgo aumentado en ICSI vs FIV ?

Si 94 No 54 No seguro 42

2a- Causas del mayor riesgo ?

a) Esperma usado con anomalía cromosómica	61
b) Al ICSI	11
c) Otras	8
d) Dudas	14

3- Cual es su opinión sobre el ICSI ?

a- Sin mayor riesgo vs FIV	17
b- Mayor riesgo	10
c- Más información se requiere	35
d- Mínimo riesgo vs beneficio	122
f- Más riesgo vs beneficio	0
g- Otras	6

4- Todos los pacientes son informados sobre el riesgo potencial del ICSI?

Si 184 No 6

5- Es beneficioso el FISH en semen ?

Si 97 No 43 No seguro 50

FISH en semen

Mejor herramienta

RIESGO GENETICO REPRODUCTIVO

A grayscale microscopic image of a cell cluster, likely a blastocyst, showing several rounded cells with distinct nuclei and cytoplasm. The cells are arranged in a somewhat circular pattern. The background is a light gray, textured surface.

Laboratorio Genética y FIV

Alicia Gallo

Judith Mincman

Irma Coco

Martin Urquiza

Fabian Coco

Paola Estanga

Felicitas Noblia

Fernando Gismondi

Nicolás Neuspiller