

valoració del **risc genètic** en pacients amb **oligoastenozoospèrmia** en un programa de **microinjecció intracitoplasmàtica**.



**Begoña Aran Corbella**

Barcelona, desembre de 2005

VALORACIÓ DEL RISC GENÈTIC EN PACIENTS AMB  
OLIGOASTENOZOOSPÈRMIA EN UN PROGRAMA DE  
MICROINJECCIÓ INTRACITOPLASMÀTICA

Memòria presentada per Begoña Aran Corbella per optar al grau de doctor  
per la Universitat Autònoma de Barcelona

Begoña Aran Corbella  
Barcelona, desembre 2005

La Dra. Francesca Vidal Dominguez, Catedràtica de Biologia Cel·lular del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, i la Dra. Anna Veiga Lluch, Directora Científica del Servei de Medicina de la Reproducció del Departament d'Obstetrícia i Ginecologia del Institut Universitari Dexeus,

CERTIFIQUEN: que Begoña Aran Corbella ha realitzat sota la seva direcció el treball de tesi doctoral "Valoració del risc genètic en pacients amb oligoastenozoospermia en un programa de microinjecció intracitoplasmàtica".

Aquest treball s'ha dut a terme a la Unitat de Biologia Cel·lular de la Universitat Autònoma de Barcelona i al Servei de Medicina de la Reproducció del Institut Universitari Dexeus.

Dra. Francesca Vidal Dominguez

Dra. Anna Veiga Lluch

Barcelona, desembre de 2006.

A la Clàudia i la Júlia,  
que han sofert aquesta tesi més que jo

## Agraïments

A l'Anna, codirectora d'aquesta tesi, per la seva confiança, per encomanar-me les ganes de fer coses encara que a vegades costi i per ensenyar-me a passar-m'ho bé treballant.

A la Fanny, codirectora d'aquesta tesi, per la seva ajuda constant, la seva paciència, per tenir sempre cinc minuts (i a vegades molts més) i per ser sempre ella la que "baixa a Barcelona".

A les dues, per la seva amistat, per ensenyar-me tantes coses i per tibar de la corda quan calia i entendre els moments en que s'havia d'afluixar. M'ho he passat molt bé fent la tesi amb vosaltres.

Al Dr. Pere Barri, cap del Departament d'Obstetrícia i Ginecologia de l'Institut Universitari Dexeus, per fer-me sentir part d'un bon equip.

Al Dr. Josep Egozcue, per la revisió dels treballs i per la seva qualitat humana.

A tots els biòlegs del laboratori de FIV. Les que em van "acollir" quan vaig arribar, fa molts, molts anys, l'Anna, la Gloria, la Itziar, la Paz i la Montse. La M<sup>a</sup> José pel seu optimisme, els seus ànims i per compartir amb mi més que l'esmorzar. Les que van arribar després: l'Ana, la Yolanda, la Gemma, la Mònica (la meva genetista de capçalera), l'Eli, la Marta L., la Cristina, la Bea i la Clara. Les que van marxar; la Fina, l'Ester, la Marta M, la Laura M, la Irene, l'Olga, la Mireia, la Carolina, la Laura S. i la Marta S. I el Miquel i el Baltasar, que porten molt bé això de ser "biòlogues".

A tots els companys ginecòlegs, andròlegs i ecografistes del Servei de Medicina de la Reproducció, pel seu treball d'equip.

Als màsters; la Silvia, la Ruth, la Mireia, el Cèsar i la Marta, per la recollida de dades.

A la Zaïda Sarrate i la Mònica Parriego per cedir-me algunes de les imatges.

Al Joan Carles Suris, per l'anàlisi estadística.

A l'Alicia, per la correcció del català.

A l'Albert i l'Anna, pel disseny i l'edició.

A la Montse i la Blanca, per fer de tietes sempre que ho necessito. I a l'Arantza, la millor cangur.

Als meus pares, per gairebé tot.

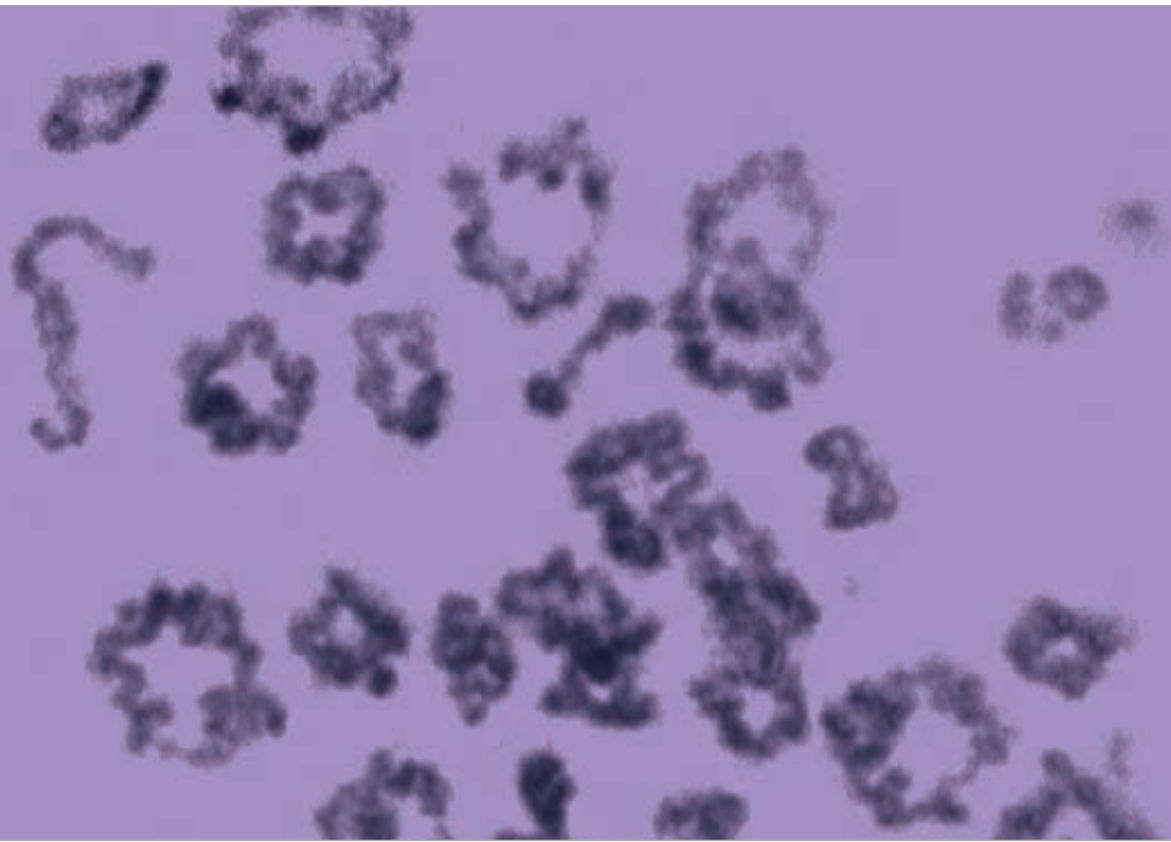
I molt especialment, al Ramon, pel seu constant suport.

● ○ 00 · index

1.	Introducció	1
1.1	La reproducció en l'espècie humana	3
1.1.1	Eficiència reproductiva en l'espècie humana	3
1.1.2	Anomalies cromosòmiques	4
1.2	Citogenètica en cèl·lules germinals masculines	5
1.2.1	Meiosi masculina	5
1.2.1.1	Alteracions de la meiosi masculina	5
1.2.1.2	Aplicació clínica de l'estudi de la meiosi	6
1.2.2	Citogenètica de l'espermatozoide	6
1.2.2.1	Tinció cromosòmica diferencial	6
1.2.2.2	Cromosomes d'espermatozoides	7
1.2.2.3	Hibridació in situ fluorescent (FISH)	7
1.3	Tècniques de reproducció assistida (TRA). La fecundació in vitro (FIV)	9
1.3.1	Microinjecció intracitoplasmàtica d'espermatozoide (ICSI)	10
1.3.1.1	Risc genètic de la ICSI	10
1.3.1.2	Seguiment dels embarassos i nens nascuts mitjançant la ICSI	11
1.3.2	Diagnòstic genètic preimplantacional (DGP)	13
1.3.2.1	Diagnòstic genètic preimplantacional per esterilitat de causa masculina	13
2.	Objectius	15
3.	Resum de material i mètodes	19
3.1	Població estudiada	21
3.2	Estudi del pacient estèril	21
3.2.1	Seminograma	21
3.2.2	Cariotip	21
3.2.3	Biòpsia testicular i estudi de la meiosi	21
3.2.4	Hibridació in situ fluorescent (FISH) en espermatozoides	21
3.3	Cicle de fecundació in vitro (FIV)	22
3.3.1	Inducció de l'ovulació i punció fol·licular	22
3.3.2	Preparació de mostres de semen	22
3.3.3	Microinjecció intracitoplasmàtica (ICSI)	22
3.3.4	Cultiu i transferència embrionària	22
3.3.5	Fase lútia	23
3.4	Protocol de DGP	23
3.4.1	Biòpsia embrionària i fixació	23
3.4.2	Hibridació in situ de fluorescència (FISH)	23
3.4.3	Cultiu i transferència embrionària	23
3.5	Anàlisi estadística	24

4.	Resultats	25
4.1	Freqüència d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides de pacients estèrils	27
4.2	Relació entre les anomalies meiótiques dels pacients amb oligoastenozoospermia greu i els resultats dels cicles de FIV-ICSI	29
4.3	Diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) en pacients amb meiosi alterada	30
5.	Publicacions	35
5.1	<i>Article 1: 'Screening for abnormalities of chromosomes X,Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program'</i>	37
5.2	<i>Article 2: 'Outcome of intracytoplasmic sperm injection in relation to the meiotic pattern in patients with severe oligoasthenozoospermia'</i>	45
5.3	<i>Article 3: 'Preimplantation genetic diagnosis in patients with male meiotic abnormalities'</i>	53
6.	Discussió general	63
6.1	Anomalies cromosòmiques en els espermatozoides de pacients amb factor masculí	65
6.2	Resultats dels cicles de microinjecció intracitoplasmàtica (ICSI) en funció del patró meiótic en pacients amb oligoastenozoospermia (OA)	67
6.3	Diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) en pacients amb alteracions de la meiosi	68
6.3.1	Incidència d'embrions anormals	68
6.3.2	Freqüència d'aneuploidies	69
6.3.3.	Resultats dels cicles de FIV-ICSI amb i sense DGP	70
6.4	Risc genètic i cribatge del pacient amb factor masculí greu	71
7.	Conclusions	73
8.	Bibliografia	77





● ○ 01 · introducció

## 1.1. La reproducció en l'espècie humana

---

### 1.1.1. Eficiència reproductiva en l'espècie humana

---

L'esterilitat es defineix com la impossibilitat per a una parella d'aconseguir un embaràs després d'un any de relacions sexuals sense protecció. Afecta un 10-15% de les parelles en edat reproductiva i en un 20% dels casos la causa d'esterilitat és masculina.

L'espècie humana és una de les espècies de mamífers menys fecundes i es considera que les possibilitats d'obtenir una gestació per a una parella sense problemes d'esterilitat són aproximadament d'un 25% per cycle menstrual (Edmonds et al., 1982). Es calcula que aproximadament el 70% de les gestacions no arriba a terme i que el 50-60% es perd durant o poc després de la implantació, per tant, són inadvertides (Hill i Anderson, 1990).

Una proliferació endometrial insuficient o alteracions en els senyals entre l'embrió i l'endometri podrien ser causes d'aquesta baixa taxa de fecunditat. També ho podrien ser una vascularització uterina deficient o alteracions dels nivells hormonals. Una de les contribucions a la pèrdua embrionària més important és, sens dubte, la producció d'embrions cromosòmicament anormals.

L'espècie humana presenta una incidència molt elevada d'embrions cromosòmicament anormals. La majoria d'aquestes anomalies cromosòmiques són originades durant els processos de formació d'oòcits i d'espermatozoides. Gràcies a la fecundació in vitro (FIV) ha estat possible l'accés a l'oòcit i el seu estudi i es considera que entre el 20-25% dels oòcits són cromosòmicament anormals. Aquest percentatge augmenta amb l'edat materna, ja que la integritat del procés meiótic de l'oòcit empitjora amb l'edat de la dona (Battaglia et al., 1996).

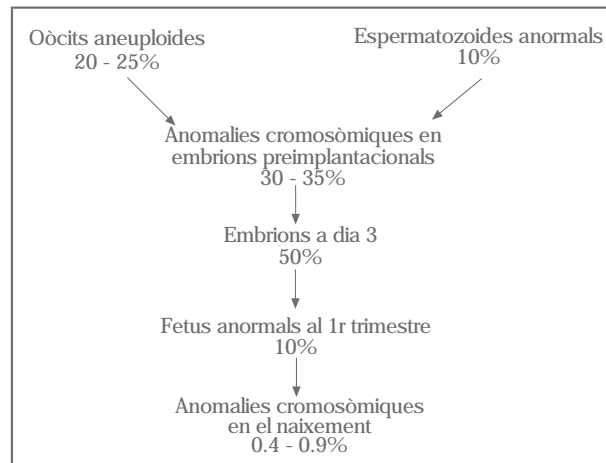
Estudis en espermatozoides utilitzant primer el test de hámster i, més tard, la hibridació in situ fluorescent (FISH) han estimat un 10% d'anomalies cromosòmiques. Tot i que existeix una gran variabilitat no només entre laboratoris, sinó també entre individus.

Tenint en compte els percentatges d'oòcits i d'espermatozoides amb anomalies cromosòmiques, es pot calcular que entre el 30-35% de les concepcions seran cromosòmicament anormals.

També poden originar-se anomalies cromosòmiques després de la fecundació. Les primeres divisions postzigòtiques són especialment sensibles i poden donar lloc a mosaïcismes. El percentatge de mosaïcisme observat en els embrions procedents de FIV oscil·la entre el 17% i el 43% i el d'anomalies cromosòmiques en general, entre el 30% i el 65% (Wilton, 2002).

Estudis citogenètics en avortaments presenten una incidència d'anomalies cromosòmiques entre el 50% i el 70% (Hassold et al., 1980; Jacobs i Hassold, 1995). Aquest percentatge va disminuint a mesura que ens apropem al moment del naixement, de manera que es troben anomalies cromosòmiques en el 5% de les morts perinatales i en un 0.9% del nascuts vius (Jacobs, 1992) (Figura1).

Figura 1. Anomalies cromosòmiques i selecció natural (adaptat de Gardner i Sutherland, 2004).



### 1.1.2 Anomalies cromosòmiques

Les anomalies cromosòmiques comprenen qualsevol modificació del nombre o de l'estructura dels cromosomes. Les anomalies cromosòmiques numèriques es generen normalment *de novo* com a resultat d'una mala segregació (no disjunció) durant el procés de gametogènesi dels progenitors. Si l'alteració afecta tots els cromosomes, és a dir, si tenim un nombre de cromosomes múltiple de 23, parlem de ploïdia (triploïdia, tetraploïdia, etc.), i utilitzem el terme aneuploïdia si l'alteració afecta només a un o uns quants parells de cromosomes (monosomia, trisomia, tetrasomia, etc.).

Les anomalies cromosòmiques estructurals són normalment heretades d'algun dels progenitors que és portador d'una anomalia cromosòmica equilibrada (sense guany ni pèrdua de DNA). Variants estructurals són les translocacions recíproques i Robertsonianes, les inversions paracèntriques i pericèntriques i les insercions. Altres alteracions són les duplicacions i les deficiències en les quals hi ha pèrdua o guany de DNA.

La majoria dels embrions amb anomalies cromosòmiques numèriques no són viables. Els embrions portadors d'aquestes anomalies poden arribar a la implantació i a l'inici del desenvolupament, però pocs arriben al naixement. L'única monosomia viable és la síndrome de Turner (45,X0), present en un de cada 5000 naixements. També hi ha algunes trisomies viables. La síndrome de Klinefelter (47,XXY) afecta un de cada 1000 nens nascuts, igual que les trisomies 47,XYY i 47,XXX. Les úniques trisomies autosòmiques viables són les dels cromosomes 21 (síndrome de Down), 18 (síndrome d'Edwards) i 13 (síndrome de Patau), amb freqüències d'un de cada 667, 6250 i 12048 nounats respectivament. La trisomia 21 és l'única que arriba a l'edat adulta; les altres dues tenen una mortalitat de més del 90% en els primers mesos de vida (Jacobs i Hassold, 1995).

Les anomalies cromosòmiques estructurals desequilibrades poden donar lloc a fallades d'implantació, avortaments de primer trimestre o naixements a terme, en funció del grau de desequilibri cromosòmic i del grau i tipus de pèrdua o guany de DNA.

En un estudi realitzat per Eiben et al. (1990) amb 750 avortaments espontanis, la anomalia més freqüent va ser la trisomia (62%), principalment dels cromosomes 16, 22 i 21, seguida de les triploïdies (12.4%), monosomies del X (10.5%), tetraploïdies (9.2%) i un 4.2% d'anomalies estructurals.

## 1.2 Citogenètica en cèl·lules germinals masculines

---

### 1.2.1 Meiosi masculina

---

#### 1.2.1.1 Alteracions de la meiosi masculina

---

La meiosi és la fase de l'espermatogènesi mitjançant la qual s'originen cèl·lules amb dotació cromosòmica haploide. Durant la meiosi, els espermatòcits primaris ( $2n$ ) es converteixen en espermàtides rodones ( $n$ ). És un procés cel·lular complex i consta de dues divisions cel·lulars sense replicació de DNA entre elles. La primera divisió meiótica es caracteritza per l'aparellament entre els cromosomes homòlegs que permet la recombinació genètica, i per la reducció del nombre de cromosomes que dona lloc a espermatòcits secundaris. A la segona divisió es produeix la separació de cromàtides que generen espermàtides rodones haploides.

Les anomalies meiótiques són alteracions del procés meiótic, i per tant limitades a la línia germinal, que no es poden detectar mitjançant estudis en cèl·lules somàtiques (cariotips). Les anomalies meiótiques afecten principalment el procés d'aparellament dels cromosomes homòlegs (sinapsi) (Hultén et al., 1990; Pearson et al., 1970). Usualment, es posen de manifest per la presència de regions cromosòmiques no aparellades en Profase I i per alteracions en el nombre de quiasmes que presenten els bivalents cromosòmics en metafase I.

Les anomalies meiótiques s'han relacionat amb mutacions d'un o més gens que codifiquen per productes específics de la meiosi (proteïnes dels elements dels complexos sinaptonemals, enzims de la recombinació, enzims de reparació DNA, etc.) (Edlemann et al. 1996; Hassold, 1996; Baarends et al., 2001; Judis et al., 2004), amb alteracions mecàniques del procés sinàptic i també amb la influència d'un ambient testicular anormal, especialment quan els nivells de la FSH són elevats (Mroz et al., 1999; Vendrell et al., 1999; Egozcue et al., 2000).

L'anàlisi de les divisions meiótiques de les cèl·lules espermatogèniques en biòpsies testiculars ha permès la caracterització i la classificació de les diferents anomalies meiótiques (revisat per Templado et al., 1981; Egozcue et al., 2005). Les anomalies descrites poden ser limitades o extenses, poden afectar un sol bivalent, alguns bivalents o la majoria, i produir asinapsi total o parcial de bivalents. També poden afectar totes les divisions meiótiques analitzades o poden coexistir amb una línia cel·lular normal. Les anomalies més freqüents són (revisat per Egozcue et al., 2005):

- i. Separació precoç dels cromosomes sexuals. Es deu a una reducció de la recombinació entre els cromosomes X i Y, que també està correlacionada amb una disminució en la freqüència de recombinació dels bivalents autosòmics.

- ii. Desinapsi total de bivalents de mida petita (grup G). El nombre de bivalents afectats sol variar segons les diverses cèl·lules estudiades i també segons els pacients que la presenten.
- iii. Desinapsi parcial de bivalents. Els bivalents afectats solen presentar una reducció en el nombre esperat de quiasmes. Els cromosomes implicats solen ser de mida mitjana però també s'ha descrit en bivalents cromosòmics de mida gran. Com en el cas anterior, hi ha variabilitat en el nombre de bivalents que poden estar afectats, en el nombre de cèl·lules amb anomalies i en els pacients afectats. És l'anomalia més freqüentment observada en pacients estèrils.
- iv. Desinapsi total de bivalents. És una anomalia molt poc freqüent i afecta la pràctica totalitat dels bivalents. Acostuma a anar acompanyada de fragmentació cromosòmica.

Les anomalies d'aparellament comprometen la continuïtat del procés meiòtic i poden donar lloc a bloqueigs més o menys dràstics de les línies cel·lulars afectades (fet que es traduirà en una azoospermia o una oligozoospermia greu), però també a la producció d'espermatozoides amb anomalies cromosòmiques derivats de línies cel·lulars capaces de completar el procés (Egozcue et al., 1983, Martin et al., 1996).

#### 1.2.1.2 Aplicació clínica de l'estudi de la meiosi

---

L'estudi de la meiosi va ser incorporat com una eina diagnòstica per al cribatge de l'esterilitat masculina en els anys 70 (Hultén et al. 1970; Pearson et al. 1970). Estudis meiòtics en biòpsia testicular en pacients estèrils han demostrat una incidència del 6% d'anomalies d'aparellament (Egozcue et al. 1983; De Braekeleer i Dao, 1991). Aquesta incidència augmenta fins al 17.5% en pacients amb oligoastenozoospermia greu i fins al 40% en pacients amb concentracions per sota de  $0.5 \times 10^6$  espermatozoides /ml. (Vendrell et al., 1999). Martin (1996) va evidenciar que molts homes estèrils amb cariotip normal presenten anomalies sinàptiques durant la meiosi que provoquen un bloqueig més o menys greu i la producció d'espermatozoides aneuploides.

Donat que els estudis de la meiosi poden aportar informació valuosa per establir un diagnòstic i la posterior orientació terapèutica, les anàlisis meiòtiques en teixit testicular s'inclouen com a prova diagnòstica en molts centres per a l'avaluació de l'esterilitat masculina.

#### 1.2.2 Citogenètica de l'espermatozoide

---

##### 1.2.2.1 Tinció cromosòmica diferencial

---

L'espermatozoide és una cèl·lula altament diferenciada i especialitzada, amb una funció molt específica que és transportar el complement cromosòmic masculí fins a l'òocit i, després de fecundar-lo, activar-lo per iniciar el desenvolupament de l'embrió. El nucli de l'espermatozoide té una organització molt particular, caracteritzada per un elevat grau de condensació de la seva cromatina que n'ha condicionat l'anàlisi.

En els anys 70 es van dur a terme els primers intents per detectar aneuploidies en l'espermatozoide humà. Barlow i Vosa (1970) van utilitzar quinacrina o mostassa de quinacrina per tenyir la regió

heterocromàtica del cromosoma Y, i van identificar com a disòmics pel cromosoma Y aquells espermatozoides que presentaven dos cossos fluorescents. Aquesta tècnica estimava uns percentatges molt elevats d'aneuploidies (Pawlowitzki i Pearson, 1972; Klasen i Schmid, 1981) que es van atribuir a senyals artefactuals (Beatty, 1977). Poc després, Bobrow et al. (1972) i Pearson (1972) van utilitzar altres tècniques indirectes per estimar aneuploidies espermàtiques tenyint la constricció secundària dels cromosomes 1 i 9 amb dificultats i limitacions semblants.

#### 1.2.2.2 Cromosomes d'espermatozoides

---

L'any 1978, Rudak et al. van descriure una tècnica que permetia una anàlisi directa de la constitució cromosòmica de l'espermatozoide humà mitjançant la fecundació *in vitro* interespecífica d'oòcits d'hàmsster sense zona pel·lúcida amb espermatozoides humans (Yanagimachi et al., 1976). Aquesta tècnica, estandarditzada per Martin et al., (1982), ha permès l'estudi d'anomalies numèriques i estructurals en els espermatozoides (Genescà et al., 1990; Martin et al., 1991; Templado et al., 1996). Tot i això és una tècnica complexa, laboriosa i poc útil en casos en què els espermatozoides són incapaços de penetrar els oòcits d'hàmsster. Tot això ha fet que aquesta tècnica s'hagi utilitzat cada cop menys en la rutina del criatge del factor masculí.

#### 1.2.2.3 Hibridació *in situ* fluorescent (FISH)

---

A mitjan anys 80 es van desenvolupar les tècniques d'hibridació *in situ* sobre espermatozoides (Joseph et al., 1984; Guttenbach i Schmid, 1990), i durant els anys 90 es va consolidar l'aplicació de protocols d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) sobre nuclis descondensats d'espermatozoides (Wyrobek et al., 1990; Vidal et al., 1993).

La metodologia de la FISH s'ha hagut de modificar lleugerament per a l'estudi dels espermatozoides a causa de l'elevat grau de compactació de la seva cromatina, que fa difícil l'accés de les sondes. Per això, s'ha aplicat un tractament de descondensació del nucli abans de la desnaturalització del DNA i la posterior hibridació amb les sondes corresponents (Vidal et al., 1993; Holmes i Martin, 1993; Bischoff et al., 1994).

En els primers estudis (Pieters et al., 1990; Guttenbach i Schmid, 1991) s'utilitzava una única sonda de DNA, cosa que feia impossible distingir entre espermatozoides disòmics i diploides, ja que la mida del diàmetre del nucli no és un bon paràmetre per diferenciar-ho. Va ser el fet de combinar diferents sondes de DNA i fluorocroms el que va permetre resoldre aquest inconvenient (Williams et al., 1993; Bischoff et al., 1994). També ha estat imprescindible establir uns criteris de valoració per eliminar la subjectivitat de l'investigador i uniformitzar els resultats (Goldman et al., 1993; Robbins et al., 1993). Des de llavors, l'aplicació de la FISH en nuclis descondensats d'espermatozoides ha suposat la millor alternativa per avaluar la constitució cromosòmica dels espermatozoides humans (Downie et al., 1997; Egozcue et al., 2003).

Diversos autors han fet estimacions de la incidència d'aneuploidies en espermatozoides d'homes fèrtils (Martin et al., 1993; Miharū et al., 1994; Spriggs et al., 1995; Blanco et al., 1996; Downie et al., 1997) per poder comparar-la amb la de diferents grups de pacients (pacients estèrils, pacients amb diferents tipus de càncer, individus exposats a certs tòxics, etc.). A la taula 1 es recullen les freqüències de diploidies i disomies per alguns cromosomes en pacients control

presentades per diversos autors. La incidència d'espermatozoides diploides en controls oscil·la entre 0.03% (Vegetti et al., 2000) i 0.35% (Downie et al., 1997). També hi ha una variació important en les disomies per als cromosomes sexuals dels espermatozoides dels grups control presentades, des de 0.13% (Vegetti et al., 2000) fins a 0.54% (Calogero et al., 2001a). Igualment trobem diferències en les freqüències de disomies dels mateixos autosomes en els estudis dels diversos autors. Per exemple, la disomia del cromosoma 18 en els grups control varia des de 0.06% (Vegetti et al., 2000) fins a 0.2% (Calogero et al., 2001a).

Aquesta variabilitat pot ser deguda a diferències interindividuais, però també a aspectes tècnics, com són els diferents protocols de descondensació, els diferents criteris de valoració o el nombre d'espermatozoides analitzats. Per això és important que cada laboratori tingui el seu propi control intern.

Taula 1. Resultats de l'anàlisi de FISH d'espermatozoides d'individus control segons diversos autors.

autor	n	disom.1	disom.13	disom.16	disom.18	disom.21	dis.sex.	diploid.
Miharu, 1994	9	0.14		0.17			0.21	0.18
Chevret, 1995	4	0.20					0.39	0.14
Spriggs, 1995	5	0.10			0.11		0.43	0.17
Guttenbach, 1997	6	0.12					0.23	0.05
Downie, 1997	6			0.06			0.19	0.35
Blanco, 1997	5				0.09		0.37	0.25
Pang, 1999	4		0.20		0.11	0.18	0.15	0.15
Colombero, 1999	23						0.46	0.24
Vegetti, 2000	13				0.06		0.13	0.03
Ushijima, 2000	10		0.09		0.13	0.19	0.38	0.16
Calogero, 2001a	13				0.20		0.54	0.05
Soares, 2001	9		0.10					0.18

A la taula 2 es presenta un resum de les dades publicades per diversos autors després d'analitzar els espermatozoides de pacients estèrils. El primer estudi realitzat amb FISH d'espermatozoides de pacients estèrils va ser el publicat per Miharu et al. (1994). Van estudiar la freqüència de diploidies y d'aneuploidies dels cromosomes 1, 16, 17, 18, X i Y de 12 homes estèrils i 9 homes fèrtils. Els autors no troben diferències en les taxes de diploidia, ni en les de disomies per als cromosomes analitzats entre el grup de pacients i el grup control, però no es tracta d'un grup de pacients homogeni, ja que alguns d'aquests pacients són oligozoospèrmics i altres presenten esterilitat de causa desconeguda. El mateix passa en un estudi presentat per Guttenbach et al. (1997), on l'autor no troba diferències en la taxa mitjana de diploidia entre 45 pacients, però sí que les troba en alguns pacients determinats quan les compara individualment (fins a 1.6%).

Pang et al.(1999) troben freqüències de diploidies comparables a les del nostre estudi en analitzar els espermatozoides de 9 pacients amb OAT (1.9%), freqüència significativament superior a la

del grup de donants fèrtils (0.15%). Igualment, Ushijima et al. (2000) troben diferències amb la taxa de diploïdia entre controls i pacients en un grup de 8 pacients amb OAT (0.16% versus 0.29%).

Vegetti et al.(2000) i Calogero et al. (2001a), en dos estudis amb pacients heterogenis, també troben diferències en la incidència d'espermatozoides diploides entre pacients i controls (per als controls 0.03% i 0.05%, respectivament i per als pacients 0.11% i 0.22%, respectivament).

La freqüència de disomies per als cromosomes sexuals varia entre el 0.27% i 2.57% en els grups de pacients. Miharu et al. (1994) no troben diferències entre controls i pacients (0.21% i 0.27%), però sí que les observen Pang et al. (1999), Colombero et al. (1999), Vegetti et al. (2000), Ushijima et al. (2000) i Calogero et al. (2001a).

Taula 2. Resultats de l'anàlisi de FISH d'espermatozoides de pacients estèrils segons diversos autors.

autor	n	disom.1	disom.13	disom.16	disom.18	disom.21	dis.sex.	diploid.
Miharu, 1994	12	0.13		0.16			0.27	0.23
Guttenbach, 1997	45	0.13					0.24	0.10
Pang, 1999	9		1.1-3.5		0-3.1	0.6-3.4	2.57	1.9
Colombero, 1999	24				0.60	1.2	0.64	0.75
Vegetti, 2000	15		0.23		0.22	0.29	0.58	0.11
Ushijima, 2000	8		0.13		0.12	0.24	0.59	0.29
Calogero, 2001a	19				0.39		0.91	0.22

Els resultats difereixen en funció del grup de pacients estudiats. Alguns d'aquests treballs estudien grups heterogenis de pacients amb diferents tipus d'esterilitat masculina. Estudis amb grups homogenis de pacients amb oligoastenozoospermia han demostrat, utilitzant la FISH, un augment en el percentatge de diploïdies i de disomies dels cromosomes sexuals i d'alguns autosomes (Moosani et al., 1995; Martin, 1998; Pfeffer et al., 1999; Pang et al., 1999; Vegetti et al., 2000; Bernardini et al., 2000).

Alguns autors han descrit també una relació entre la incidència de formes anormals i aneuploïdies espermàtiques (Calogero et al., 2001b). Rubio et al. (2001) observen una associació entre l'oligoastenozoospermia i un elevat percentatge d'aneuploïdies i diploïdies en els espermatozoides que resulta en baixes taxes d'embaràs en aquestes parelles. Tot i que alguns treballs no troben diferències entre la incidència d'aneuploïdies en homes estèrils i fèrtils (Miharu et al., 1994, Guttenbach et al., 1997), la majoria dels estudis publicats presenten una correlació inversa entre les aneuploïdies cromosòmiques i la concentració espermàtica (revisat per Egozcue et al.,1997).

### 1.3 Tècniques de reproducció assistida (TRA). La fecundació in vitro (FIV)

El primer naixement en mamífers fruit d'una fecundació in vitro (FIV) va ser descrit l'any 1959 (Chang, 1959), però no va ser fins a l'any 1978 que es va aconseguir el primer naixement en l'espècie humana



(Stephoe i Edwards, 1978). Des de llavors, s'han anat estandarditzant i protocolaritzant tots els processos implicats en la FIV i s'han introduït noves metodologies associades que han permès millorar els resultats i ampliar les indicacions de la tècnica.

Una d'aquestes metodologies és la microinjecció intracitoplasmàtica d'espermatozoide (ICSI) (Palermo et al., 1992), que ha permès tractar pacients amb factor masculí greu. Gràcies a la ICSI s'ha aconseguit el naixement de milers de nens procedents de fecundacions d'òcits per espermatozoides que mai haurien fecundat i fins i tot per espermatozoides procedents del testicle o de l'epidídim.

Una altra tècnica complementària de la FIV és el diagnòstic genètic preimplantacional (DGP); des de la seva incorporació als anys 90 (Handyside et al., 1990) ha permès evitar la transmissió de malalties genètiques, com algunes malalties monogèniques o malalties amb herència lligada al cromosoma X. També s'està utilitzant el DGP per evitar la transmissió d'anomalies cromosòmiques estructurals o per al cribatge d'aneuploidies a fi d'intentar augmentar les taxes d'embaràs i disminuir les taxes d'avortament en pacients de mal pronòstic.

### 1.3.1 Microinjecció intracitoplasmàtica d'espermatozoide (ICSI)

#### 1.3.1.1 Risc genètic de la ICSI

La microinjecció intracitoplasmàtica d'un espermatozoide (ICSI) ha esdevingut el mètode d'elecció per excel·lència per al tractament de l'esterilitat masculina. El primer embaràs aconseguit mitjançant aquesta tècnica va tenir lloc l'any 1991, i el primer naixement va ser descrit per Palermo et al. l'any 1992.

Els primers estudis de seguiments d'embarassos, naixements i nens nascuts mitjançant aquesta tècnica van revelar que la ICSI no suposava un augment en el percentatge d'anomalies dels nens nascuts (Govaerts et al., 1998). Però, a mesura que van anar apareixent estudis més amplis, diversos autors van presentar increments en el percentatge d'anomalies cromosòmiques (In't Veld et al., 1995; Bonduelle et al., 2002a) i en el percentatge d'anomalies congènites (Wennerholm et al., 2000a; Ludwig i Katalinic, 2002) en els fetus i nens nascuts.

Hi ha dos tipus diferents de risc de la ICSI; els que depenen directament del procediment i els que depenen de la pròpia població estèril tractada (Patrizio et al., 1995; Kurinczuk et al., 2003).

Dins del primer grup trobem el risc produït pels trastorns físics i bioquímics provocats en el ooplasma o en el fus meiótic de l'òcit (Tesarik, et al., 1995; Wang et al., 2001a), errors en la selecció de la zona d'injecció (deguts a la variabilitat de localització de la placa metafàsica (Hardasson et al., 2000; Wang et al., 2001b) o, per últim, el risc d'injectar contaminants externs.

Alguns autors han suggerit que l'estrès que suposa la ICSI per a l'òcit podria estar afectant el procés d'*imprinting*, especialment vulnerable a l'estrès físic i químic (Young et al., 2001). La síndrome d'Angelman, la síndrome de Prader-Willi o la de Beckwith-Wiedemann estan provocades per anomalies en els processos de metilació i *imprinting* dels cromosomes 15 i 11 (Surani et al., 2002). Alguns casos de nens nascuts amb defectes d'*imprinting* han fet qüestionar la relació entre aquestes síndromes i no només la ICSI (Cox et al., 2002) sinó també la FIV en general

(DeBaun et al., 2003). Chang et al., (2005) relacionen també l'estimulació ovàrica o la pròpia causa d'esterilitat amb la síndrome de Beckwith-Wiedemann. Altres estudis no han trobat cap relació entre la ICSI i els errors d'*imprinting* (Manning et al., 2000). Hem de tenir en compte que aquestes síndromes són excepcionalment rares, per tant es necessiten estudis de seguiment molt amplis per esbrinar si realment aquesta relació existeix o no.

En el grup de riscos depenents de la població tractada s'inclouen tots aquells que tenen un origen gènic o genètic relacionat amb l'esterilitat masculina. S'han trobat mutacions del gen DAZ (deleció a azoospermia en el cromosoma Y), en alguns casos d'homes amb azoospermia o oligozoospermia greu (Vogt et al. 1998). Aquest locus és gran i conté gens implicats en el desenvolupament i manteniment de les cèl·lules germinals masculines (McElreavey i Krausz, 1999; Foresta et al., 2001). Les microdeleccions en aquesta regió estan associades a l'esterilitat masculina i es calcula que el 10-15% dels pacients amb azoospermia i oligozoospermia greu les presenten (McElreavey i Krausz, 1999). En utilitzar espermatozoides d'aquests homes per dur a terme la ICSI, estarem generant descendència masculina portadora d'aquestes deleccions.

S'han descrit algunes malalties genètiques associades a l'esterilitat masculina, com és el cas de la fibrosi quística i l'absència congènita de conductes deferents (ABCD). L'ABCD és una forma moderada de fibrosi quística en homes sans (Chillon et al. 1995). Donada l'alta freqüència de la mutació del gen de la fibrosi quística a la població general (4%), és necessari fer un cribatge a ambdós membres de la parella i donar consell genètic a les parelles incloses en un programa de FIV-ICSI per ABCD (Silber et al., 1995).

Un dels riscos més evidents és la possibilitat d'obtenir embrions anormals després de la injecció d'espermatozoides cromosòmicament anormals. Diversos autors han demostrat un increment d'anomalies cromosòmiques en els espermatozoides de pacients amb OA greu (Pang et al., 1999; Pfeffer et al., 1999; Vegetti et al., 2000; Calogero et al., 2001a, Pang et al., 2005). Igualment, pacients portadors d'anomalies estructurals poden produir espermatozoides desequilibrats (Templado et al., 1990; Blanco et al., 1998). En ambdós casos, la utilització d'aquests espermatozoides per a la microinjecció intracitoplasmàtica pot originar un nombre més elevat d'embrions anormals que poden provocar fallades d'implantació, avortaments espontanis o naixements de nens amb anomalies cromosòmiques, tal com han demostrat alguns estudis en diagnòstic prenatal, evidenciant un augment de les anomalies cromosòmiques en embarassos obtinguts mitjançant la ICSI (In't Veld et al., 1995; ESHRE Task Force, 1998; Bonduelle et al., 2002a).

### 1.3.1.2 Seguiment dels embarassos i nens nascuts mitjançant la ICSI

---

La majoria dels estudis de seguiment dels nens d'ICSI distingeixen entre anomalies cromosòmiques i anomalies congènites o malformacions.

Ja a l'any 1995, In't Veld et al. van presentar un increment en les anomalies dels cromosomes sexuals en els diagnòstics prenatals d'una sèrie petita (n:15) d'embarassos procedents d'ICSI. El mateix any, Liebaers et al. (1995) presenten una incidència d'anomalies en els cromosomes sexuals de l'1%, significativament més alta que en les concepcions espontànies (0.3-0.4%, Jacobs et al., 1992). Bonduelle et al. (1995) no troben diferències en estudiar

els cariotips prenatals de 130 embarassos procedents d'ICSI i 130 procedents de FIV convencional, ni tampoc en ampliar la sèrie a 293 cariotips estudiats (Bonduelle et al., 1996). Posteriorment, la mateixa autora va presentar un increment en les anomalies cromosòmiques trobades en 1586 diagnòstics prenatals d'ICSI, increment que estava relacionat amb la concentració i mobilitat espermàtica del progenitor (Bonduelle et al., 2002a). La freqüència de cariotips anormals és del 3%: l'1.6% són anomalies *de novo* i l'1.4% són heretades. Aquest percentatge d'anomalies heretades s'explica si tenim en compte que estudis citogenètics en sang perifèrica han demostrat un increment de la freqüència d'anomalies cromosòmiques en els pacients candidats a ICSI (Meschede et al., 1998).

Els primers treballs de seguiment de nens nascuts procedents d'ICSI no van trobar un augment en les anomalies congènites (Bonduelle et al., 1995; 1996), tot i que, poc després, alguns autors van presentar un percentatge més elevat (Aytoz et al., 1998, Ludwig i Katalinic, 2002). Sembla ser que aquest increment s'observa si el comparem amb la població general, però no si el comparem amb els nens nascuts mitjançant la FIV convencional (Bergh et al., 1999; Hansen et al., 2000; Ludwig i Diedrich, 2002). Bonduelle et al., (2002b) comparen 2889 nens d'ICSI amb 2995 nens de FIV i no troben diferències en el seguiment mèdic. Fent un seguiment a llarg termini a l'edat de 5 anys, tampoc troben diferències al comparar un grup amb 266 nens procedents d'embarassos espontanis (Bonduelle et al., 2004).

Recentment, la mateixa autora ha presentat el seguiment de més de 1500 nens (540 nens d'ICSI, 437 de FIV i 538 d'embaràs espontani) també als 5 anys i troba un increment en les malformacions menors, tant en els nens d'ICSI com en els de FIV, respecte als de concepció natural, i aquest increment és més gran quan els nens tenen 5 anys. També observa un augment de les malformacions majors degut a un increment dels defectes de l'aparell urogenital en el grup de nens respecte al de nenes d'ICSI i respecte al grup control. De nou indicaria un efecte causat per factors paterns genètics i no per la tècnica en si mateixa (Bonduelle et al. 2005).

Alguns autors han estudiat l'evolució de l'embaràs i dels nens nascuts en funció de l'origen dels espermatozoides utilitzats per a la ICSI (ejaculat, epidídim o testicular) i de la seva qualitat. Aytoz et al. (1998) presenten una mortalitat intrauterina més gran quan la mostra de semen és de baixa qualitat. En canvi, la majoria dels autors no troben diferències en funció de la qualitat de la mostra ni de l'origen dels espermatozoides (Wennerholm et al., 2000b; Ludwig i Katalinic, 2003). Bonduelle et al. (2002a) únicament troben diferències en les malformacions dels nens quan el percentatge d'espermatozoides mòbils és inferior al 50%, i amb un estudi posterior no troben relació entre l'oligozoospermia i les malformacions majors ni menors (Boundelle et al., 2005).

La discordància entre els estudis dels diversos autors s'explica perquè és difícil fer un seguiment homogeni durant molts anys d'un número elevat de nens, sobretot dels grups control. Sovint la metodologia no és la mateixa i els grups no són comparables. És necessari fer estudis multicèntrics per estudiar grups grans, i això fa que, quant a la descripció de les diferents malformacions, hi pugui haver diferències entre pediatres, o fins i tot en altres aspectes que poden produir un biaix, com ara l'entorn sociocultural del nen. Aquest és un debat encara per resoldre que necessitarà del seguiment d'aquests nens durant més anys.

És important tenir en compte, a l'hora d'analitzar les dades, que moltes de les complicacions obstètriques i perinatals són derivades dels embarassos múltiples (prematunitat, baix pes, mortalitat perinatal, etc.). Aquestes complicacions no es poden adjudicar a la ICSI o a la FIV per se, sinó a la transferència de massa embrions que incrementa el risc d'embaràs múltiple i de les seves conseqüències (Bergh et al., 1999; Bonduelle et al., 2005).

### 1.3.2 Diagnòstic genètic preimplantacional (DGP)

El DGP es va introduir a principis dels anys 90, per evitar haver d'interrompre embarassos de fetus afectats per determinats defectes genètics en parelles d'elevat risc genètic. A partir de l'anàlisi d'una sola cèl·lula d'un embrió es pot diagnosticar si és portador d'una determinada malaltia genètica o d'una anomalia cromosòmica i, d'aquesta manera, es poden seleccionar quins són els embrions aptes per a la transferència.

La primera aplicació del DGP va ser per a la selecció d'embrions mitjançant sexat en pacients portadores de malalties lligades al cromosoma X (Handyside et al., 1990). Es va seleccionar els embrions mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) de seqüències del cromosoma Y i es va aconseguir gestacions amb la transferència d'embrions femenins.

Des de llavors, el DGP mitjançant la PCR, s'ha utilitzat també per al diagnòstic de malalties monogèniques (Sermon et al., 2005). Poc després, la hibridació in situ fluorescent (FISH) es va implantar com a mètode d'elecció per el DGP per sexat d'embrions (Griffin et al., 1992) i per altres casos d'alt risc genètic com la detecció d'anomalies numèriques o estructurals (Munné et al., 2000).

Un segon grup d'indicacions del DGP comprèn aquells casos que, sense tenir un alt risc genètic, poden beneficiar-se del DGP per millorar els resultats de la FIV. Es tracta de l'anomenat DGP per *screening* d'aneuploidies (DGP-AS) en pacients de mal pronòstic. Actualment s'està fent un cribatge d'aneuploidies per a un màxim de 9 cromosomes diferents en els embrions de determinats grups de pacients. Poden ser candidates al DGP-AS les pacients avortadores de repetició (Vidal et al., 1998; Rubio et al., 2003), les dones d'edat avançada (Gianaroli et al., 1999; Munné et al., 1999; Kuliev et al., 2002), o les que presenten fallades d'implantació (Gianaroli et al., 2001). Tot i que, en alguns casos, els resultats sobre la veritable utilitat de la tècnica continuen generant controvèrsia (Munné et al., 2003; Staessen et al., 2004, Gianaroli et al., 2005).

De fet, el DGP-AS ha esdevingut l'aplicació més estesa de DGP degut al gran potencial de grups de pacients que es poden beneficiar de la tècnica (Sermon et al., 2004).

#### 1.3.2.1 Diagnòstic genètic preimplantacional per esterilitat de causa masculina

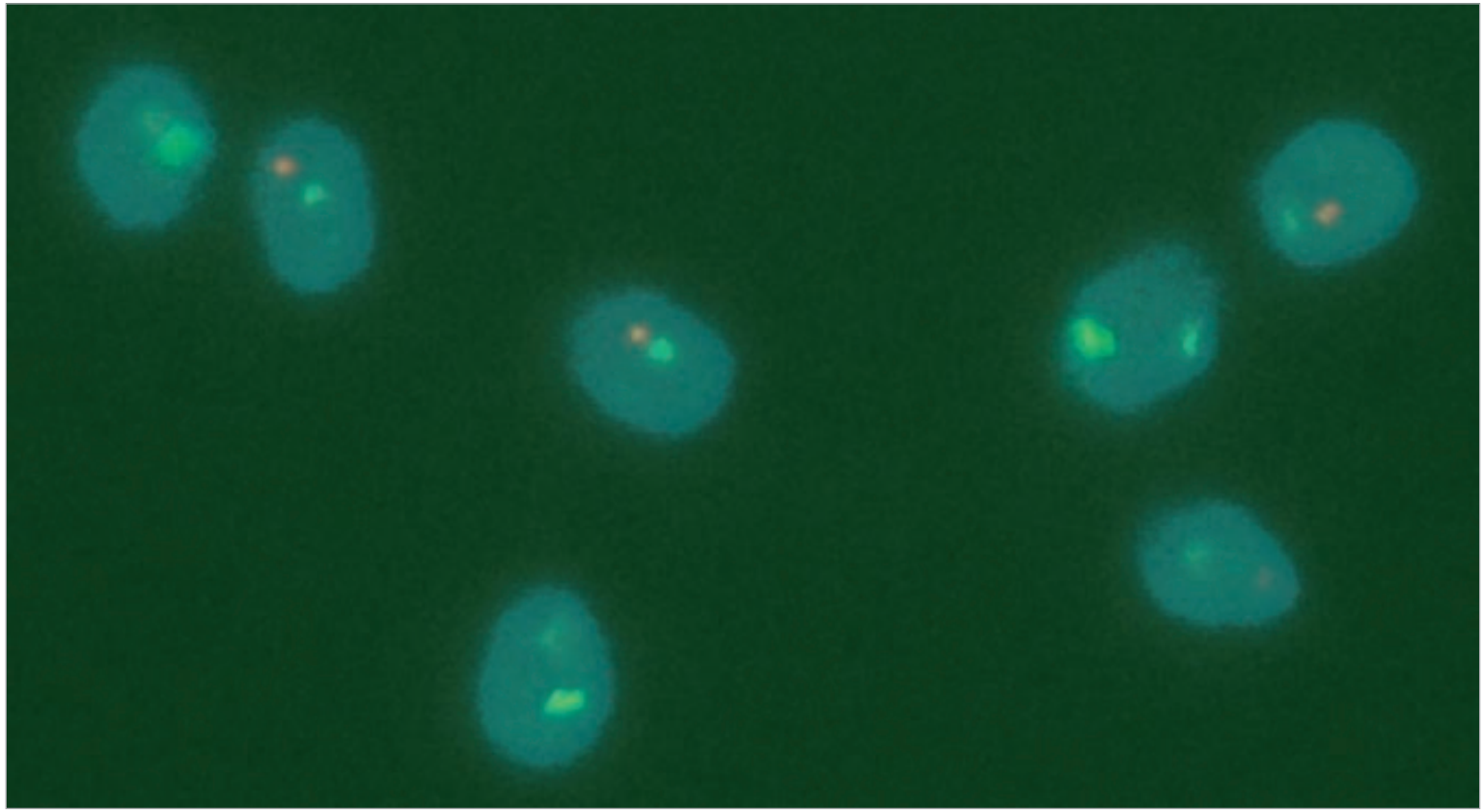
En els últims anys, alguns autors han suggerit realitzar DGP a les parelles amb factor masculí greu. S'han publicat resultats de DGP en pacients amb la síndrome de Klinefelter (Staessen et al., 1996; Reubinoff et al., 1998; Kahraman et al., 2003; Staessen et al., 2003) i en pacients amb mosaïcismes per als cromosomes sexuals (Magli et al., 2002).

Staessen et al. (2003) presenten els resultats de 32 cicles de DGP en pacients amb la síndrome de Klinefelter (47,XXY) i 88 cicles de DGP per selecció de sexe com a grup control. El percentatge d'embrions anormals (46%) és significativament diferent al del grup control (22.8%). Kahraman et al. (2003) mostren un percentatge similar d'embrions anormals (39.1%) en 8 cicles de DGP també en pacients 47,XXY. És més elevat el percentatge d'embrions anormals observat per Magli et al. (2002)(63%) que diagnostiquen 295 embrions de parelles amb mosaïcismes dels gonosomes. Aquest percentatge baixa fins al 53% quan és l'home el que presenta el mosaïcisme, enfront d'un 67% quan és la dona.

Pel que fa a la incidència d'aneuploides per als cromosomes X i Y, Staessen et al. (2003) les observen en un 13.2% dels embrions de pacients amb la síndrome de Klinefelter, mentre que Magli et al. (2002) presenten una incidència més baixa (3.7%) en pacients amb mosaïcismes per aquests cromosomes.

Altres autors han proposat també utilitzar el DGP en casos en què s'ha de recórrer a espermatozoides testiculars (TESE) o d'epidídim (MESE) per tal de dur a terme la ICSI (Gianaroli et al., 2002; Silber et al., 2003), evidenciant elevats percentatges d'embrions anormals i mosaics. Kahraman et al. (2004) també presenten una incidència elevada d'embrions anormals (37-46%) quan apliquen el DGP en casos de teratozoospermia total.

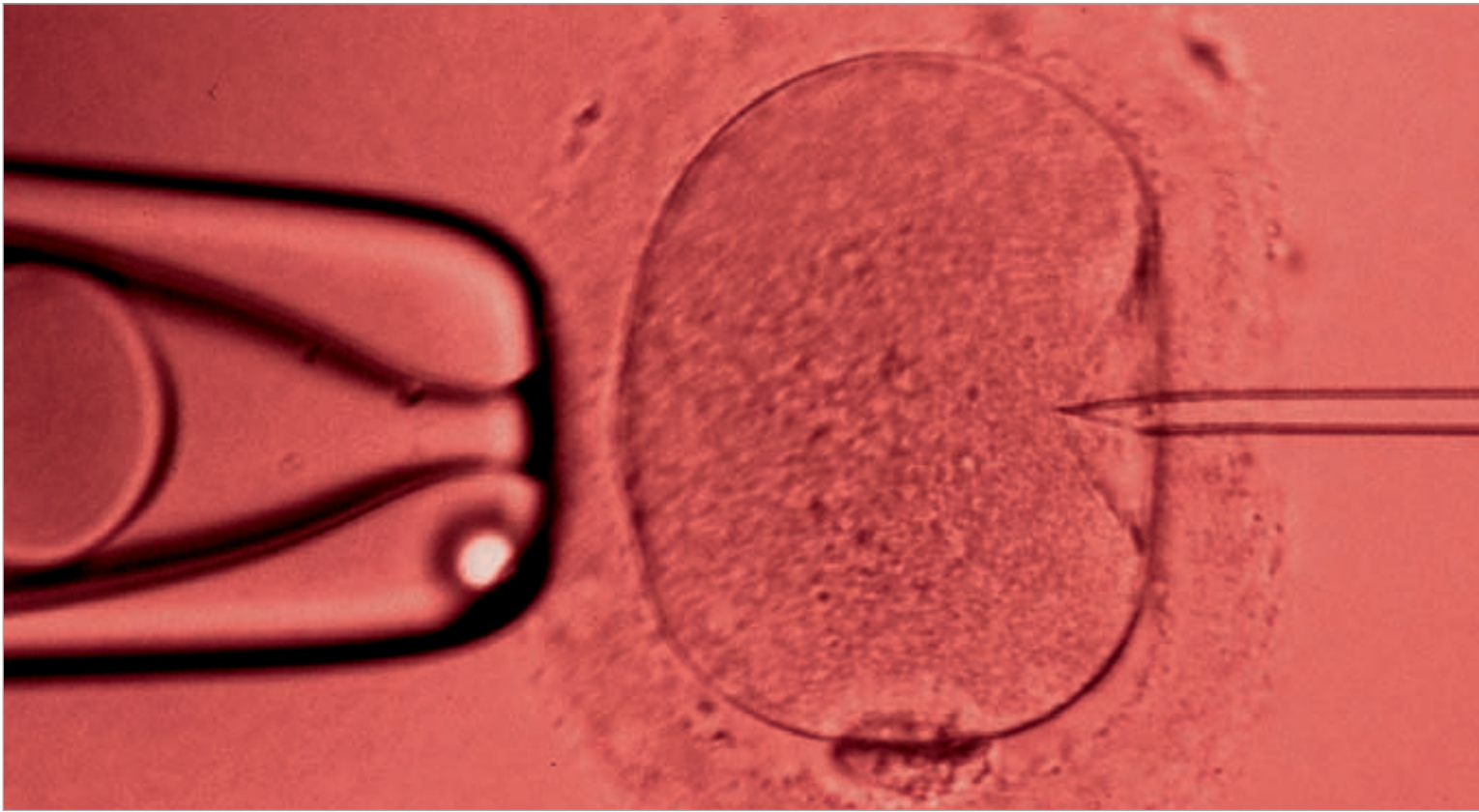
Els pacients que presenten anomalies meiótiques també es podrien beneficiar del DGP-AS. Són pacients que produeixen un percentatge elevat d'espermatozoides anormals i que produiran un nombre més elevat d'embrions amb anomalies cromosòmiques. Estaria indicat analitzar aquests embrions mitjançant una biòpsia embrionària i transferir únicament els embrions cromosòmicament normals per intentar augmentar les possibilitats d'embaràs i disminuir el risc d'avortament.



● ○ 02 · objectius

Els objectius que es van plantejar en aquest treball són els següents:

1. Analitzar la freqüència d'anomalies cromosòmiques, mitjançant hibridació in situ fluorescent (FISH), en els espermatozoides de pacients amb astenozoospermia i oligoastenozoospermia.
2. Valorar el resultat clínic dels cicles de FIV-ICSI en pacients amb oligoastenozoospermia greu en funció de les anomalies meiòtiques que presenten.
3. Analitzar la incidència d'anomalies cromosòmiques en embrions procedents de pacients amb anomalies en la meiosi masculina.
4. Avaluar la contribució del DGP a la millora dels resultats dels cicles de FIV-ICSI en pacients amb alteracions de la meiosi masculina.



● ○ 03 · resum de material i mètodes



### 3.1 Població estudiada

---

La població estudiada correspon a sèries seleccionades de parelles estèrils que van dur a terme un o més cicles de fecundació in vitro (FIV) per factor masculí en el Servei de Medicina de la Reproducció de l'Institut Universitari Dexeus durant el període 1998-2003.

Tots els pacients van firmar consentiments informats de les diferents tècniques a què van ser sotmesos.

### 3.2 Estudi del pacient estèril

---

#### 3.2.1 Seminograma

---

Les mostres de semen van ser recollides per masturbació en un pot estèril, després de 3-5 dies d'abstinència ejaculatòria. Tots els seminogrames van ser realitzats mitjançant la metodologia de fotografia per exposició múltiple descrita per Makler (1978), que determinen els paràmetres espermàtics següents: concentració espermàtica, mobilitat espermàtica, velocitat mitjana, distància efectiva mitjana i índex de direccionalitat.

#### 3.2.2 Cariotip

---

Es va realitzar un cariotip en sang perifèrica a tots els pacients inclosos al estudi.

#### 3.2.3 Biòpsia testicular i estudi de la meiosi

---

Es va realitzar una biòpsia diagnòstica testicular unilateral sota anestèsia local a tots els pacients inclosos en els estudis corresponents als articles 2 i 3, i als pacients de l'article 1 en els quals estava indicat segons el protocol d'estudi de l'esterilitat masculina de l'Institut Universitari Dexeus (Vendrell et al., 1999).

El material testicular es va recollir en solució isotònica (0.9% Na Cl) i es va processar segons Egozcue et al., (1983), basant-se en la tècnica d'Evans et al.(1964).

Es van avaluar els estadis meiòtics, el recompte de quiasmes i la caracterització meiòtica segons els criteris estàndard (revisats per Hultén et al., 2001 i Egozcue et al., 2000), i les anomalies meiòtiques es classificaren segons Templado et al., (1981). Totes les preparacions van ser analitzades per dos observadors.

#### 3.2.4 Hibridació in situ fluorescent (FISH) en espermatozoides

---

Les mostres de semen van ser preparades mitjançant gradients de densitat (PureSperm; IVF Science AB, Göteborg)(Ord et al., 1990). Es van fixar els pellets amb metanol: àcid acètic (3:1) i es van processar per la FISH. Els detalls de fixació, descondensació nuclear i FISH van ser descrits per Vidal et al. (1993).

Per dur a terme la FISH es van utilitzar sondes centromèriques per al cromosoma X (Xp11.1-q11.1, Spectrum Green), Y (Yp11.1-q11.1, Spectrum Orange) i 18 (18p11.1-q11.1, Spectrum Aqua) (AneuVysion Assay, Vysis, Inc.). La valoració s'ha fet segons criteris descrits per Blanco et al. (1996).

### 3.3 Cicle de fecundació in vitro (FIV)

---

#### 3.3.1 Inducció de l'ovulació i punció fol·licular

---

Les pacients van rebre agonistes de l'hormona alliberadora de gonadotrofines (GnRH) en combinació amb gonadotrofina menopàusica humana (HMG) i/o hormona fol·licle estimulant (FSH) en dosis variables com a tractament inductor de l'ovulació (Barri, 1993). Les dosis hormonals es van ajustar individualment d'acord amb la resposta ovulatòria de la pacient, que va ser monitoritzada mitjançant analítiques hormonals i ecografies transvaginals.

Es van recuperar els oòcits mitjançant punció transvaginal ecoguiada 36 hores després de l'administració d'HCG, seguint el protocol del nostre centre (Carreras et al., 1994).

#### 3.3.2 Preparació de mostres de semen

---

Totes les mostres de semen es van preparar utilitzant gradients discontinus (Pure Sperm; Nidacon, Göteborg, Suècia)(Ord et al., 1990), ajustant el volum de gradient i el temps de centrifugació a les característiques de cada mostra.

#### 3.3.3 Microinjecció intracitoplasmàtica (ICSI)

---

Els oòcits recuperats van ser denudats de les cèl·lules del *cumulus oophorus* i de la *corona radiata* enzimàticament mitjançant una solució de 80 UI d'hialuronidasa (Hyase; Vitrolife, Göteborg, Suècia). Es van microinjectar únicament els oòcits en metafase II. Per a la microinjecció, s'aspira un espermatozoide morfològicament normal prèviament immobilitzat en polivinilpirrolidona (PVP) amb una pipeta d'injecció. Es subjecta l'oòcit mitjançant una pipeta de succió o *holding*. Es passa la pipeta d'injecció a través de la zona pel·lúcida i de la membrana de l'oòcit, i es diposita l'espermatozoide en el citoplasma després d'haver comprovat el trencament de la membrana amb una lleu aspiració (Calderón et al., 1995).

#### 3.3.4 Cultiu i transferència embrionària

---

Entre 16 i 20 hores després de la ICSI (dia 1), es va valorar la presència dels signes de fecundació, dos pronuclis i dos corpuscles polars. Al dia següent (dia 2), es va valorar el desenvolupament embrionari i es van transferir de 1 a 3 embrions, en funció de l'edat de la pacient i de la qualitat embrionària. La transferència es va dur a terme sota control ecogràfic, segons el protocol habitual del nostre laboratori (Coroleu et al., 2000).

Els embrions restants que presentaven un bon ritme de divisió i un percentatge de fragmentació per sota del 30% van ser criopreservats en dia 3 de desenvolupament, segons el protocol de Lassalle et al. (1985).

### 3.3.5 Fase lútia

---

El suport de la fase lútia es va dur a terme amb progesterona vaginal 600 mg/dia (Utrogestan; Seid, Barcelona, Espanya) durant 10 dies, o amb hCG 2500 UI (Profasi, Serono, Madrid, Espanya) els dies 2, 4 i 6 després de la punció fol·licular.

Es va determinar la concentració de  $\beta$ hCG sèrica els dies 12 i 21 després de la transferència i es va confirmar l'embaràs mitjançant una ecografia a les 6 setmanes d'amenorrea per detectar sac gestacional i batec fetal.

## 3.4 Protocol de DGP

---

### 3.4.1 Biòpsia embrionària i fixació

---

En tots els casos en que es va fer DGP, les biòpsies embrionàries es van realitzar en dia 3. Cada embrió es va manipular individualment en medi EB (Vitrolife, Göteborg, Suècia) sota oli mineral (Ovoil; Vitrolife, Göteborg, Suècia). Es va perforar la zona pel·lúcida (diàmetre 25 $\mu$  aproximadament) mitjançant un sistema làser (Fertilase, Octax MTG) (Boada et al., 1998). Es van aspirar un o dos blastòmers de cada embrió (Parriego et al., 2003) mitjançant una pipeta de vidre (Humagen; Charlottesville, USA) i es van fixar sobre un portaobjectes segons el mètode de Tarkowski (1966) lleugerament modificat (Santaló et al., 1986).

### 3.4.2 Hibridació in situ de fluorescència (FISH)

---

Els blastòmers fixats van ser processats per criatge d'aneuploidies. En la primera ronda d'hibridació es van utilitzar sondes específiques per la valoració dels cromosomes 13 (LSI 13, 13q14, locus RB1, Spectrum Red), 16 (CEP 16, locus D16Z3, Spectrum Aqua), 18 (CEP 18, locus D18Z1, Spectrum Blue), 21 (LSI 21, 21q22.13-21q22.2, loci D21S259, D21S341, D21S342, Spectrum Green) i 22 (LSI 22, 22q11.2, locus bcr, Spectrum Gold) (MultiVysion PB Multi-color Probe Panel, Vysis Inc.) En la segona ronda de FISH es van aplicar sondes específiques per als cromosomes X (CEP X, locus DXZ1, Spectrum Orange) i Y (CEP Y, locus DYZ1, Spectrum Aqua) (Vysis Inc). El protocol de FISH i els criteris de valoració utilitzats han estat adaptats dels descrits per Vidal et al. (1998), d'acord amb les sondes de DNA utilitzades.

### 3.4.3 Cultiu i transferència embrionària

---

Els embrions es van mantenir en cultiu fins al dia 5, en què es van transferir un màxim de dos embrions diagnosticats com a cromosòmicament normals per a les sondes estudiades. Els embrions normals supernumeraris van ser criopreservats en estadi de blastòcit (Menezes i Veiga, 1997).

El suport de la fase lútia i el diagnòstic de l'embaràs van ser els mateixos que en l'apartat 3.3.5.

### 3.5 Anàlisi estadística

---

S'ha utilitzat el test de la chi-quadrat per a l'estudi comparatiu entre grups en el treball d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides, i per comparar les taxes de fecundació, embaràs, implantació i avortament segons el patró meiòtic.

Els resultats relatius a taxes d'embaràs, implantació i avortament en cicles de DGP es van avaluar mitjançant el test de la F de Fisher.

En tots els casos es va utilitzar el programa SPSS (SPSS, Inc, Chicago, Estats Units), amb un nivell de significació inferior a 0.05.



● ○ 04 · resultats

#### 4.1 Freqüència d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides de pacients estèrils

L'objectiu de l'article 1 va ser avaluar la freqüència d'anomalies cromosòmiques en els espermatozoides de pacients amb astenozoospermia (AS) i amb oligoastenozoospermia (OAT). Es va analitzar el percentatge d'espermatozoides portadors dels cromosomes X i Y, de disomies per als cromosomes sexuals, de disomies per al cromosoma 18 i d'espermatozoides diploides

Es van analitzar 9373 espermatozoides de 19 pacients estèrils (14 amb oligoastenoteratozoospermia (OAT) i 5 amb astenozoospermia (AS)) mitjançant FISH amb sondes centromèriques de DNA per aquests tres cromosomes. Els resultats es van comparar amb un grup control format per 5 donants amb cariotip i paràmetres seminals normals, dels quals es van analitzar més de 50.000 espermatozoides (Blanco et al., 1997). Es va observar una alta variabilitat en la incidència d'aneuploidies entre individus que no estava relacionada amb els paràmetres espermàtics. Els resultats de cada pacient individualment, així com els paràmetres seminals més importants, es presenten a la taula 3.

Taula 3. Paràmetres espermàtics i incidència d'aneuploidies dels cromosomes 18, X i Y i de diploidies en els espermatozoides de 19 pacients estèrils..

Pac.	Edat	Diag.	Cont.*	Mòb.*	Progr.*	Hapl.X	Hapl.Y	Dis.Sex.	Dis.18	Dipl.	Altres**	Total
1	34	OAT	0.4	0.2	0	100	97	2	-	4	3	206
2	32	OAT	0.02	0.01	0	91	99	2	-	3 <sup>†</sup>	3	198
3	35	OAT	3.1	0.3	0	313	292	9 <sup>†</sup>	1	35 <sup>†</sup>	6	656
4	48	OAT	1.9	0.3	0.17	116	109	3	-	3 <sup>†</sup>	2	233
5	40	OAT	11.8	0.2	0	495	480	4	-	8 <sup>†</sup>	8	995
6	37	OAT	1.1	0.3	0.13	170	147	1	-	1	-	319
7	37	OAT	8.0	2.0	0	110	114	3	-	-	-	227
8	40	OAT	2.0	0.2	0.03	226	218	3	-	1	2	450
9	33	OAT	6.4	2.8	1.14	220	229	1	-	-	-	450
10 <sup>‡</sup>	37	OAT	1.36	0.16	0	205	198	1	1	1	6	412
11 <sup>‡</sup>	37	OAT	0.7	0.3	0.05	230	274	2	-	-	7	513
12 <sup>‡</sup>	33	OAT	4	0.69	0.24	534	502	5	2	13 <sup>†</sup>	14	1070
13 <sup>‡</sup>	34	OAT	0.03	0.02	0	172	104	5 <sup>†</sup>	-	1	23	305
14 <sup>‡</sup>	28	OAT	0.93	0.03	0	249	222	1	-	-	33	505
15	44	AS	19	0.9	0	463	470	3	-	7 <sup>†</sup>	4	947
16	39	AS	20.7	0.9	0	525	518	2	-	6	9	1060
17	39	AS	82.0	10.0	0	189	189	2	-	1	-	381
18	43	AS	20.66	2.5	0.89	123	107	-	-	1	-	231
19	37	AS	40.41	12.49	4.68	109	104	1	-	1	-	215

\* espermatozoides x 10<sup>6</sup>/ml

\*\* espermatozoides no hibridats i nul·lisòmics

† p<0.05 (comparant amb controls)

‡ pacients amb anomalies meiòtiques

L'avaluació dels resultats agrupats segons el diagnòstic seminològic (OAT o AS) i comparats amb els del grup control es mostra a la taula 4.

Taula 4. Resultats de l'anàlisi de FISH en els espermatozoides de 14 pacients amb OAT i 5 pacients amb AS.

	Control	Grup OAT		Grup AS	
	%	n (%)	p	n (%)	p
Haploides X	50.29	3231 (49.41)	n.s.	1409 (49.72)	n.s.
Haploides Y	48.99	3085 (47.18)	n.s.	1388 (18.98)	n.s.
Disomies sexuals	0.37	42 (0.64)	<0.01	8 (0.28)	n.s.
Disomia 18	0.09	4 (0.06)	n.s.	0 (0)	n.s.
Diploides	0.25	70 (1.07)	<0.01	16 (0.56)	<0.01
Altres	0	107 (1.64)		13 (0.46)	
Total		6539		2834	

n.s.: no significatiu

No s'observen diferències significatives en el percentatge d'espermatozoides haploides per al cromosoma X (49.41% i 49.72%) i per al cromosoma Y (47.18% i 48.98%) en cap dels dos grups respecte al grup control (50.29% i 48.99%). La sex-ratio es manté dins de la proporció 1:1 esperada. Tampoc es troba un increment en la incidència d'espermatozoides disòmics pel cromosoma 18. S'observen diferències estadísticament significatives en la freqüència d'espermatozoides amb disomies per als cromosomes sexuals en el grup de pacients amb OAT (0.64% versus 0'37%;  $p < 0.01$ ). El percentatge d'espermatozoides diploides és significativament superior al del grup control (0.25%), tant en el grup de pacients que presenten OAT (1.07%) com en el grup de pacients amb AS (0.56%) ( $p < 0.01$ ).

Taula 5. Resultats de l'anàlisi de FISH en espermatozoides de 5 pacients amb anomalies meiótiques.

	Control	Anomalies meiótiques	
	%	n (%)	p
Haploides X	50.29	1390 (49.55)	n.s.
Haploides Y	48.99	1300 (46.35)	n.s.
Disomies sexuals	0.37	14 (0.50)	n.s.
Disomia 18	0.09	3 (0.11)	n.s.
Diploides	0.25	15 (0.53)	<0.01
Altres	0	83 (2.96)	
Total		2805	

n.s.: no significatiu

Si considerem tan sols els pacients que presenten alteracions de la meiosi (n=5), només difereix el percentatge d'espermatozoides diploides si el comparem amb el grup control (0.53% versus 0.25%; p<0.01). Les dades es mostren a la taula 5.

#### 4.2 Relació entre les anomalies meiòtiques dels pacients amb oligoastenozoospermia greu i els resultats dels cicles de FIV-ICSI

En l'article 2 es van analitzar retrospectivament els resultats de 224 cicles de FIV-ICSI per factor masculí greu realitzats en 137 parelles. Tots els pacients presentaven OAT (<1.5 x 10<sup>6</sup> espermatozoides mòbils/ml) i tots ells havien estat sotmesos a una biòpsia testicular amb estudi de la meiosi. Aquests pacients es van classificar en tres grups en funció del resultat de l'estudi meiòtic: grup A: meiosi normal; grup B: bloqueig parcial de la meiosi; grup C: anomalies sinàptiques.

A la taula 6 es presenten les característiques generals de les parelles i dels cicles de FIV-ICSI en funció del patró meiòtic.

Els grups són comparables quant a l'edat mitjana d'ambdós membres de la parella, els nivells d'estradiol en el dia de l'administració de l'hCG i quant a la mitjana d'òcits recuperats i microinjectats. La mitjana de concentració d'espermatozoides en el grup de meiosi normal va ser significativament superior a la del grup de bloqueig meiòtic (4.6x10<sup>6</sup> versus 1.2x 10<sup>6</sup> sptz./ml; p<0.001). La concentració d'espermatozoides mòbils totals també va ser diferent en els dos grups (0.8x10<sup>6</sup> i 0.38x10<sup>6</sup>; p<0.01). No es van trobar diferències en els paràmetres seminals entre el grup de meiosi normal i el d'anomalies sinàptiques, ni entre el grup de bloqueig meiòtic i el d'anomalies sinàptiques.

Taula 6. Característiques generals dels cicles de FIV-ICSI en relació amb el patró meiòtic.

	Grup A Meiosi normal	Grup B Bloqueig meiòtic	Grup C Anomalies sinàptiques
Nº pacients	93	35	9
Nº cicles	158	51	15
Edat mitjana ♂	34.7	35.2	34
Nº espermatozoides X10 <sup>6</sup> /ml.	4.6 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	2.6
Mobilitat total x 10 <sup>6</sup> /ml.	0.85 <sup>b</sup>	0.38 <sup>b</sup>	0.8
Edat mitjana ♀	33.6	33.1	32.9
E <sub>2</sub> (dia hCG)(pg/ml)	1822	1753	1910
X òcits recuperats	13.3	14.2	12.8
X òcits microinjectats	10.1	11.1	11.1

<sup>a</sup> P<0.001; <sup>b</sup> P<0.01



Els detalls relatius a l'evolució dels cicles, és a dir, les taxes de fecundació, el nombre d'embrions transferits, les taxes d'embaràs i l'evolució dels embarassos, es mostren a la taula 7.

Taula 7. Resultats dels 224 cicles de FIV-ICSI en relació amb el patró meiótic.

	Grup A Meiosi normal	Grup B Bloqueig meiótic	Grup C Anomalies sinàptiques
Nº cicles	158	51	15
Nº puncions fol·liculars	158	51	15
Nº oòcits 2PN (%)	1099/1592 (69)	377/568 (66.4)	119/167 (71.3)
Nº embrions transferits (X)	433 (2.7)	144 (2.8)	43 (2.9)
Nº transferències	158	51	15
Embarassos (%)	55 (34.8)	23 (45.1)	6 (40.0)
Ectòpics (%)	2 (3.6)	0	0
Avortaments (%)	2 (3.6)	3 (13)	0
Naixements (%)	51 (92.7)	20 (87.0)	6 (100)
Taxa d'implantació (%)	19.6 (85/433)	25 (36/144)	18.6 (8/43)

Les taxes de fecundació van ser molt similars en els tres grups (69%, 66.4% i 71.3% en els grups A, B i C respectivament). També van ser molt semblants les mitjanes d'embrions transferits (2.7, 2.8 i 2.9). La taxa d'embaràs en el grup de meiosi normal va ser inferior (34.8%) a les dels grups amb anomalies de la meiosi (45.1% i 40% en els grups de bloqueig meiótic i d'anomaliessinàptiques respectivament). Tot i això, les diferències no són estadísticament significatives. Igualment, no són estadísticament diferents les taxes d'avortament, d'embaràs ectòpic, ni d'implantació entre el grup A i cada un dels grups B i C. Tampoc es troben diferències si es comparen els dos grups amb anomalies meiótiques entre si.

#### 4.3 Diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) en pacients amb meiosi alterada

Tot i que en l'article 2 es va evidenciar que no hi havia un efecte important de les alteracions meiótiques en els resultats del cicles de FIV-ICSI, ens vam plantejar si el DGP podia ser útil per millorar els resultats en aquest grup de pacients. L'objectiu de l'article 3 va ser comparar els 66 cicles realitzats per als 44 pacients amb anomalies meiótiques de l'estudi anterior amb un grup de 25 parelles que havien dut a terme 27 cicles de DGP per alteracions de la meiosi. En tots els pacients del grup de DGP el resultat de l'estudi meiótic va indicar la presència de desinapsi d'un nombre variable de bivalents. Les característiques generals i l'evolució clínica d'aquests cicles es presenten a la taula 8.

Taula 8. Característiques i evolució dels cicles d'ICSI amb i sense DGP en pacients amb alteracions de la meiosi.

	Anomalies meiòtiques amb DGP	Anomalies meiòtiques sense DGP
Nº parelles	25	44
Nº cicles	27	66
Mitjana edat ♂	34.6 (28-51)	34.9 (21-59)
Mitjana edat ♀	31.5 (24-39)	33.1 (20-41)
X oòcits recuperats (Nº)	19.2 (519)	13.9 (916)
X oòcits microinjectats (Nº)	14.6 (393)	11.1 (735)
X oòcits 2PN (Nº; %)	10.9 (293; 74.5)	7.5 (496; 67.5)
Nº transferències	25	66
X embrions transferits	2.1	2.8
Nº embarassos	13	29
Taxa d'embaràs/cicle	48.1%	43.9%
Taxa d'embaràs/transfer	52.0%	43.9%
Taxa d'implantació	32.1%	23.5%
Taxa d'avortament	15.4%	10.3%

En el total de 27 cicles de DGP es van biopsiar 250 embrions, dels quals es va poder analitzar un 73.2%. No es va aconseguir diagnòstic de 23 embrions (12.7%), normalment a causa de resultats no informatius per algun dels cromosomes analitzats. Dels 160 embrions diagnosticats (87.4%), 68 embrions resultaren anormals (42.5%). Els detalls dels resultats obtinguts es mostren a la taula 9.

Taula 9. Resultats de l'anàlisi dels embrions.

Nº cicles	27
Nº embrions biopsiats (%)	250
Nº embrions analitzats (%)	183 (73.2)
Nº embrions diagnosticats (%)	160 (87.4)
Nº embrions normals (%)	92 (57.5)
Nº embrions anormals (%)	68 (42.5)
Nº embrions sense diagnòstic (%)	23 (12.6)

Les anomalies observades en aquests embrions es presenten a la taula 10 i a la figura 2. A la figura 3 s'exposen les freqüències d'aquestes anomalies.

Taula 10. Anomalies trobades en els 68 embrions anormals mitjançant DGP.

Anomalies	nº embrions
Embrions haploides	5
Embrions poliploides	4
Cromosoma 13: Monosomies	1
Trisomies	4
Cromosoma 16: Nul·lisomies	1
Monosomies	2
Cromosoma 18: Nul·lisomies	1
Monosomies	4
Trisomies	10
Tetrasomies	1
Cromosoma 21: Monosomies	3
Trisomies	3
Cromosoma 22: Trisomies	2
Cromosoma X: Monosomies	3
Trisomies	2
Tetrasomies	1
Cromosoma Y: Disomies	3
Embrions mosaics	6
Aneuploidies combinades	12

Cal destacar que en 6 embrions es van observar resultats discordants en analitzar dos blastòmers del mateix embrió (mosaics), i es van trobar anomalies que afectaven a més d'un cromosoma en 12 embrions analitzats (aneuploidies combinades).

La incidència d'aneuploidia més alta va ser la del cromosoma 18, seguida per la del cromosoma 21 (8.1%). Les trisomies van ser el tipus d'anomalia més freqüent (25%).

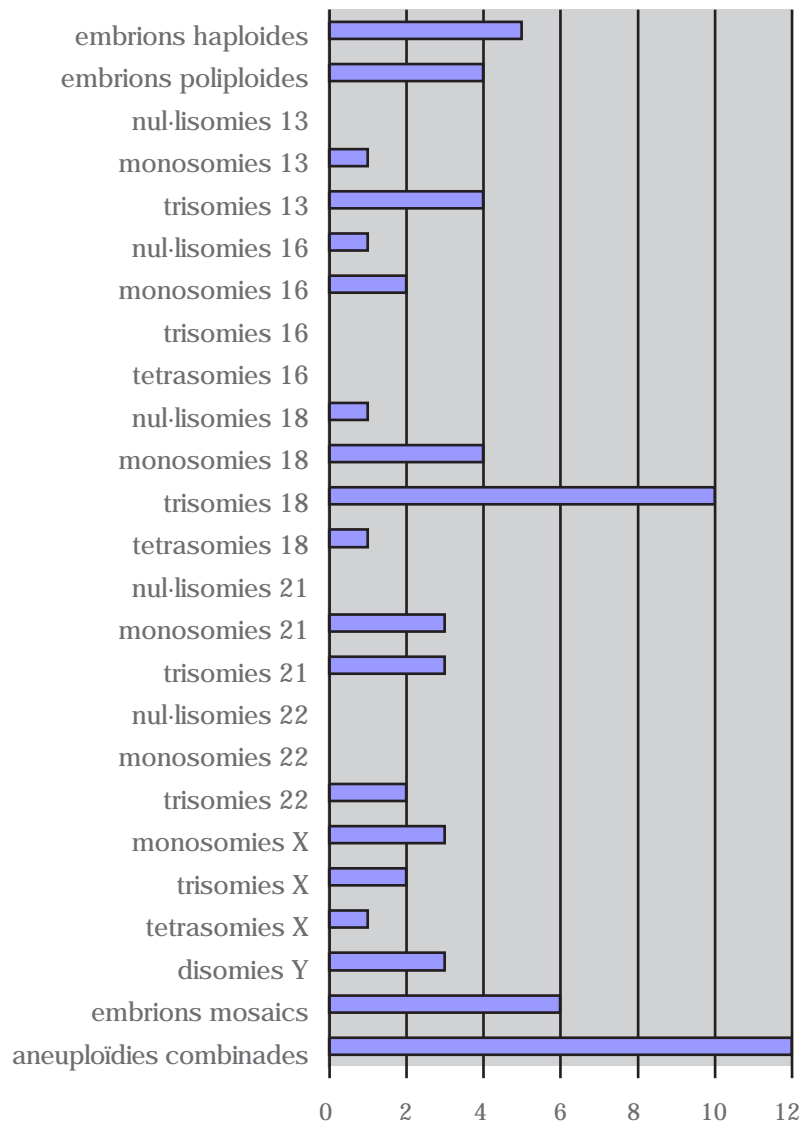


Figura 2. Anomalies cromosòmiques trobades en els 68 embrions anormals.

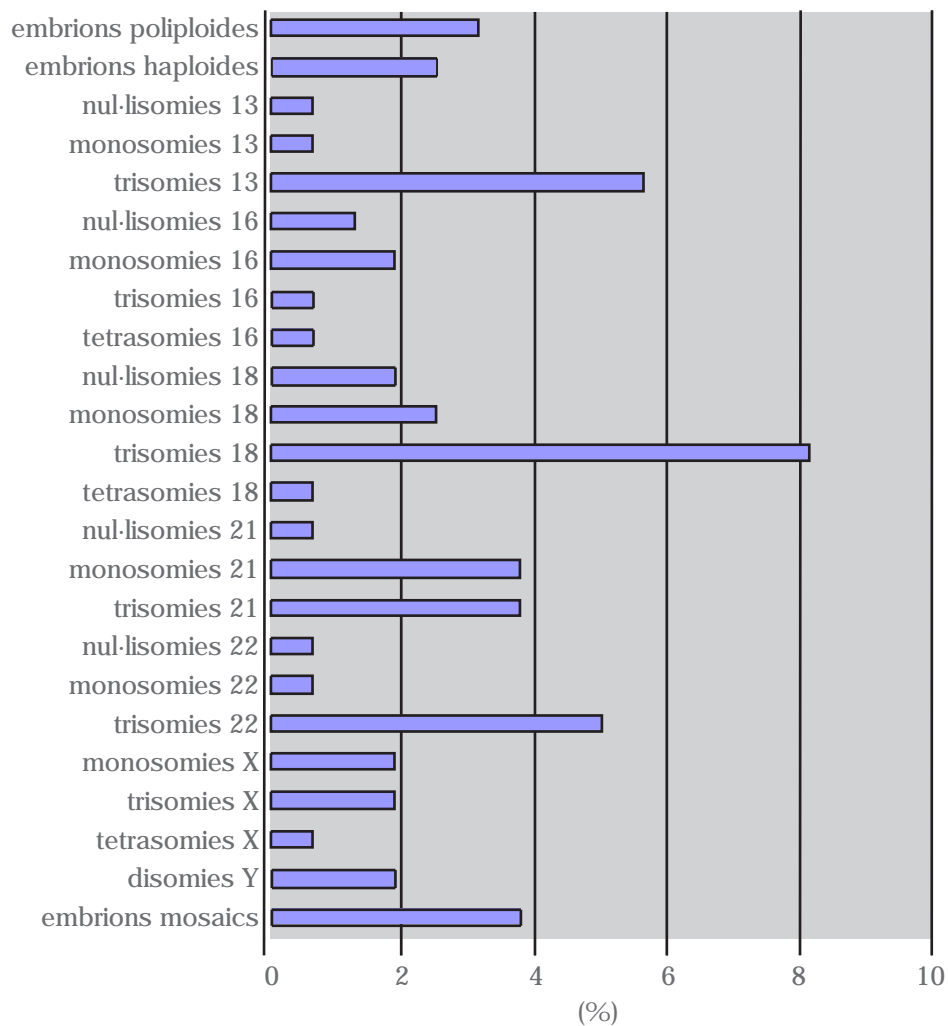
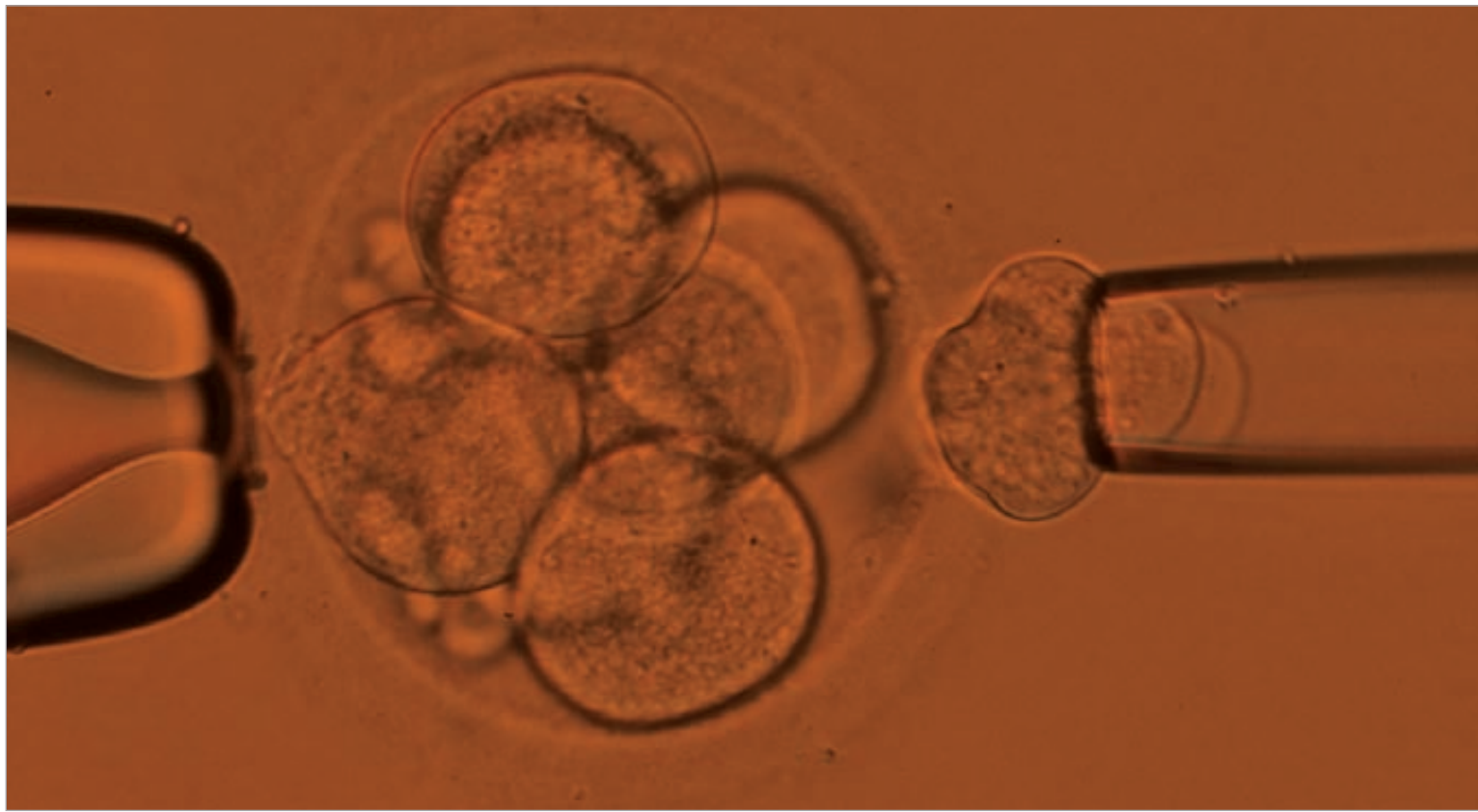


Figura 3. Freqüències de les anomalies cromosòmiques dels embrions anormals (algunes anomalies es van trobar en el mateix embrió).

Tot i haver seleccionat els embrions cromosòmicament normals per a la transferència i haver aconseguit unes taxes d'embaràs per cicle i per transferència i una taxa d'implantació més altes en el grup de DGP (48.1%, 52% i 32.1%) que en el grup sense DGP (43.9%, 43.9% i 23.5%), les diferències no són estadísticament significatives. No es van trobar diferències entre els dos grups a cap dels paràmetres estudiats.



● ○ 05 · publicacions

### 5.1 Article 1

---

Títol: *"Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diplody in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program"*

Autors: Begoña Aran, Joan Blanco, Francesca Vidal, Josep M<sup>a</sup> Vendrell, Susana Egozcue, Pere N. Barri, Josep Egozcue i Anna Veiga.

Revista científica: Fertility and Sterility.

Cita bibliogràfica: Any 1999, volum 72, pàgines 696-701.

Índex d'impacte (Journal Citation Reports, 2004): 3,170.

## Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program

Begoña Aran,\* Joan Blanco,† Francesca Vidal, Ph.D.,‡ Josep M<sup>o</sup> Vendrell, M.D.,\* Susana Egozcue, M.D.,† Pere N. Barri, M.D.,\* Josep Egozcue, M.D.,† and Anna Veiga, Ph.D.\*

Institut Universitari Dexeus, Barcelona, Spain, and Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

**Objective:** To evaluate the frequency of disomy (for chromosomes X, Y, and 18) and of diploidy in the spermatozoa of infertile men undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

**Design:** Prospective analysis of sperm nuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH).

**Setting:** University-affiliated IVF-ICSI program.

**Patient(s):** Semen samples from 19 patients participating in an IVF-ICSI program.

**Intervention(s):** Semen samples were analyzed and prepared for FISH.

**Main Outcome Measure(s):** Semen parameters were evaluated. The frequency of disomy for chromosomes X, Y, and 18 and the frequency of diploidy were analyzed by FISH.

**Result(s):** A total of 9,373 spermatozoa from 19 infertile patients were analyzed and compared with spermatozoa from a control group of 5 healthy men. No differences in the frequency of disomy 18 were found, but statistically significant differences in the incidence of sex chromosome disomy and of diploidy were observed.

**Conclusion(s):** The study of sperm nuclei by FISH is useful to improve genetic counseling in infertile patients selected for ICSI. (*Fertil Steril*® 1999;72:699–701. ©1999 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** Fluorescence in situ hybridization, sperm aneuploidy, sperm diploidy, ICSI

Received January 15, 1999; revised and accepted April 22, 1999.

Supported by Fondo de Investigación Sanitaria project no. 96/1992-01, Madrid, Spain and by the Càtedra de Investigación en Obstètrica y Ginecologia of the Institut Universitari Dexeus, Barcelona, Spain.

Reprint requests: Begoña Aran, Servei de Medicina de la Reproducció, Department of Obstetrics and Gynecology, Institut Universitari Dexeus, Passeig Bonanova 67, E-08017, Barcelona, Spain (FAX: 93-2057966).

\* Servei Medicina de la Reproducció, Department of Obstetrics and Gynecology, Institut Universitari Dexeus.

† Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona.

0015-0282/99/\$20.00  
 PII S0015-0282(99)00307-6

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has become the method of choice for the treatment of severe male factor infertility. The first pregnancy obtained with the use of ICSI occurred in 1991, and the first delivery of an infant born as a result of ICSI was reported in 1992 by Palermo et al. (1). This micromanipulation technique is much more efficient than the previously described partial zona dissection or subzonal insemination (2).

It has been shown that none of the conventional semen parameters has any relation to the fertilization and pregnancy rates obtained with ICSI, except when totally immotile spermatozoa are used (3). Debate regarding the genetic risks associated with the use of ICSI has arisen when patients with extremely severe and idiopathic male factor infertility are treated (4).

Micromanipulation by itself does not seem to lead to abnormalities in live infants born as a result of ICSI (5). Embryonic morphology and development after ICSI are similar to that after IVF, and oocyte damage is minimized by the use of the proper tools and methodology (6).

Certain types of male infertility (severe or idiopathic infertility) may have a genetic origin. It has been shown that the Yq gene DAZ (deleted in azoospermia) is deleted in some men with severe oligoasthenozoospermia (OAT) and in more men with azoospermia (7). Screening patients for this deletion is expensive and not always possible in all ICSI programs. Other, unknown mutations may be involved, and patients must be informed about the possible risk of transmitting infertility from generation to generation.



It also has been reported that some genetic disorders are associated with male infertility. One of these conditions is cystic fibrosis. Congenital bilateral or unilateral absence of the vas deferens has proved to be a mild form of cystic fibrosis in otherwise healthy men (8). Genetic screening and counseling should be offered to couples who are participating in ICSI programs because of congenital bilateral absence of the vas deferens (9). Other, unknown autosomal recessive disorders also may be related to infertility, the risk depends on the carrier frequency in the population being treated.

Another concern is the possibility of obtaining chromosomally abnormal embryos after the injection of unbalanced sperm from men with severe OAT who are participating in ICSI programs. Cytogenetic studies of subfertile men have shown an increased prevalence of chromosomal abnormalities in this population, including balanced structural rearrangements and aneuploidy. Karyotyping should be included in the screening of patients who are undergoing ICSI (10).

Meiotic studies in infertile men (11) have demonstrated an increased frequency of synaptic disruptions in both the autosomes and the sex chromosomes. Pairing abnormalities observed during meiosis in infertile men can lead to meiotic arrest or the production of chromosomal abnormalities, depending on the ability of the affected cell to complete meiosis; this most often results in oligozoospermia or azoospermia.

In contrast, reports on prenatal diagnosis and on infants born as a result of ICSI (12) with an increased rate of sex chromosomal abnormalities have shown the importance of studying the chromosomal constitution of sperm used for ICSI.

Analysis of the chromosomes of human spermatozoa used to be performed with the use of the human-hamster interspecific fertilization system (13). However, in recent years, the use of fluorescence in situ hybridization (FISH) of decondensed sperm nuclei has provided an alternative approach for evaluating the chromosomal constitution of human spermatozoa (14).

In this article, we report the incidence of sex chromosome disomy, disomy 18, and spermatozoal diploidy in infertile patients participating in an ICSI program.

## MATERIALS AND METHODS

Semen samples were obtained from 19 infertile men (age range, 28–48 years) who were referred to the andrology unit of our institution before participating in an IVF-ICSI program. The study was approved by the ethics committee of Institut Universitari Dexeus.

All spermograms were performed by multiple exposure photography. Spermograms showed OAT ( $<20 \times 10^6/\text{mL}$  of spermatozoa and  $<35\%$  of motile spermatozoa) in 14 patients and asthenozoospermia (AS;  $<35\%$  of motile sper-

matozoa) in 5 patients. In the group with OAT, the mean concentration of spermatozoa was  $2.98 \times 10^6/\text{mL}$  with a mean concentration of motile spermatozoa of  $0.54 \times 10^6/\text{mL}$  and a mean concentration of progressively motile spermatozoa of  $0.12 \times 10^6/\text{mL}$ . In the group with AS, the mean concentration of spermatozoa was  $36.55 \times 10^6/\text{mL}$ , with a mean concentration of motile spermatozoa of  $5.36 \times 10^6/\text{mL}$  and a mean concentration of progressively motile spermatozoa of  $1.11 \times 10^6/\text{mL}$ . The semen parameters of the 19 patients are shown in Table 1.

As part of a previous screening protocol, a karyotype and a diagnostic testicular biopsy were performed in all patients and a meiotic study was performed in 8 patients. All patients had a normal karyotype except for one man (patient number 12) with a pericentric inversion in chromosome 9 (46XY (inv.9)(p11q12). Maturation arrest was observed in 11 patients. Five patients with OAT had meiotic abnormalities.

The semen samples were prepared (as for ICSI) with discontinuous gradients (Pure Sperm; Scandinavian, IVF Science AB, Goteborg, Sweden) and washed twice in Gamete-100 (Scandinavian, IVF Science AB). Cryptozoospermic samples were only washed twice in Gamete-100. Sperm pellets were fixed in methanol and acetic acid at a ratio of 3:1 and processed for FISH analysis. Sperm nuclei were decondensed by slide incubation in 5 mM of dithiothreitol and 1% Triton X-100. Details of the sperm fixation, nuclear decondensation, and FISH processes have been described previously (15).

Triple-color FISH with centromeric DNA probes for chromosomes X (Spectrum green; Vysis Inc., Downers Grove, IL), Y (Spectrum orange; Vysis Inc.), and 18 (Spectrum aqua; Vysis Inc.) were used for the FISH study. Fluorescence in situ hybridization incubation and detection were performed according to the manufacturer's instructions. Analyses were performed using an Olympus BX60 (Technica Medica MAB S.A., Barcelona, Spain) epifluorescence microscope equipped with a triple-bandpass filter for diaminoethylindole, Texas Red, and fluorescein isothiocyanate and with single-band pass filters for fluorescein isothiocyanate, Texas Red, and Aqua.

Sperm nuclei scoring was done according to the strict criteria described by Blanco et al. (16). To decrease the subjectivity of the observations, the following criteria were used: overlapped spermatozoa or sperm heads without a well-defined boundary were not evaluated, and in cases of disomy or diploidy, all signals had to have the same intensity and be separated from each other by a distance greater than the diameter of each signal. Nullisomies were not scored directly and were considered conservatively as equivalent to the incidence of disomies.

The control group consisted of five men (age range, 23–37 years) with a normal karyotype and normal semen parameters. Two of them had proved fertility. The results

TABLE 1

Semen parameters and incidence of chromosome 18, X, and Y and frequency of diploidy as determined by fluorescence in situ hybridization in 19 infertile patients.

Patient no.	Age (y)	Diagnosis	Sperm count ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	Motile sperm count ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	Progressive sperm count ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	Haploid X	Haploid Y	Sexual disomy	Disomy 18	Diploidy	Other*	Total
1	34	OAT	0.40	0.20	0	100	97	2	—	4	3	206
2	32	OAT	0.02	0.01	0	91	99	2	—	3†	3	196
3	35	OAT	3.10	0.30	0	313	202	9†	1	35†	6	656
4	48	OAT	1.90	0.30	0.17	116	109	3	—	3†	2	233
5	40	OAT	11.80	0.20	0	495	480	4	—	8†	8	965
6	37	OAT	1.10	0.30	0.13	170	147	1	—	1	—	319
7	37	OAT	8.00	2.00	0	110	114	3	—	—	—	227
8	40	OAT	2.00	0.20	0.03	226	218	3	—	1	2	450
9	33	OAT	6.40	2.80	1.14	220	229	1	—	—	—	450
10‡	37	OAT	1.36	0.16	0	205	198	1	1	1	6	412
11‡	37	OAT	0.70	0.30	0.05	230	274	2	—	—	7	513
12‡	33	OAT	4.00	0.69	0.24	534	502	5	2	13†	14	1,070
13‡	34	OAT	0.03	0.02	0	172	104	5†	—	1	23	305
14‡	28	OAT	0.93	0.03	0	249	222	1	—	—	33	505
15	44	AS	19.00	0.90	0	463	470	3	—	7†	4	947
16	39	AS	20.70	0.90	0	525	518	2	—	6	9	1,060
17	39	AS	82.00	10.00	0	189	189	2	—	1	—	381
18	43	AS	20.66	2.50	0.89	123	107	—	—	1	—	231
19	37	AS	40.41	12.49	4.68	109	104	1	—	1	—	215

Note: AS = athenozoospermia; OAT = oligoastheno-teratozoospermia.

\* Nonhybridized and nullisomic spermatozoa.

†  $P < .05$  (vs. controls).

‡ Patients with meiotic abnormalities.

Aran. Abnormalities of chromosomes X, Y, and 18. Fertil Steril 1999.

regarding anomalies of chromosomes 18, X, and Y in the control population already have been published (17).

The  $\chi^2$  test was used for intergroup comparisons.  $P < .05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

A total of 9,373 spermatozoa from the 19 patients included in the study were analyzed by triple-color FISH with centromeric DNA probes for chromosomes X, Y, and 18. The results are shown in Table 1.

Hybridization was efficient, with an overall frequency of hybridization of 99.83% (range, 93.32%–100%). The results of FISH analysis in the group of infertile patients compared with the results obtained in the 50,572 spermatozoa of the control group are shown in Table 2. The frequencies of X- and Y-bearing sperm, sex disomy, disomy 18, and diploidy were analyzed.

In the study group, a total of 4,640 spermatozoa (49.5%) had an X chromosome and 4,433 spermatozoa had a Y chromosome (47.3%). When the results obtained in the study group and the control group were compared, no statistically significant differences in the frequencies of X and Y sperm were found. In the control group, the frequencies of spermato-

zoa with X and Y chromosomes were 50.29% and 48.99%, respectively.

No statistically significant differences in the frequency of chromosome 18 disomy were observed between the control group and the study group. The incidence of chromosome 18 disomy was 0.05% in the study group and 0.09% in the control group.

TABLE 2

Results of fluorescence in situ hybridization analysis in 19 infertile patients compared with healthy controls.

Finding	No. (%) in control group	No. (%) in study group	P value
Haploid X	25,432 (50.29)	4,640 (49.50)	NS
Haploid Y	24,778 (48.99)	4,433 (47.29)	NS
Sex disomy	188 (0.37)	50 (0.53)	<.05
Disomy 18	48 (0.09)	4 (0.04)	NS
Diploid	126 (0.25)	86 (0.92)	<.0001
Other	0 (0)	120 (1.28)	
Total	50,572	9,373	

Note: NS = not significant.

Aran. Abnormalities of chromosomes X, Y, and 18. Fertil Steril 1999.

TABLE 3

Results of fluorescence in situ hybridization analysis in 14 patients with oligoasthenoteratozoospermia and 5 patients with asthenozoospermia.

Finding	Control group (%)	OAT group no. (%)	P value	AS group no. (%)	P value
Haploid X	50.29	3,231 (49.41)	NS	1,409 (49.72)	NS
Haploid Y	48.99	3,085 (47.18)	NS	1,388 (48.98)	NS
Sex disomy	0.37	42 (0.64)	<.01	8 (0.28)	NS
Disomy 18	0.09	4 (0.06)	NS	0 (0)	NS
Diploid	0.25	70 (1.07)	<.01	16 (0.56)	<.01
Other	0	107 (1.64)		13 (0.46)	
Total		6,539		2,834	

Note: AS = asthenozoospermia; NS = not significant; OAT = oligoasthenoteratozoospermia.

Arav. Abnormalities of chromosomes X, Y, and 18. Fertil Steril 1999.

Statistically significant differences were observed in the incidence of disomies for the sex chromosomes between the study group (0.53%) and the control group (0.37%,  $P < .05$ ). Statistically significant differences in the frequency of diploid spermatozoa also were observed (0.92% in the study group and 0.25% in the control group;  $P < .0001$ ).

Table 3 shows the results of FISH analysis in the groups of patients with OAT and AS. The frequencies of haploid X (49.41%) and haploid Y (47.18%) spermatozoa in the OAT group were comparable to those in the control group (50.29% and 48.99%, respectively). No statistically significant differences in the incidence of disomy 18 were observed between these two groups (0.06% vs. 0.09%). Statistically significant differences in the frequency of sex chromosome disomy were found between the OAT group (0.64%) and the control group (0.37%;  $P < .01$ ). Statistically significant differences in the incidence of diploid spermatozoa also were found (1.07% in the OAT group vs. 0.25% in the control group;  $P < .01$ ).

In the patients with AS, the frequency of diploid spermatozoa was increased significantly (0.56%) compared with the control group (0.25%;  $P < .01$ ). This was the only statistically significant difference; there were no differences in the incidence of haploid X (49.72%), haploid Y (48.98%), sex chromosome disomy (0.28%), or disomy 18.

In patients with meiotic abnormalities, only the incidence of diploid spermatozoa (0.53%) differed in comparison with the control group (0.25%;  $P < .01$ ). No statistically significant differences in the rates of haploid X (49.55%), haploid Y (46.35%), sex chromosome disomy (0.50%), or disomy 18 (0.11%) were observed. These findings are outlined in Table 4.

## DISCUSSION

Since 1978, aneuploidy studies in human sperm have been performed using the zona-free hamster egg penetration

assay (13). In the last few years, several studies (18–24) have been published on the incidence of chromosomal abnormalities in decondensed spermatozoa determined with the use of FISH. The first studies used a single DNA probe (18, 19). This method was not adequate because it was impossible to distinguish between disomic and diploid cells.

Some investigators believe that diploid sperm are larger than haploid sperm, but size does not seem to be a good parameter for the identification of diploid spermatozoa (20, 21). The use of dual FISH allows the differentiation between disomic and diploid spermatozoa. With the use of dual FISH (for autosomes), normal haploid spermatozoa show two hybridization signals, one for each probe. Disomic spermatozoa show three hybridization signals and diploid spermatozoa have four signals, two for each chromosome analyzed. Multiple-color FISH has been used by several investigators (21–24). In this study, we used three-color FISH with centromeric DNA probes for chromosomes X, Y, and 18.

In the study group, the ratio of X-bearing to Y-bearing sperm did not differ from the expected 1:1 proportion. The sex ratio in the study group was 1.04 vs. 1.03 in the control group. No statistically significant differences were observed.

The frequency of diploid sperm in our study was 0.92; it was higher in the patients with OAT (1.07%) than in the patients with AS (0.56%). The rate was significantly higher than the diploidy rate in the control group (0.25%). These diploidy rates are comparable to the diploidy frequency reported by some, but not all, investigators. Miharū et al. (25) reported similar incidences of diploidy in infertile and fertile patients (0.23% and 0.18%, respectively) in a single-color FISH study, but most of these infertile patients had oligozoospermia or unexplained infertility. Guttenbach et al. (26) reported a frequency of diploid sperm of 0.1% in a heterogeneous population of infertile patients and a frequency of 0.05% in fertile probands. These differences were not statistically significant, although we observed a higher frequency of diploid sperm in a selected group of 12 infertile men.

TABLE 4

Results of fluorescence in situ hybridization analysis in five patients with meiotic abnormalities.

Finding	Control group (%)	Meiotic abnormalities no. (%)	P value
Haploid X	50.29	1,390 (49.55)	NS
Haploid Y	48.99	1,300 (46.35)	NS
Sex disomy	0.37	14 (0.50)	NS
Disomy 18	0.09	3 (0.11)	NS
Diploid	0.25	15 (0.53)	<.01
Other	0	83 (2.96)	
Total		2,805	

Note: NS = not significant.

Arav. Abnormalities of chromosomes X, Y, and 18. Fertil Steril 1999.

Pang et al. (27) reported a higher frequency of diploidy in 9 patients with OAT (2.07%) than in fertile donors (0.1%). In't Veld et al. (28) described a man with OAT who had a very high frequency of diploid spermatozoa (40%).

These differences probably are due to the heterogeneity of the populations of infertile men studied. Our data are similar to those reported by Pang et al. (27) and In't Veld et al. (28), who studied patients with OAT similar to most of the patients in our series.

The frequency of disomy 18 (0.04%) observed in our study group was not statistically significantly different from that in the control group (0.09%) and was comparable to the frequencies reported by Williams et al. (29) (0.08%) and by Spriggs et al. (21) (0.11%) in fertile men, but lower than the frequency reported by Bischoff et al. (23) (0.25%), who only analyzed 1,000 spermatozoa in two fertile men.

We found statistically significant differences in the frequency of sex chromosome disomy between patients and controls (0.53% vs. 0.37%). The frequency of sex chromosome disomy was especially high in the subgroup with OAT (0.64%) and was statistically significantly different from that in the control group. The frequency of sex chromosome disomy also was high in the group with meiotic abnormalities (0.50%), but it was not statistically significantly different, probably as a result of the small number of patients in this group.

Moosani et al. (24) reported a higher frequency of XY disomy in the sperm of five men with idiopathic infertility (0.18%–0.47%) than in healthy men (0.16%). Pang et al. (27) detected a higher incidence of sex chromosome disomy in patients with OAT (4.99%) than in fertile donors (0.48%). In't Veld et al. (28) reported that most spermatozoa from one patient with OAT had both an X and a Y chromosome, suggesting that malsegregation of the sex chromosomes could be related to the presence of a single, almost terminal, chiasma between the X and Y chromosomes at meiosis I (30).

On the other hand, diploid sperm may be related to the presence of erratic chromosomes (derived from the synaptic anomalies detected through the study of meiosis in some of these patients) (31) that may abort anaphase I and produce diploid sperm, or they may result from the establishment of heterosynapses, a process that rescues meiosis in some patients with synaptic errors (32) but disturbs the development of anaphase I and also can produce diploid spermatozoa. A considerable increase in meiotic disturbances was found in patients with OAT (17.9% vs. 4%–8% in patients with other types of infertility) in a recent study performed in our laboratory (33).

Our data are similar to those reported by Pang et al. (27) and by In't Veld et al. (28), who found an increase in sex chromosome disomy and diploid spermatozoa in patients with OAT.

Several sets of data indicate that moderate, albeit signif-

icant, increases in a given type of disomy in spermatozoa are related to an increase in aneuploidy in the offspring. Some fathers of children with Down syndrome of paternal origin have been shown to have increased frequencies of disomy 21 in their spermatozoa (34), and one father of a girl with Turner syndrome of paternal origin was shown to have an increased frequency of sex chromosome nullisomy in his sperm (35). Thus, detection of an increase in sex chromosome disomy in spermatozoa (27, 28, 30) could be related to the increase in sex chromosome aneuploidy reported in children conceived with the use of ICSI (12, 36, 37).

In summary, our results show increased rates of diploidy and chromosome disomy in some infertile men compared with fertile controls. This is especially important for patients with severe male factor infertility (i.e., OAT) who are participating in IVF-ICSI programs, and it underscores the importance of using multicolor FISH or other methods to study the genetic risk in these men.

Screening patients before ICSI treatment is important to evaluate the prognosis and genetic risks of the couple. We believe that multicolor FISH should be included in this screening whenever sperm aneuploidy is suspected.

**Acknowledgment.** The authors thank Joan Carlos Suris, M.D., for statistical analysis (Institut Universitari Dexeus).

#### References

1. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17–8.
2. Palermo G, Joris H, Derde MP, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem AC. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1993;59:826–35.
3. Nagy Z, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, et al. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995;10:1123–9.
4. Meschede D, Horst J. Genetic counselling for infertile male patients. *Int J Androl* 1997;20:20–30.
5. Govaerts I, Devreker F, Koenig I, Place I, Van den Bergh M, Englert Y. Comparison of pregnancy outcome after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998;13:1514–8.
6. Palermo G, Cohen J, Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: a powerful tool to overcome fertilization failure. *Fertil Steril* 1998;65:899–908.
7. Vogt P. Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod* 1998;4:739–44.
8. Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995;332:1475–80.
9. Silber S, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Lissens W, Ferenc C, et al. The use of epididymal and testicular sperm injection: the genetic implications for male infertility. *Hum Reprod* 1995;10:2031–43.
10. Meschede D, Lemcke B, Exsler JR, De Gayer CH, Behre HM, Nieschlag E, et al. Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection: prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. *Hum Reprod* 1998;13:576–82.
11. Egozcue J, Templado C, Vidal F, Navarro J, Morer-Fargas F, Marina S. Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum Genet* 1983;65:185–8.
12. European Society for Human Reproduction and Embryology Task Force on Intracytoplasmic Sperm Injection. Assisted reproduction by

- intracytoplasmic sperm injection: a survey on the clinical experience in 1994 and the children born after ICSI, carried out until 31 December 1993. *Hum Reprod* 1998;13:1737-46.
13. Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi R. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 1978;274:911-3.
  14. Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 1997;3:585-98.
  15. Vidal F, Moragas M, Catalá V, Torelló MJ, Santaló J, Calderón G, et al. Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. *Hum Reprod* 1993;8:1740-3.
  16. Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1996;11:722-6.
  17. Blanco J, Rubio C, Simón C, Egozcue J, Vidal F. Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47 XYY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Hum Genet* 1997;99:413-6.
  18. Pieters MHEC, Geraedts JPM, Meyer H, Dumoulin JCM, Evers JH, Jongbloed RJE, et al. Human gametes and zygotes studied by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1990;53:15-9.
  19. Guttenbach M, Schakowski R, Smith M. Incidence of chromosome 3, 7, 10, 17, and X disomy in mature human sperm nuclei as determined by nonradioactive in situ hybridization. *Hum Genet* 1994;93:7-12.
  20. Carothers AD, Beatty RA. The recognition and incidence of haploid and polyploid spermatozoa in man, rabbit and mouse. *J Reprod Fertil* 1995;44:467-500.
  21. Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: results of two- and three-colour fluorescence in situ hybridization using centromeric probes for chromosomes 1, 12, 15, 18, X and Y. *Cytogenet Cell Genet* 1995;71:47-53.
  22. Chevret E, Rousseaux S, Montel M, Pelletier R, Cozzi J, Sèle B. Meiotic segregation of the X and Y chromosomes and chromosome 1 analyzed by three-color FISH in human interphase spermatozoa. *Cytogenet Cell Genet* 1995;71:128-30.
  23. Bischoff FZ, Nguyen DD, Burt KJ, Shaffer LG. Estimates of aneuploidy using multicolor fluorescence in situ hybridization on human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 1994;66:237-43.
  24. Moosani N, Pattinson HA, Carter MC, Cox D, Rademaker AW, Martin RH. Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 1995;64:811-7.
  25. Miharu N, Best RG, Young SR. Numerical chromosome abnormalities in spermatozoa of fertile and infertile men detected by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1994;93:502-6.
  26. Guttenbach M, Martínez-Exposito MJ, Michelmann HW, Engel W, Schmid M. Incidence of diploid and disomic sperm nuclei in 45 infertile men. *Hum Reprod* 1997;12:468-73.
  27. Pang MG, Zackowski J, Hoegerman SF, Moon SY, Cuticchia AJ, Acosta AA, et al. Detection by fluorescence in situ hybridization of chromosome 7, 11, 12, 18, X and Y abnormalities from oligoastheno-teratozoospermic patients of an in vitro fertilization program. *J Assist Reprod Genet* 1995;12:53S.
  28. In't Veld P, Broekmans F, de France H, Pearson PL, Pieters M, van Kooij RJ. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. *Hum Reprod* 1997;12:752-4.
  29. Williams BJ, Ballenger CA, Matter HE, Bishop F, Tucker M, Zwingman TA, et al. Non-disjunction in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two and three probes. *Hum Mol Genet* 1993;2:1929-36.
  30. Egozcue J, Blanco J, Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 1997;3:441-52.
  31. Nicklas BR. Chance and check point: accurate chromosome distribution in mitosis and meiosis. *Cytogenet Cell Genet* 1998;81:100.
  32. Saadallah N, Hultén M. EM investigations of surface spread synaptonemal complexes in a human male carrier of a pericentric inversion in (13)(p12,q14): the role of heterosynapsis for spermatocyte survival. *Ann Hum Genet* 1988;50:369-83.
  33. Vendrell JM, García F, Veiga A, Calderón G, Egozcue S, Egozcue J, et al. Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoastheno-teratozoospermia. *Hum Reprod* 1999;14:375-8.
  34. Blanco J, Gabru E, Gómez D, Baena N, Guàrdia H, Egozcue J, et al. Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of fathers of children with trisomy 21, in a population with a prevalence of Down syndrome: increased incidence in cases of paternal origin. *Am J Hum Genet* 1998;63:1067-72.
  35. Martínez-Pasarell O, Templado C, Vioms E, Egozcue J, Nogues C. Nondisjunction of sex chromosome in sperm from the father of Turner's monozygotic twins. *Hum Genet*. In press.
  36. Liebers I, Bonduelle M, Legain J, Wilikens A, Van Assche E, Buyse A, et al. Follow-up of children born after intracytoplasmic sperm injection. In: Hedon B, Bringer J, Mares P, editors. *Fertility and sterility. A current overview. Proceedings of the 15th World Congress on Fertility and Sterility*; September 17-22 1995. Montpellier, France. London: Parthenon, 1995:409-12.
  37. In't Veld P, Bradenburg H, Verhoeff A, Dhont M, Las F. Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1995;346:773.

## 5.2 Article 2

---

Títol: *"Outcome of intracytoplasmic sperm injection in relation to the meiotic pattern in patients with severe oligoasthenozoospermia"*

Autors: Begoña Aran, Francesca Vidal, Josep M<sup>a</sup> Vendrell, Ferran García, Susana Egozcue, Josep Egozcue, Pere N. Barri i Anna Veiga.

Revista científica: Fertility and Sterility.

Cita bibliogràfica: Any 2003, volum 80, pàgines 91-95.

Índex d'impacte (Journal Citation Reports, 2004): 3,170.

## Outcome of intracytoplasmic sperm injection in relation to the meiotic pattern in patients with severe oligoasthenozoospermia

Begoña Aran,<sup>a</sup> Francesca Vidal, Ph.D.,<sup>b</sup> Josep M. Vendrell, M.D.,<sup>a</sup> Ferran Garcia, M.D.,<sup>a</sup> Susana Egozcue, M.D.,<sup>b</sup> Josep Egozcue, M.D.,<sup>b</sup> Pere N. Barri, M.D.,<sup>a</sup> and Anna Veiga, Ph.D.<sup>a</sup>

Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus, Barcelona, and Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

**Objective:** The aim of the study was to evaluate the intracytoplasmic sperm injection outcome in a selected group of patients with oligoasthenozoospermia in relation to the results obtained from their meiotic analysis.

**Design:** Retrospective clinical study.

**Setting:** An assisted reproduction service and a university department.

**Patient(s):** One hundred thirty-seven men with oligoasthenozoospermia grouped in relation to their meiotic pattern.

**Intervention(s):** Two hundred twenty-four intracytoplasmic sperm injection cycles from 137 men with oligoasthenozoospermia in whom diagnostic meiotic analyses had been performed.

**Main Outcome Measure(s):** Fertilization, pregnancy, implantation, and abortion rates.

**Result(s):** There were no significant statistical differences in fertilization, pregnancy, implantation, or abortion rates among the three groups studied.

**Conclusion(s):** No statistically significant differences in fertilization, pregnancy, implantation, or abortion rates were found in patients with oligoasthenozoospermia in relation to the meiotic pattern. (Fertil Steril® 2003;80:91–5. ©2003 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** ICSI, meiotic pattern, oligoasthenozoospermia

In 1992, Palermo (1) reported the first pregnancies after intracytoplasmic sperm injection (ICSI), and since then this micromanipulation technique has become the method of choice for the treatment of severe male factor infertility.

It has been established that none of the conventional semen parameters shows any relationship with the fertilization and pregnancy rates obtained after ICSI except when totally immotile spermatozoa are used (2). The issue about the genetic risk derived from the use of ICSI arises when patients affected by extremely severe and idiopathic male factors are treated (3). One of the risks is the possibility of obtaining chromosomally abnormal embryos after the injection of unbalanced sperm from males with severe oligoasthenozoospermia.

Meiotic studies in infertile men (4) demonstrated that meiotic disorders are found in 6% of men studied, reaching 17.5% in patients with severe oligoasthenozoospermia (OA) (5, 6).

The possible relationship between different spermatogenic parameters and the results of the meiotic analysis in patients with severe OA was evaluated by Vendrell et al. (5). They found statistically significant differences among the meiotic patterns in relation to sperm concentration and FSH levels. The investigators reported that a high incidence of meiotic abnormalities (66.7%) was found in patients with a sperm concentration  $<1 \times 10^6/\text{mL}$ , and they concluded that sperm counts  $<1 \times 10^6/\text{mL}$  and/or FSH concentration  $>10 \text{ IU/L}$

Received August 9, 2002;  
 revised and accepted  
 March 3, 2003.

Supported by the Càtedra de Investigació en Obstetrícia y Ginecología of the Institut Universitari Dexeus, Barcelona, Spain. Reprint requests: Begoña Aran, Servei de Medicina de la Reproducció, Departament d'Obstetrícia i Ginecologia, Institut Universitari Dexeus, Passeig Bonanova 89-91, 08017 Barcelona, Spain (FAX: 93-2057966; E-mail: begara@iudexeus.uab.es).

<sup>a</sup> Departament d'Obstetrícia i Ginecologia, Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus.

<sup>b</sup> Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona.

0015-0282/03/\$30.00  
 doi:10.1016/S0015-0282(03)00563-3

could be considered as predictors of meiotic abnormalities.

It is well established that meiotic disturbances can lead to meiotic arrests and/or to the production of sperm with chromosome abnormalities, depending on the ability of the affected cell to overcome the meiotic checkpoints and to complete meiosis (7, 8), but most result in associated oligozoospermia or azoospermia.

With regard to sperm chromosome abnormalities, some studies that used fluorescent in situ hybridization (FISH) (9, 10) have reported an increase in sex chromosome disomies and diploid spermatozoa in patients with OA undergoing IVF-ICSI cycles. Furthermore, Vegetti et al. (11) observed a correlation between poor semen parameters and increased aneuploidy rates for chromosomes 13, 18, 21, X, and Y in spermatozoa. More recently, Rubio et al. (12) and Calogero et al. (13) also reported that oligoasthenoteratozoospermia (OAT) was associated with higher sperm aneuploidy and diploidy rates, resulting in lower pregnancy rates in couples with higher sperm aneuploidy (13).

Taking into consideration the published data, our study focused on the relationship between the meiotic pattern and the clinical outcome of ICSI cycles in patients with severe OA. To attain this objective, we evaluated the fertilization, pregnancy, miscarriage, and implantation (fetal heartbeat per number of embryos replaced) rates in 224 ICSI cycles.

## MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in 137 patients (mean age range, 26–59 years) who were referred to the andrology unit of our institution before participating in an ICSI program. The study was approved by the ethics committee of the Institut Universitari Dexeus.

Spermograms were performed by multiple exposure photography (14), and all patients showed severe OA (motile sperm concentration <1.5 M/mL).

Following the protocol for the study of infertile men at the Institut Universitari Dexeus (5), a diagnostic testicular biopsy for meiotic analysis was indicated and performed in all the patients included in this series. Unilateral testicular biopsies were obtained under local anesthesia. Meiotic preparations were obtained using the technique of Evans et al. (15). All preparations were coded, scored to locate meiotic divisions at 10 X, and analyzed blindly by two different observers. The blind was only disclosed at the end of the study. Written informed consent was obtained from all patients.

### ICSI Cycles

Follicular stimulation was carried out in all patients by the association of SC administrated GnRH (leuprolide; Procrin; Abbot, Madrid, Spain) FSH (Neofertinorm; Serono, Madrid, Spain) and hCG (Profasi; Serono, Madrid, Spain) as described elsewhere (16). Oocytes were recovered by ultra-

sound-guided transvaginal follicle puncture 36 hours after hCG injection (17).

All sperm samples were prepared with discontinuous gradients (pure sperm; Nidacon, Göteborg, Sweden) (18). Oocyte preparation and ICSI procedures have been described elsewhere (19).

Between 16 and 20 hours after the ICSI procedure, oocytes were observed under a stereomicroscope (Olympus SZH; Olympus España, Barcelona, Spain) for the presence of pronuclei and polar bodies. Embryos were evaluated 48 hours after ICSI, and 1–3 normally cleaved embryos were replaced. Supernumerary embryos showing normal cleavage and less than 25% of fragmentation were cryopreserved.

Luteal phase support was given by vaginal administration of natural micronized P 600 mg/day (Utrogestan; Seid, Barcelona, Spain) for 10 days or hCG 2,500 IU on days 2, 4, and 6 after oocyte retrieval.

Pregnancy was evaluated by the serum  $\beta$ -hCG concentration measured 12 and 21 days after replacement. An ultrasound scan was performed after 6 weeks of amenorrhea for the detection of a gestational sac and fetal heartbeat.

### Data Set and Statistics

Patients were classified into three groups depending on their meiotic pattern: group A, normal meiosis; group B, spermatogenic arrest (presence of prophase I figures and occasional spermatozoa but no metaphase I or metaphase II figures observed); and group C, synaptic anomalies (chromosome pairing anomalies).

Fertilization, pregnancy, implantation, and abortion rates obtained in each group were evaluated. For statistical analyses, the  $\chi^2$  test was applied using SPSS software (SPSS, Inc., Chicago, IL).

## RESULTS

A total of 137 couples and 224 ICSI cycles were included in this retrospective study. General characteristics of couples and cycles in relation to the meiotic pattern are shown in Table 1.

The women's ages ranged from 20 to 43 years. Mean ages were 33.6, 33.1, and 32.9 years in groups A, B, and C, respectively. No statistically significant differences were found in the mean age of the women among the three groups or in  $E_2$  levels on the day of hCG administration.

No statistically significant differences were found in the mean age of the men (34.7, 35.2, and 34 years), which ranged between 21 and 59 years. Statistical differences were observed in the sperm parameters between the normal meiosis group and the meiotic arrest group. The mean concentration in the normal meiosis group was  $4.6 \times 10^6$  spermatozoa/mL versus  $1.2 \times 10^6$  spermatozoa/mL in the meiotic arrest group ( $P < .001$ ). Statistically significant differences were found in the motile spermatozoa concentration between



TABLE 1

General characteristics of IVF–intracytoplasmic sperm injection cycles in relation to the meiotic results.

	Group A, normal meiosis	Group B, meiotic arrest	Group C, synaptic anomalies
No. of patients	93	35	9
No. of cycles	158	51	15
Mean age, male	34.7	35.2	34
No. of spermatozoa $\times 10^6$ /mL	4.6 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	2.6
Total motility $\times 10^6$ /mL	0.85 <sup>b</sup>	0.38 <sup>b</sup>	0.8
Mean age, female	33.6	33.1	32.9
E <sub>2</sub> (pg/ml) (hCG day)	1,822	1,753	1,910
X (pg/ml) recovered oocytes	13.3	14.2	12.8
X microinjected oocytes	10.1	11.1	11.1

Note: X = mean of recovered oocytes.

<sup>a</sup>  $P < .001$ .

<sup>b</sup>  $P < .01$ .

Aran. ICSI results in relation to meiotic pattern. Fertil Steril 2003.

both groups ( $0.8 \times 10^6$  spermatozoa/mL versus  $0.38 \times 10^6$  spermatozoa/mL) ( $P < .01$ ). No statistical differences were observed in sperm parameters between the normal meiosis group and the synaptic anomalies group or between the meiotic arrest group and the synaptic anomalies group. No statistically significant differences were found in the number of recovered oocytes, metaphase II oocytes, or inseminated oocytes between groups. Detailed results of the 224 ICSI cycles are shown in Table 2.

A total of 93 patients with normal meiosis (group A) participated in 158 ICSI cycles. The fertilization rate in this group was 69.0%. Four hundred thirty-three embryos were replaced in 158 transfers ( $X = 2.7$ ), and 55 pregnancies were achieved (34.8%).

Thirty-five patients showing meiotic arrest (group B) participated in 51 ICSI cycles. The fertilization rate was

66.4%. Twenty-three pregnancies were achieved from 51 replacements of 144 embryos ( $X = 2.8$  embryos/replacement, and 45.1% pregnancy rate per replacement and per follicle puncture).

Nine patients showing synaptic anomalies (group C) participated in 15 ICSI cycles. The fertilization rate was 71.3%. Fifteen replacements were performed with 43 embryos ( $X = 2.9$ ) resulting in six pregnancies (43.9%).

No differences were found in the fertilization, pregnancy, implantation, or miscarriage rates among the three groups. No significant differences in fertilization, pregnancy, miscarriage, or implantation rate were observed when comparing results in patients with normal meiosis versus patients with any kind of meiotic abnormality (group B and group C). No significant differences in multiple pregnancy rates in relation to the meiotic pattern (34.6%, 34.7%, and 33.3% in groups A, B, and C, respectively) were observed.

Of the 84 pregnancies obtained, two were ectopic pregnancies and five resulted in miscarriages (chromosome studies were not performed as the pregnancies were followed in other centers). In the 77 pregnancies that ended in deliveries, prenatal diagnosis was carried out in 26 cases. The 34 corresponding fetuses had normal karyotypes. There was a fetal death at 20 weeks in a twin pregnancy. In the remaining 51 cases, prenatal diagnosis was not performed. The 79 children born from these pregnancies are apparently healthy and they do not present congenital malformations, except for a boy with a minor malformation in an ear of probable hereditary origin and a girl who died before birth (multiple pregnancy).

In all groups, the percentage of girls was higher than the percentage of boys. Sixty-nine girls were born in the three groups (62.2%) versus 42 boys (37.8%). Differences were not statistically significant, but there is a 1:1.5 relation in all groups. In group A, 44 girls (60.3%) and 29 boys were born.

TABLE 2

IVF–intracytoplasmic sperm injection outcome in relation to the meiotic results.

	Group A, normal meiosis	Group B, meiotic arrest	Group C, synaptic anomalies
No. of cycles	158	51	15
No. of follicle punctures	158	51	15
No. of ZPN oocytes (%)	1,099/1,592 (69.0)	377/568 (66.4)	119/167 (71.3)
No. of replaced embryos (X)	433 (2.7)	144 (2.8)	43 (2.9)
No. of ETs	158	51	15
Pregnancies (%)	55 (34.8)	23 (45.1)	6 (40.0)
Ectopic pregnancies (%)	2 (3.6)	0	0
Miscarriages (%)	2 (3.6)	3 (13.0)	0
Deliveries (%)	51 (92.7)	20 (87.0)	6 (100)
Implantation rate (%) (fetal heart beat/embryo replaced)	19.6 (85/433)	25 (36/144)	18.6 (8/43)

Aran. ICSI results in relation to meiotic pattern. Fertil Steril 2003.

Twenty girls (66.7%) and 10 boys (33.3%) were born in group B, and 3 boys (37.5%) and 5 girls (62.5%) in group C.

## DISCUSSION

To our knowledge, the present study is the first to evaluate the outcome of IVF-ICSI cycles in relation to meiotic pattern. Novero et al. (20) analyzed the relationship between results of ICSI and FSH in males with standard sperm parameters. The investigators did not find any relationship among serum FSH levels and fertilization, cleavage, pregnancy, or implantation rates after ICSI; however, no meiotic data were included in their report. On the other hand, Levron et al. (21) demonstrated a link between high serum FSH levels and sperm chromosome aneuploidies detected by FISH.

Vendrell et al. (5) evaluated the incidence of different meiotic patterns and their relationship with spermatogenic parameters in patients with severe OA. As stated before, statistically significant differences among the three meiotic patterns in relation to sperm concentration and FSH levels in patients with severe OA were detected. For this reason we want to know whether these differences were recorded in the outcomes of the ICSI cycles in these patients.

Our results show that no statistically significant differences were found in the fertilization, pregnancy, implantation, or abortion rate when these patients participated in IVF-ICSI programs. It seems that meiotic abnormalities do not have any adverse effect on embryo implantation. Meiotic abnormalities result in poor sperm quality, but if a good fertilization rate by ICSI is achieved, pregnancy and implantation rates are comparable to the pregnancy and implantation rates obtained in patients with OA with normal meiosis.

In a previous study performed in our laboratory analyzing the chromosomal constitution of spermatozoa by FISH of five patients showing meiotic abnormalities, only the incidence of diploid spermatozoa (0.53%) differed in comparison with the control group (0.25%) ( $P < .01$ ). No significant differences in the rates of haploid X (49.55%), haploid Y (46.35%), sex disomies (0.50%), and disomy 18 (0.11%) were observed (9).

Meiotic arrests can be complete or partial and associated or not with synaptic anomalies, depending on the cases resulting in azoospermia or severe oligozoospermia (22, 23). Furthermore, synaptic disorders may be quite extensive, affecting all or some meiotic bivalents. Pregnancy and implantation rates in this group were 45.1% and 25%, respectively, the highest of the three groups. In the patients of this series, the few cells that complete meiosis seem to be normal and the poor quality of these samples does not seem to be related in an increase in sperm chromosome abnormalities. These patients usually have very low concentration samples, but a high fertilization rate can be achieved using ICSI, producing good embryos with a good implantation rate.

The implantation rate in the synaptic anomalies group was 18.6%, quite lower than, although not statistically different from, the meiotic arrest group probably because of the small number of cases studied in this group.

In the 26 cases in which prenatal diagnoses were carried out, no abnormal karyotypes were found. No differences in the congenital malformation rate were found either, since all children were healthy.

In a preliminary study carried out by our group (24, 25), we found a higher rate of abnormal embryos after preimplantation genetic diagnosis (PGD) in patients with synaptic anomalies than in PGD cycles for sex selection (27.5% vs. 16.8%;  $P < .01$ ). These data suggest that PGD could be indicated in patients with meiotic disturbances and even more in patients with synaptic anomalies.

The screening of patients before ICSI is important for assessing genetic risk. Meiotic studies and FISH in ejaculated or testicular spermatozoa are highly recommended and should be considered as part of the genetic study in these patients. Reproductive counseling and further strategies should consider the results obtained in the genetic study. In this sense, preimplantation diagnosis should be advised in cases with a high genetic risk to increase the chances of replacement of chromosomally normal embryos.

---

*Acknowledgments:* The authors thank J. C. Suris, Department of Gynecology and Obstetrics, Institut Universitari Dexeus, Barcelona, Spain, for statistical analysis. They also thank to Sílvia Ruiz, Ruth Calvete, Mireia Florensa, and Marta Sanchez for data collection.

## References

1. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Sierieghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17-8.
2. Nagy Z, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, et al. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995;10:1123-9.
3. Meschede D, Horst J. Genetic counselling for infertile male patients. *Int J Androl* 1997;20:20-30.
4. Egozcue J, Templado C, Vidal F, Navarro J, Morer-Fargas F, Marina S. Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum Genet* 1983;65:185-8.
5. Vendrell JM, García F, Veiga A, Calderín G, Egozcue S, Egozcue J, et al. Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Hum Reprod* 1999;14:375-8.
6. Egozcue S, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, et al. Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:307-9.
7. McKim KS, Hawley RS. Chromosomal control of meiotic cell division. *Science* 1995;270:1595-601.
8. Roeder SG, Bailis JM. The pachytene checkpoint. *Trends Genet* 2000;16:395-403.
9. Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, et al. Screening for abnormalities of chromosomes X,Y and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril* 1999;72:696-701.
10. Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Donceel GF, Acosta AA, et al. Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridisation in

- spermatozoa from nine patients with oligoastheno-teratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999; 14:1266-73.
11. Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi M, Bonduelle M, et al. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridisation in infertile men. *Hum Reprod* 2000;15:351-65.
  12. Calogero A, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Burrello N, Palermo I, et al. High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. *Hum Reprod* 2001;16:1433-9.
  13. Rubio C, Gil-Salom M, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001; 6:2084-92.
  14. Mackler A. A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoal motility determination. *Fertil Steril* 1978; 30:192-9.
  15. Evans EP, Breckon G, Ford CE. An air-drying method of meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* 1964;3:289-94.
  16. Barri PN, Martínez F, Conoleu B, Veiga A, Calderón G. Experiencia clínica de la utilización de agonistas de la GnRh en un programa de FIV. *Drugs Today* 1988;24(Suppl 2):51-60.
  17. Carreras O, Pascual MA, Herxter L, Barri PN. 4000 punciones ecográficas para el programa de FIV del Institut Universitari Dexeus. Libro XVII Reunión Nacional de la Sección de ecografía de la SEGO, 1994:65.
  18. Ord T, Patrizio P, Morello E, Balmaceda JP, Asch R. Mini-Percoll: a new method for semen preparation IVF in severe male factor infertility. *Hum Reprod* 1990;5:987-9.
  19. Calderón G, Belil I, Arán B, Veiga A, Gil Y, Boada M, et al. Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in vitro fertilization: first results. *Hum Reprod* 1995;10:2835-9.
  20. Novero V, Camus M, Tournaye H, Smits J, Verheyen G, Joris H, et al. Relationship between serum follicle stimulating hormone in the male and standard sperm parameters and the results of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;12:59-63.
  21. Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J, et al. Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001;76:479-84.
  22. Navaero J, Templado C, Benot J, Lango R, Rajmil O, Egozcue J. Sperm chromosome studies in an infertile man with partial, complete asynapsis of meiotic bivalents. *Hum Reprod* 1990;5:227-9.
  23. Vidal F, Navarro J, Templado C, Egozcue J. Synaptonemal complex studies in the male. *Hum Reprod* 1987;2:577-81.
  24. Aran B, Castelló C, Vidal F, Santaló J, García F, Jiménez C, et al. ¿Qué aporta el diagnóstico genético preimplantacional en pacientes con alteraciones meióticas? Libro de resúmenes, 1er Congreso de ASEBIR. Murcia, 25 y 26 de Octubre. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 2001;18:258.
  25. Aran B, Vidal F, Vendrell JM, Santaló J, Boada M, Egozcue S, et al. Preimplantation genetic diagnosis in patients with meiotic abnormalities [abstract]. *Hum Reprod* 2002;17:189.

### 5.3 Article 3

---

Títol: "Preimplantation genetic diagnosis in patients with male meiotic abnormalities"

Autors: Begoña Aran, Anna Veiga, Francesca Vidal, Mònica Parriego, Josep M<sup>a</sup> Vendrell, Josep Santaló, Josep Egozcue i Pere N. Barri.

Revista científica: Reproductive BioMedicine Online.

Cita bibliogràfica: Any 2004, volum 8, pàgines 470-476.

Índex d'impacte (Journal Citation Reports, 2004): pendent d'avaluar.

## Article

## Preimplantation genetic diagnosis in patients with male meiotic abnormalities



Since 1986 Begonia Aran has been a senior embryologist in the IVF laboratory of the Medicine Reproduction Service of Institut Universitari Dexeus in Barcelona, Spain. She is Secretary of the Spanish Association of Biology of Reproduction (ASEBIR). Her particular research interest is in male infertility and IVF and she has published several articles in this field. Her thesis topic is 'Genetic risk in patients with oligoasthenozoospermia undergoing IVF-ICSI'.

Dr Begonia Aran

B Aran<sup>1,3</sup>, A Veiga<sup>1</sup>, F Vidal<sup>2</sup>, M Parriego<sup>1,2</sup>, JM Vendrell<sup>1</sup>, J Santaló<sup>2</sup>, J Egozcue<sup>2</sup>, PN Barni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servei de Medicina de la Reproducció, Departament d'Obstetrícia i Ginecologia, Institut Universitari Dexeus, Passeig Bonanova 89-91, 08017 Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

<sup>3</sup>Correspondence; Fax: +34 93 2057966; e-mail: begara@dexeus.com

## Abstract

Indications and candidates for preimplantation genetic diagnosis (PGD) have increased in recent years. This study evaluates whether IVF-intracytoplasmic sperm injection (ICSI) results could be improved by selecting embryos through PGD-AS (aneuploidy screening) in couples in whom the male partner presents meiotic abnormalities. Two hundred and fifty-six embryos were biopsied and 183 were suitable for analysis (73.2%). Ninety-two embryos showed normal chromosomal analysis (50.3% of the analysed embryos and 57.5% of the diagnosed embryos). Pregnancy, abortion and implantation rates were compared with 66 IVF-ICSI cycles performed in 44 patients with meiotic abnormalities without PGD (control group). No statistically significant differences in the pregnancy rate (52 versus 43.9%), implantation rate (32.1 versus 23.5%) and miscarriage rate (15.4 versus 10.3%) were observed between the groups. Although the embryos obtained from men with meiotic abnormalities showed a high frequency of chromosome abnormalities, no improvements in pregnancy and implantation rates were obtained after PGD-AS in the series analysed.

**Keywords:** ICSI, male meiotic abnormalities, PGD-AS

## Introduction

Since 1990, when Handyside *et al.* reported the first pregnancy from biopsied preimplantation embryos, candidates and indications for preimplantation genetic diagnosis (PGD) have increased considerably (ESHRE PGD Consortium, 2002). Nowadays, PGD is not only used to avoid the transmission of genetic abnormalities, but also to improve IVF success rate in certain groups of patients (Gianaroli *et al.*, 1999; Munné *et al.*, 1999, 2003; Kuliev and Verlinsky, 2002; Munné, 2002). Some patients that could possibly benefit from PGD-AS (aneuploidy screening) are couples in whom the male partner is affected by meiotic abnormalities (Aran *et al.*, 2002).

Meiotic studies have been incorporated as a cytogenetic diagnostic tool in the screening of male infertility since the early 1970s (Hultén *et al.*, 1970; Pearson *et al.*, 1970). Investigation of the meiotic division in spermatogenic cells from testicular biopsies resulted in the description of specific

meiotic abnormalities limited to the germ cell line, affecting homologue chromosome pairing (synapsis) and recombination (revised by Egozcue *et al.*, 2000) that have been related to mutations of one or more genes coding for specific meiotic products (for example, synaptonemal complex proteins, recombination enzymes, DNA repair enzymes; Edlmann *et al.*, 1996; Hassold, 1996). Different groups have contributed to the characterization and classification of the different meiotic abnormalities described so far (revised by Templado *et al.*, 1981). Taking into consideration that meiotic abnormalities are only detectable through cytogenetic studies in spermatocytes and that the information obtained can help to establish a diagnosis, meiotic analysis has been included in some screening protocols of male infertility, especially since the reluctance of andrologists to obtain testicular material has clearly decreased.

Meiotic disorders in spermatogenic cells have been found in 6% of infertile men in whom a meiotic analysis had been

indicated (Egozcue *et al.*, 1983). This percentage rises to 17.5% in patients with oligoasthenoeratozoospermia (OAT) (Vendrell *et al.*, 1999; Egozcue *et al.*, 2000). Meiotic anomalies could lead to different degrees of meiotic arrest (partial or complete) clearly identified through the meiotic study, and usually reflected in an abnormal spermogram, but also to non-disjunctionary events that could result in the production of unbalanced spermatozoa. In fact, this point is supported by data obtained from fluorescence in-situ hybridization (FISH) studies in decondensed sperm nuclei. Several groups have reported increases in sex chromosome disomies and diploid spermatozoa in patients with OA (oligoasthenoeratozoospermia) and OAT undergoing IVF-intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles (Aran *et al.*, 1999; Pang *et al.*, 1999; Bernardini *et al.*, 2000; Vegetti *et al.*, 2000; Calogero *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2001).

Since the development of ICSI (Palermo *et al.*, 1992), this micromanipulation technique has become the method of choice for the treatment of severe male factor infertility. ICSI solved the fertility problems of many of these patients, but opened a debate about the genetic risk for the offspring when patients affected by extremely severe and idiopathic male factors are treated (Meschede and Horst, 1997). Furthermore, in severely oligoasthenoeratozoospermic males with meiotic disorders, the theoretical risk could be increased by the possibility of generating chromosomally abnormal embryos due to the injection of abnormal spermatozoa.

In a previous study (Aran *et al.*, 2003), no statistical differences were found in the IVF-ICSI pregnancy and implantation results in oligoasthenoeratozoospermic patients with regard to the meiotic anomalies observed. Nevertheless, taking into account the risk of production of chromosomally abnormal spermatozoa (aneuploid, diploid), application of PGD could be useful in some patients showing meiotic abnormalities. In this context, cytogenetic analysis of embryos derived from these couples and further replacement of those evaluated as normal could result in an increase in the implantation and pregnancy rate, as well as in a decrease in the rate of chromosomal abnormalities in the offspring. Therefore, PGD was introduced for the reproductive treatment of couples with severe male factors associated with meiotic abnormalities, to evaluate if the use of PGD-AS in these patients could result in an improvement of assisted reproductive success.

This paper presents the results obtained in PGD-AS cycles in couples in whom the males presented meiotic chromosomal anomalies. Pregnancy and implantation rates obtained in such couples are compared after PGD with a similar group in which PGD was not performed.

## Materials and methods

The study group included 25 couples with severe male factor and meiotic abnormalities, undergoing 27 PGD-AS. The control group comprised 44 couples with similar characteristics undergoing 66 ICSI cycles, but not referred for PGD. All patients enrolled in the study gave written consent to participate.

## Cytogenetic meiotic analysis

Cytogenetic meiotic analysis is included in the protocol of study of infertile men at the Institut Universitari Dexeus and suggested to patients according to the andrologist's criteria (Vendrell *et al.*, 1999).

In all the patients included in this study, unilateral testicular biopsy for meiotic analysis was obtained under local anaesthesia. Testicular material was collected in isotonic solution (0.9% NaCl) and processed as previously described (Egozcue *et al.*, 1983), based on the classical technique of Evans *et al.* (1964). Testicular tissue was chopped up with fine scissors in a Petri dish; material was transferred to a conical centrifuge tube containing hypotonic solution (0.075 mol/l KCl) and left to stand at room temperature to allow pieces of tubules to sediment. Supernatant was removed to a clean centrifuge tube, incubated at 37°C for 20 min and centrifuged for 10 min at 800 rpm. The obtained pellet was resuspended in 5–8 ml of fixative (methanol-acetic acid, 3:1) and kept at 4°C for 30 min. The suspension was centrifuged as above, the supernatant discarded and the pellet resuspended in fixative. This procedure was repeated 2 or 4 times until clean. Finally, the pellet was resuspended in 1–2 ml of fixative and air-dried preparations were obtained by throwing 1 or 2 drops of the cell suspension onto clean degreased slides.

Preparations were coded, stained by Leishman (1:4, in Leishman buffer) for 8 min, scored under a bright field microscope to locate meiotic figures at  $\times 10$  and analysed at  $\times 100$ . Evaluation of the meiotic stages, chiasmata count and meiotic characterization was performed according to standard criteria (revised by Hultén *et al.*, 2001), and meiotic abnormalities were classified according to Templado *et al.* (1981).

Patients enrolled for PGD were selected from those presenting meiotic anomalies.

## ICSI cycles

Follicular stimulation was carried out in all patients, using a combination of subcutaneous administered gonadotrophin-releasing hormone agonist (GnRH) (Leuprolide, Procrin; Abbot, Madrid, Spain) with FSH (Neofertinorm; Sero, Madrid, Spain) and human chorionic gonadotrophin (HCG) (Profasi; Sero), as described previously (Barri *et al.*, 1988). Oocytes were recovered by ultrasound-guided transvaginal follicle puncture 36 h after HCG injection (Carreras *et al.*, 1994).

All sperm samples were prepared with discontinuous gradients (Pure sperm; Nidacon, Göteborg, Sweden) (Ord *et al.*, 1990). Oocyte preparation and ICSI procedure have been described previously (Calderón *et al.*, 1995).

Fertilization was assessed using a stereomicroscope (Olympus, SZH; Olympus España, Barcelona, Spain), 16–20 h after ICSI.

Article - PGD and aneuploidy screening in men - B Aran *et al.*

## PGD protocol

Embryo biopsies were performed at day 3. Each embryo was manipulated individually in EB medium (Vitrolife, Göteborg, Sweden) under oil (Ovoil; Vitrolife). The zona pellucida was drilled (diameter 25–30 µm) with the use of a laser (Fertilase) (Boada *et al.*, 1998). A blastomere was gently aspirated with a glass needle (Humagen, Charlottesville, USA). The fixation method used was a slight modification of that described by Tarkowski (1966).

Fixed blastomeres were processed for aneuploidy screening (Vidal *et al.* 1998). The PB multicolour probe panel (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) plus a second round of FISH using satellite DNA probes for chromosomes X and Y (Vysis) were used for the evaluation of chromosomes (13, 16, 18, 21, 22, X, Y).

## Embryo transfer

Normal diagnosed embryos were replaced on day 5. Surplus transferable embryos were cryopreserved. In the control group, embryos were replaced on day 2 according to the usual laboratory protocol.

## Luteal phase

Luteal phase support was given by vaginal administration of natural micronized progesterone 600 mg/day (Utrogestan; Seid, Barcelona, Spain) for 10 days or HCG 2500 IU on days 2, 4 and 6 after oocyte retrieval.

Pregnancy was evaluated by serum β-HCG concentration measured 12 and 21 days after replacement. An ultrasound scan was performed at 6 weeks of amenorrhoea for the detection of a gestational sac and fetal heart beat.

## Data set and statistics

Results regarding pregnancy, implantation and miscarriage rates obtained in the PGD group for meiotic abnormalities were compared with the control group, using Fisher's exact test. In all cases 5% level of significance was chosen.

## Results

All the males selected for the study displayed desynapsis of a variable number of chromosome bivalents (Templado *et al.*, 1981) in the meiotic analysis performed.

General characteristics of couples and cycles and a summary of the clinical outcome are described in **Table 1**. In the PGD cycles, women's ages ranged from 24 to 39 years, with a mean of 31.5. Men's mean age was 34.6 years, ranging from 28 to 51 years. A total of 519 oocytes were recovered (mean 19.2), 393 oocytes were microinjected (mean 14.6) and 293 (mean 10.9) showed 2PN between 16 and 20 h post-microinjection (74.5%). In the control group, women's mean age was 33.1 years (range 20–41) and men's mean age was 34.9 (range 21–59). Nine hundred and sixteen oocytes were recovered (mean 13.9), 735 oocytes were microinjected (mean 11.1) and 496 showed 2PN (mean 7.5; 67.5%). No statistically significant differences were found between the groups in any of the parameters studied.

Results of PGD are shown in **Table 2**. Two hundred and fifty embryos were biopsied and 183 could be analysed (73.2%). Ninety-two embryos were normal for the chromosomes analysed (30.3% from the analysed embryos and 57.5% from the diagnosed embryos). Sixty-eight embryos were abnormal (37.2% from the analysed embryos and 42.5% from the diagnosed embryos). Twenty-three embryos (12.7%) had an inconclusive diagnosis, usually due to non-informative results

**Table 1.** General characteristics and clinical outcome of couples with meiotic abnormalities after ICSI cycles with and without PGD. There were no significant differences between groups.

	<i>Meiotic abnormalities with PGD</i>	<i>Meiotic abnormalities without PGD</i>
No. couples	25	44
No. cycles	27	66
Mean age male (years)	34.6 (28–51)	34.9 (21–59)
Mean age female (years)	31.5 (24–39)	33.1 (20–41)
Mean oocytes recovered (no. oocytes)	19.2 (519)	13.9 (916)
Mean oocytes microinjected (no. oocytes)	14.6 (393)	11.1 (735)
Mean 2PN oocytes (no. oocytes 2PN; %)	10.9 (293; 74.5)	7.5 (496; 67.5)
No. replacements	25	66
Mean no. embryos/transfer	2.1	2.8
No. pregnancies	13	29
Pregnancy rate/cycle (%)	48.1	43.9
Pregnancy rate/transfer (%)	52.0	43.9
Implantation rate (%)	32.1	23.5
Miscarriage rate (%)	15.4	10.3

**Table 2.** Embryo analysis results.

No. cycles	27
No. biopsied embryos	250
No. analysed embryos (%)	183 (73.2)
No. diagnosed embryos (%)	160 (87.4)
No. normal embryos (%)	92 (57.5)
No. abnormal embryos (%)	68 (42.5)
No. undiagnosed embryos (%)	23 (12.6)

**Table 3.** Abnormalities found in the abnormal embryos after PGD for meiotic abnormalities.

Abnormalities	No. embryos
Haploid embryos	5
Polyploid embryos	4
<i>Chromosome 13</i>	
Monosomies	1
Trisomies	4
<i>Chromosome 16</i>	
Nullisomies	1
Monosomies	2
<i>Chromosome 18</i>	
Nullisomies	1
Monosomies	4
Trisomies	10
Tetrasomies	1
<i>Chromosome 21</i>	
Monosomies	3
Trisomies	3
<i>Chromosome 22</i>	
Trisomies	2
<i>Chromosome X</i>	
Monosomies	3
Trisomies	2
Tetrasomies	1
<i>Chromosome Y</i>	
Disomies	3
Mosaic embryos <sup>a</sup>	6
Complex aneuploidies <sup>b</sup>	12

<sup>a</sup>Discordant results obtained after the analysis of two blastomeres.

<sup>b</sup>Affecting several of the chromosomes analysed.

for one of the chromosome pairs analysed (**Table 2**). Sixty-seven embryos (26.8%) could not be analysed due to the characteristics of the nuclei obtained after fixation.

Details of embryo chromosome abnormalities are shown in **Table 3** and **Figure 1**. Five embryos analysed were haploid and four embryos were polyploid. Nine embryos showed abnormalities of the sex chromosomes. Five embryos had abnormalities affecting chromosome 13, three embryos affecting chromosome 16, 16 embryos chromosome 18, six embryos showed anomalies affecting chromosome 21 and two embryos chromosome 22. Twelve embryos presented abnormalities affecting several of the chromosomes analysed (complex aneuploidies). Discordant results were obtained after the analysis of two blastomeres in six embryos (considered as

mosaic). **Figure 2** shows frequencies of total anomalies found.

Ninety-three embryos were replaced in 25 transfers in the PGD group for meiotic abnormalities (2.1 embryos/transfer), resulting in 13 pregnancies. This represents 48.1% pregnancy rate per cycle and 52% pregnancy rate per transfer. The implantation rate was 32.1%. Two pregnancies ended in miscarriages (15.4%) (**Table 1**)

In the control group, 29 pregnancies were achieved from 66 IVF-ICSI cycles: 43.9% of pregnancy rate per cycle and per transfer. Implantation rate was 23.5%. Miscarriage rate was 10.3% (**Table 1**).

There were no significant differences in the pregnancy rate, implantation rate and miscarriage rate between the two groups.

## Discussion

The data obtained in this series indicate that embryos from patients with meiotic abnormalities subject to ICSI have a high number of chromosome anomalies (42.5%).

Gianaroli *et al.* (1997) did not find differences in the percentage of abnormal embryos after PGD in ICSI patients versus conventional IVF patients, or when the same authors (Gianaroli *et al.*, 2000) compared PGD results between normozoospermic patients versus oligoasthenozoospermic patients. They found differences in patients with abnormal karyotype, but they did not study patients with meiotic abnormalities.

Kahraman *et al.* (2002), observed a percentage of abnormal embryos (41.3%) very similar to that observed in the present study (42.5%) in severe male infertility. The authors analysed the relationship between chromosome abnormalities and pronuclear morphology in severe male infertility. However, this group of patients is quite different from the present group. The present study analyses only patients with meiotic anomalies, whereas Kahraman studied patients with different categories of male infertility and used ejaculated spermatozoa, testicular spermatozoa or even round spermatids for fertilization.

Silber *et al.* (2003) reported a high incidence of mosaicism in embryos derived from testicular sperm extraction (TESE) in men with a severe deficit in spermatogenesis (53% in TESE cycles versus 26.5% in ICSI cycles with ejaculated spermatozoa). The aneuploidy rates were not statistically different between the groups (17 versus 26.2% respectively) and were rather lower than in the present study (42.5%), but the studies cannot be compared, because Silber *et al.* analysed patients with non-obstructive azoospermia and the present study involves patients with meiotic abnormalities.

Gianaroli *et al.* (2001) found lower frequencies of normal embryos (57.5%) after PGD for several indications, 30% in PGD for maternal age and in micro-epididymal sperm aspiration (MESA)/TESE patients and 28% of normal embryos in PGD for recurrent abortions. Munné *et al.* (2002) found similar percentages (39.7%) of normal embryos after PGD for maternal age. Rubio *et al.* (2003) found statistical differences comparing percentages of normal embryos after



Article - PGD and aneuploidy screening in men - B Aran *et al.*

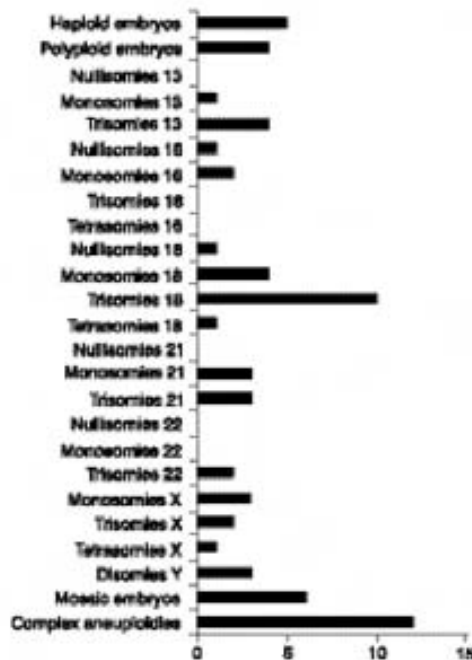


Figure 1. Chromosome abnormalities in the 68 abnormal embryos.

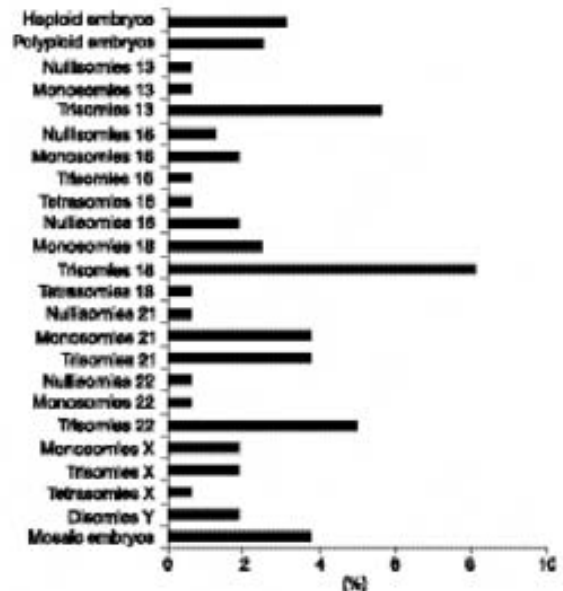


Figure 2. Percentage of abnormalities in abnormal embryos (some abnormalities were found in the same embryo).

PGD for recurrent miscarriage (29.3%) and for sex-linked diseases (45.1%).

Regarding aneuploidy frequencies, aneuploidy of chromosome 18 was the most frequently observed (13.1%) in the present study, while the aneuploidy rate of sex chromosomes was not especially high (13.2%). These results are lower than those reported by Gianaroli *et al.* (2001), which rise to 32% in PGD for maternal age. Rubio *et al.* (2003) found similar percentages of chromosome 18 aneuploidy (10.1%) in recurrent miscarriage patients and in their control group (sex-linked disease) (9.5%). However, these authors reported a higher frequency of sex chromosome aneuploidy (10.9% in both groups) and found higher incidences of aneuploidies for other chromosomes such as 16, 21, 13 and 22 (25.1, 24.1, 20.1 and 19.7% respectively) in the recurrent miscarriage group. In the control group, frequencies of aneuploidy of these chromosomes were also higher than in the present series; 13.8 versus 6.9% for chromosome 13, 10.6 versus 4.8% for chromosome 16, 19.8 versus 13.1% for chromosome 21 and 8.6 versus 6.25% for chromosome 22.

Although all authors used the same probes as used in the present study, all of them found lower percentages of normal embryos and higher frequencies of aneuploidies for the chromosomes analysed. These authors studied groups of patients with other indications for PGD, such as high maternal age or recurrent abortions. Perhaps the group of patients studied here present aneuploidies for other chromosomes, and other probes should be considered, to try to characterize abnormalities that may be characteristic of these patients. In addition, it may be necessary to adjust the probes used for each

PGD indication.

Regarding the results for haploid (3.1%) and polyploid (2.5%) embryos, the data are similar to those reported by Rubio *et al.* (2003) (4.7 and 1.6% respectively). Gianaroli *et al.* (2001) reported a significantly higher frequency of polyploidy (11%) in PGD for repeated IVF failures.

Pregnancy rates as well as implantation rates were higher when embryos normal for the chromosomes studied were replaced in patients with meiotic abnormalities subject to PGD than in those who were not (52 versus 43.9% and 32.1 versus 23.5% respectively), even though the differences observed were not statistically significant. If normal embryos could be selected using adequate probes, pregnancy and implantation rate could be increased with statistically significant differences.

Screening of patients before ICSI is important to assess their genetic risk. Meiotic studies incorporating multiplex FISH analysis (Sarrate *et al.*, 2004) and FISH in ejaculated spermatozoa or the combination of both techniques (Vidal *et al.*, 2003) are highly recommended, and should be considered as part of the genetic study in these patients. Correlations between these studies and the results of larger series will help to determine the real utility of PGD in severe male factor with meiotic impairment. Reproductive counselling and further strategies should consider the results obtained in the genetic study. In this sense, PGD should be advised in cases with a high genetic risk, in order to increase the chance of replacement of chromosomally normal embryos and to achieve adequate pregnancy rates.

## Acknowledgements

This study was supported by the Cátedra de Investigación en Obstetricia y Ginecología of the Institut Universitari Dexeus, Barcelona, Spain and project SAF 2003-04312 (Dirección General de Investigación, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain).

## References

- Aran B, Blanco J, Vidal F et al. 1999 Screening for abnormalities of chromosomes X,Y and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertility and Sterility* **72**, 696–701.
- Aran B, Vidal F, Vendrell JM et al. 2002 Preimplantation genetic diagnosis in patients with meiotic abnormalities. *18th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology*, Vienna, Austria, 1–3 July, abstract P-156.
- Aran B, Vidal F, Vendrell JM et al. 2003 Outcome of intracytoplasmic sperm injection in relation to the meiotic pattern in patients with severe oligoasthenozoospermia. *Fertility and Sterility* **80**, 91–95.
- Barri PN, Martínez F, Coroleu B et al. 1988 Experiencia clínica de la utilización de agonistas de la GnRh en un programa de FIV. *Drugs Today* **24** (suppl. 2), 51–60.
- Bernardini L, Gianaroli L, Fortini D et al. 2000 Frequency of hyper-, hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients. *Human Reproduction* **10**, 2165–2172.
- Boada M, Carrera M, De La Iglesia C et al. 1998 Successful use of laser for human embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis: report of two cases. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **15**, 302–307.
- Calderón G, Belli I, Arán B et al. 1995 Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in vitro fertilization: first results. *Human Reproduction* **10**, 2835–2839.
- Calogero AE, De Palma A, Grazioso C et al. 2001 High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. *Human Reproduction* **16**, 1433–1439.
- Carreras O, Pascual MA, Hereter L, Barri PN 1994 4000 Punciones Ecográficas para el Programa de Fiv del Institut Universitari Dexeus. Libro XVII Reunión Nacional de la Sección de Ecografía de la Sego 65.
- Edelmann W, Cohen PE, Kane M et al. 1996 Meiotic pachytene arrest in MLH-deficient mice. *Cell* **85**, 1125–1134.
- Egozcue J, Templado C, Vidal F et al. 1983 Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Human Genetics* **65**, 185–188.
- Egozcue S, Vendrell JM, García F et al. 2000 Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **17**, 307–309.
- ESHRE PGD Consortium Steering Committee 2002 ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Human Reproduction* **17**, 233–246.
- Evans EP, Breckon G, Ford CE 1964 An air-drying method of meiotic preparations from mammals testes. *Cytogenetics* **3**, 289–294.
- Gianaroli L, Munné S, Magli MC, Ferraretti AP 1997 Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy and male infertility. *International Journal of Andrology* **20**, 31–34.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S 1999 Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be propose. *Fertility and Sterility* **72**, 837–844.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Iammarrone E 2000 Preimplantation diagnosis after assisted reproduction techniques for genetically-determined male infertility. *Journal of Endocrinological Investigation* **23**, 711–716.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP et al. 2001 The role of preimplantation diagnosis for aneuploidies. *Reproductive BioMedicine Online* **4**, 31–36.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML 1990 Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* **244**, 768–770.
- Hassold TJ 1996 Mismatch repair goes meiotic. *Nature Genetics* **13**, 261–262.
- Hultén M, Eliasson R, Tällinger KG 1970 Low chiasma count and other meiotic irregularities in two infertile 46,XY men with spermatogenic arrest. *Hereditas* **65**, 285–290.
- Hultén M, Barlow A, Tease C 2001 Meiotic studies in human. In: Roxney DE (ed.) *Human Cytogenetics: Constitutional Analysis. A Partial Approach*. Oxford University Press, Oxford, pp. 211–236.
- Kahraman S, Kumtepe Y, Scryer S et al. 2002 Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility. *Human Reproduction* **17**, 3193–3200.
- Kuliev A, Verlinsky Y 2002 Current features of preimplantation genetic diagnosis. *Reproductive BioMedicine Online* **5**, 294–299.
- Meschede D, Horst J 1997 Genetic counselling for infertile male patients. *International Journal of Andrology* **20**, 20–30.
- Munné S 2002 Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *Reproductive BioMedicine Online* **4**, 183–196.
- Munné S, Magli C, Cohen J et al. 1999 Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidies in human embryos. *Human Reproduction* **14**, 2191–2199.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T et al. 2002 Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reproductive BioMedicine Online* **4**, 223–232.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T et al. 2003 Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reproductive BioMedicine Online* **7**, 91–97.
- Ord T, Patrizio P, Morello E et al. 1990 Mini-Percol: a new method for semen preparation IVF in severe male factor infertility. *Human Reproduction* **5**, 987–989.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC 1992 Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet* **340**, 17–18.
- Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ et al. 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 hybridisation in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoeratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* **14**, 1266–1273.
- Pearson PL, Ellis JD, Evans HJ 1970 A gross reduction in chiasma formation during meiotic prophase and a defective DNA repair mechanism associated with a case of human male infertility. *Cytogenetics* **9**, 460–467.
- Rubio C, Gil-Salom M, Simón C et al. 2001 Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Human Reproduction* **6**, 2084–2092.
- Rubio C, Simón C, Vidal F et al. 2003 Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Human Reproduction* **18**, 182–188.
- Sarrate Z, Blanco J, Egozcue S et al. 2004 Identification of meiotic anomalies using multiplex FISH: preliminary results. *Fertility and Sterility*, in press.
- Silber S, Escudero T, Lenahan K et al. 2003 Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction. *Fertility and Sterility* **79**, 30–38.
- Tarkowski AK 1966 An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* **5**, 394–400.
- Templado C, Vidal F, Marina S et al. 1981 A new meiotic mutation: desynapsis of individual bivalents. *Human Genetics* **59**, 345–348.
- Vegetti W, Van Assche E, Frias A et al. 2000 Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by

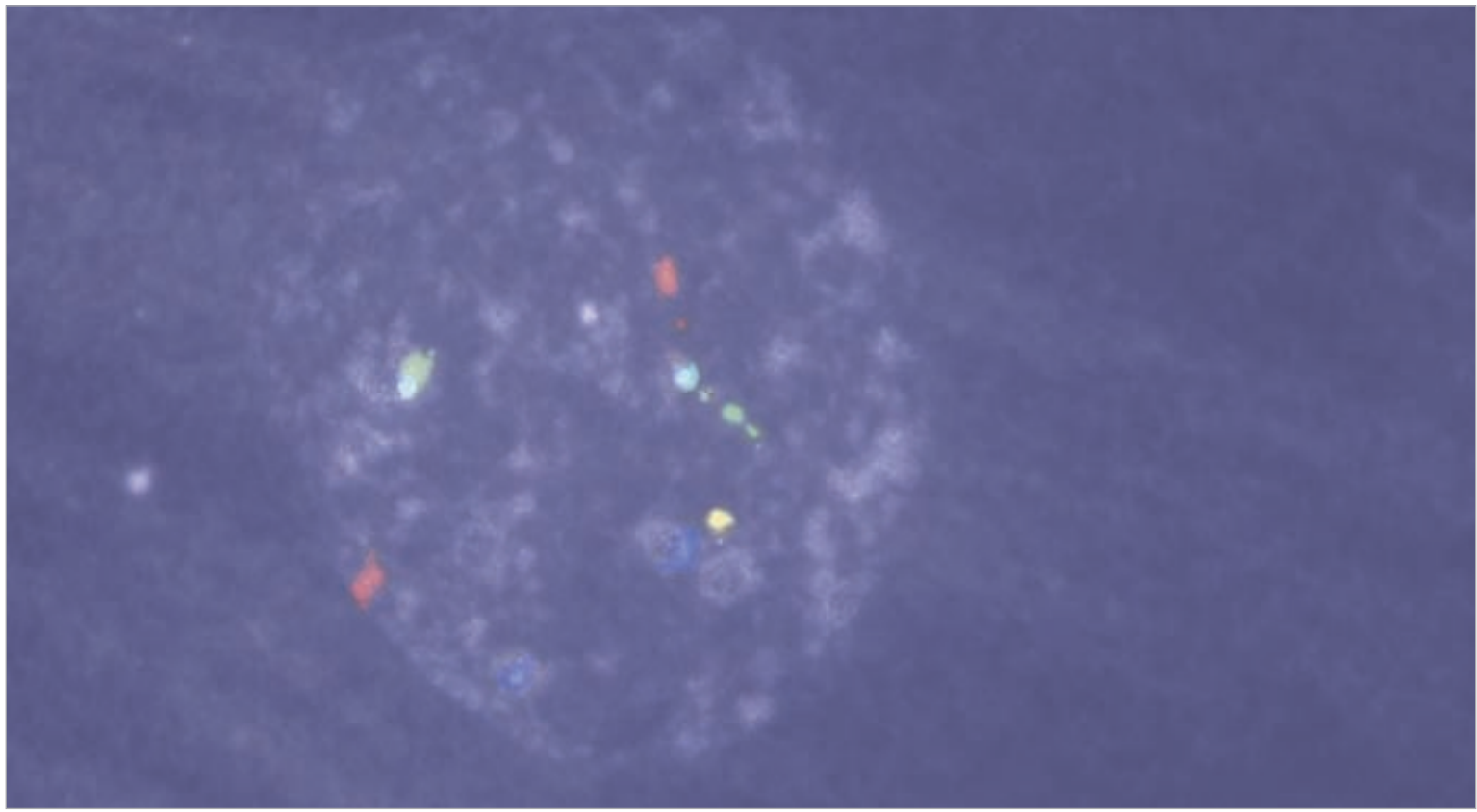
Article - PGD and aneuploidy screening in men - *B Arán et al.*

- fluorescence in-situ hybridisation in infertile men. *Human Reproduction* **15**, 351-365.
- Vendrell JM, García F, Veiga A *et al.* 1999 Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Human Reproduction* **14**, 375-378.
- Vidal F, Gimenez C, Rubio C *et al.* 1998 FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **15**, 310-313.

Vidal F, Sarrate Z, Blanco J *et al.* 2003 Multi-FISH analysis of meiotic anomalies. *Human Reproduction* **18**, O-202.

*Received 16 December 2003; refereed 7 January 2004; accepted 10 February 2004.*

---



06 · discussió general

### 6.1 Anomalies cromosòmiques en els espermatozoides de pacients amb factor masculí

La majoria dels estudis de FISH en espermatozoides que s'han publicat coincideixen amb el nostre ja que presenten freqüències d'aneuploidies més altes en els espermatozoides de pacients estèrils que en els d'individus control (Moosani et al., 1995; Pfeffer et al., 1999; Pang et al., 1999; Vegetti et al., 2000; Ushijama et al., 2000; Calogero et al., 2001a; Rubio et al., 2001). Tot i això, alguns autors no han trobat aquestes diferències en les seves sèries. Miharū et al. (1994) no observen cap augment en la incidència de diploidies i de disomies per als cromosomes analitzats en els seus pacients, però la seva sèrie inclou tant pacients oligozoospermics com pacients amb esterilitat de causa desconeguda. Tampoc Guttenbach et al. (1997) troben diferències en un estudi en el qual s'inclouen tant pacients oligozoospermics com astenozoospermics i oligoastenozoospermics, amb i sense teratozoospermia, malgrat que només dos pacients presenten astenozoospermia sense oligozoospermia.

La freqüència de disomia del cromosoma 18 observada en els pacients del nostre estudi (0.04%) no va ser estadísticament diferent de la del grup control (0.09%), comparable a l'observada per Spriggs et al. (1995) (0.11%). Ushijama et al. (2000) tampoc troben diferències en un grup de pacients amb OAT respecte del control, però presenta una incidència més alta que la nostra en els dos grups (0.12% i 0.13% respectivament). En tres estudis s'observa una gran variabilitat en la disomia pel cromosoma 18 entre pacients (Pang et al., 1999; Vegetti et al., 2000 i Calogero et al., 2001a), fet que podria explicar que les diferències entre pacients i controls siguin estadísticament significatives en aquestes sèries.

Quant als cromosomes sexuals, en el nostre treball les freqüències d'espermatozoides portadors del cromosoma X (50.3%) i del cromosoma Y (49%) van ser comparables a les del grup control (49.5% i 47.3% respectivament). La proporció X:Y no va ser diferent de la proporció 1:1 esperada, proporció que es manté en pràcticament tots els estudis publicats de FISH en espermatozoides. S'observen diferències en la incidència de disomies per als cromosomes sexuals respecte del control (0.37%) en el grup de pacients amb OA (0.64%), però no en els pacients amb AS (0.28%). Altres autors han trobat diferències en la disomia dels cromosomes sexuals entre pacients i controls (Moosani et al., 1995; Pang et al., 1999; Vegetti et al., 2000; Ushijama et al., 2000; Calogero et al., 2001a). Destaca un pacient estudiat per In't Veld et al. (1997) amb el 93% dels espermatozoides amb una dotació 24, XY. Miharū et al. (1994) i Guttenbach et al. (1997) presenten de nou freqüències de disomies per als cromosomes sexuals similars en els grups de pacients i controls. Com ja s'ha comentat, aquests autors presenten grups de pacients no homogenis que són poc comparables amb els del nostre estudi, i aquesta heterogeneïtat pot ser la causa dels resultats descrits.

L'increment en la freqüència de disomia dels cromosomes sexuals en pacients amb OAT podria estar relacionat amb l'augment d'aneuploidies dels cromosomes sexuals que alguns autors han observat en els nens procedents de cicles d'ICSI (In't Veld et al., 1995; Liebaers et al., 1995; Meschede et al., 1997; Devroey i Van Steirteghem, 2004).

En el nostre estudi, la freqüència de disomia per als cromosomes sexuals és significativament superior a la del cromosoma 18. S'han descrit diferències en les disomies de determinats cromosomes, i és evident que les diferències entre cromosomes es fan més patents en els estudis que apliquen sondes per a un nombre de cromosomes més elevat (Pang et al., 1999; Vegetti et al., 2000; Calogero et al., 2001a).

L'estudi de les incidències de disomies en espermatozoides d'individus control han demostrat que alguns cromosomes tenen més tendència que d'altres a la no-disjunció (Egozcue et al., 1997). S'ha observat un augment en les disomies pel cromosoma 16 (Williams et al., 1993), pel cromosoma 21 (Blanco et al., 1996; Spriggs et al., 1996) i per als cromosomes sexuals (Spriggs et al., 1995; Martin et al., 1996; Vegetti et al., 2000; Calogero et al., 2001a). Aquest increment d'algunes disomies ja s'havia descrit utilitzant el test d'hàmmster (Martin et al., 1991) i el seu origen s'ha relacionat amb una reducció en la recombinació en el cas del cromosoma 21 (Warren et al., 1987) i a la ja esmentada presència d'un únic quiasma quasi terminal entre els cromosomes X i Y (Hassold et al., 1991).

La producció d'espermatozoides diploides és l'anomalia cromosòmica més freqüent en els pacients estèrils. Les nostres dades mostren un percentatge d'espermatozoides diploides significativament més elevat que en el grup control (0.25%) en les tres poblacions estudiades, tant en els pacients amb astenozoospèrmia (AS)(0.56%), com en el grup de pacients amb anomalies meiótiques (0.53%), i en el grup de oligoastenozoospèrmies (OA) (1.07%), on es va trobar la incidència més alta. Aquestes dades són comparables a les presentades per la majoria dels autors (In't Veld et al. 1997, Pang et al., 1999, Ushijima et al., 2000, Vegetti et al., 2000 i Calogero et al., 2001a), però de nou les dades de Miharu et al. (1994) i Guttenbach et al. (1997) discrepen de la resta d'autors. Miharu et al. (1994) mostren freqüències similars de diploidies entre homes fèrtils i infèrtils (0.23% i 0.18%, respectivament). Guttenbach et al. (1997) no troben diferències en les taxes de diploidies entre pacients i controls (0.1%-0.05%), però sí que les troben en alguns pacients determinats si es comparen individualment (arribant fins a 1.6%).

La producció d'espermatozoides diploides pot estar relacionat amb alteracions del procés meiótic. L'origen d'aquests espermatozoides pot tenir relació amb la presència de mutacions en gens específics de la meiosi o amb un ambient testicular anormal que poden afectar el procés i els punts de control de la divisió meiótica (Rieder et al., 1994; Egozcue et al., 2000; Egozcue et al., 2005).

Les diferències entre els resultats dels diversos autors poden ser degudes a l'heterogeneïtat en les causes d'esterilitat que presenten els pacients inclosos en algunes de les sèries comentades. De fet, els resultats comparables els trobem en les sèries homogènies de pacients que presenten OA (Pang et al., 1999; Ushijama et al., 2000), i els estudis a que presenten els resultats agrupats en funció de la causa d'esterilitat mostren que és en el grup d'OA a on les diferències resulten evidents (Bernardini et al., 2000; Rubio et al., 2001).

Una altra possible causa de la discrepància entre els diversos estudis podria ser, a més de les diferències tècniques en els protocols de descondensació i en els criteris de valoració, la variabilitat interindividual. En el nostre treball s'observa una alta variabilitat en la freqüència d'aneuploidies entre els diferents individus (Taula 3), circumstància que es repeteix en la majoria dels treballs publicats i que fa que, en alguns casos, els resultats de les diferents sèries no siguin comparables.

Totes aquestes dades apunten al fet que, en general, hi ha una relació evident entre la concentració espermàtica i les anomalies cromosòmiques en els espermatozoides. Fins i tot, alguns autors han establert una correlació inversa entre la concentració espermàtica i la taxa d'aneuploidies per a alguns cromosomes (Vegetti et al., 2000; Calogero et al., 2001a; Martin et al., 2003; Pang

et al., 2005). Aquest fet, juntament amb la variabilitat interindividual observada, justifica la realització de l'estudi de FISH en els espermatozoides de pacients amb OA que permetrà conèixer la freqüència d'aneuploidies de cada individu i, per tant, oferir un consell reproductiu més acurat.

## 6.2 Resultats dels cicles de microinjecció intracitoplasmàtica (ICSI) en funció del patró meiótic en pacients amb oligoastenozoospermia (OA)

Els nostres resultats no mostren diferències estadísticament significatives quant a les taxes de fecundació, embaràs, implantació i avortament entre els pacients que presenten OA i anomalies meiótiques i els que no les presenten, quan duen a terme un cicle de FIV-ICSI. En el grup de pacients amb meiosi alterada s'observa una concentració i mobilitat espermàtica més baixa que en el grup de pacients amb meiosi normal, però un cop aconseguida la fecundació mitjançant la ICSI, les taxes d'embaràs i d'implantació són comparables a les dels pacients amb OA i meiosi normal. Tot i que les diferències no són estadísticament significatives, el grup amb les taxes d'embaràs i d'implantació més elevades va ser el de pacients que presentaven bloqueig meiótic (Taula 7).

Alguns autors han intentat relacionar els resultats dels cicles de FIV-ICSI i els paràmetres associats amb la producció espermàtica. En els primers anys d'aplicació de la ICSI, Nagy et al. (1995) no van trobar cap relació entre els resultats de la ICSI i els paràmetres espermàtics clàssics. Únicament observaven resultats inferiors en els casos d'astenozoospermia total per la possibilitat d'haver injectat espermatozoides morts. Novero et al. (1997) van correlacionar els resultats de la ICSI i els paràmetres espermàtics amb la FSH sèrica. Els autors no troben cap relació entre els nivells de FSH i les taxes de fecundació, divisió, embaràs i implantació. Per altre banda, Levron et al. (2001) troben un augment d'anomalies cromosòmiques dels espermatozoides en pacients amb nivells de FSH elevats.

Colombero et al., (1999) presenten una incidència més elevada d'aneuploidies en els espermatozoides de pacients amb paràmetres espermàtics anormals en comparar-los amb un grup de pacients normozoospermics, però aquestes anomalies no afecten els resultats dels cicles de FIV-ICSI d'aquestes parelles.

Altres autors (Pfeffer et al., 1999; Pang et al., 1999; Rubio et al., 2001) descriuen taxes d'embaràs i d'implantació més baixes en els cicles de FIV-ICSI en pacients que presenten una major incidència d'anomalies cromosòmiques en els espermatozoides. Calogero et al. (2001b) no troben diferències significatives en les taxes d'embaràs, però sí que observen una menor taxa d'aneuploidies en els espermatozoides en el grup de parelles que van aconseguir l'embaràs respecte de les que no l'aconseguien, encara que les diferències no eren significatives. Tot i això, cap d'aquests estudis considera el patró meiótic dels pacients.

En un treball realitzat al nostre centre (Vendrell et al., 1999) en el què es va estudiar la meiosi de 103 pacients amb OA greu, es va observar un augment en el percentatge d'anomalies meiótiques en els pacients que presentaven concentracions espermàtiques més baixes i nivells de FSH elevats. Quan la concentració era inferior a  $0.5 \times 10^6/\text{ml}$ , la incidència d'anomalies de la meiosi va ser del 40%, mentre que, en el grup de pacients amb FSH superior a 10UI/l, la freqüència

d'anomalies meiòtiques va ser del 54.8%. En un estudi posterior (Vendrell et al., 2003) es va analitzar la divisió dels embrions procedents de pacients amb anomalies meiòtiques i de pacients amb normozoospermia sotmesos a cicles de FIV-ICSI. En el grup de pacients amb anomalies de la meiosi arribaven a l'estadi de 4 cèl·lules, un percentatge més petit que en el grup de normozoospermics, i aquestes diferències es feien més evidents quan disminuïa la concentració espermàtica. Hi ha un efecte sinèrgic entre els dos paràmetres, anomalies meiòtiques i baixa concentració espermàtica, que influeix en el ritme de divisió embrionària. Aquest efecte no s'ha analitzat en la nostra sèrie, però les nostres dades suggereixen que no és evident, ja que no repercuteix en les taxes d'embaràs i d'implantació.

Malgrat que la majoria dels estudis no demostren una correlació evident entre els paràmetres seminals i els resultats dels cicles d'ICSI, si els pacients amb alteracions meiòtiques produeixen més espermatozoides cromosòmicament anormals, caldria pensar que probablement aquests espermatozoides donaran lloc a un percentatge més elevat d'embrions amb anomalies cromosòmiques. En aquests casos ens pot ser útil recórrer al DGP amb screening d'aneuploidies per seleccionar els embrions i intentar millorar les probabilitats d'embaràs i de naixements de nadons sans.

### 6.3 Diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) en pacients amb alteracions de la meiosi

#### 6.3.1 Incidència d'embrions anormals

El nostre estudi és el primer en avaluar els resultats del DGP en pacients amb anomalies meiòtiques. A la bibliografia trobem altres estudis de DGP per factor masculí que no són totalment comparables amb el nostre perquè estudien poblacions de pacients amb esterilitat masculina en els quals no s'han dut a terme estudis meiòtics i són, algunes vegades, grups poc homogenis.

Les nostres dades mostren un elevat percentatge d'embrions anormals procedents de pacients amb meiosi alterada (42.5%). S'han descrit percentatges més elevats d'embrions anormals en utilitzar espermatozoides testiculars i d'epidídim (72% per Gianaroli et al. (2002) i 78% per Silber et al. (2003)). També Gianaroli et al. (2000) presenten freqüències més altes que les del nostre estudi (59%-72%) en parelles amb diferents causes d'esterilitat masculina. Altres sèries de DGP per altres causes d'esterilitat masculina presenten resultats comparables als nostres, com la presentada per Kahraman et al. (2002)(41.3%) en parelles amb factor masculí de diferents causes, o quan analitza embrions procedents d'espermatozoides macrocefàlics o de mostres amb teratozoospermia total (46.4% i 37.5%, respectivament) (Kahraman et al., 2004).

Quan s'estudien pacients amb la síndrome de Klinefelter també es descriuen percentatges d'embrions anormals similars als de la nostra sèrie (39.1% i 46%, Kahraman et al., 2003 i Staessen et al., 2003 respectivament), així com en pacients amb mosaïcismes dels cromosomes sexuals (53%, Magli et al., 2002).

Si es comparen amb els resultats de DGP per altres indicacions, els percentatges d'embrions anormals publicats en la bibliografia solen ser superiors als del nostre estudi. En pacients d'edat avançada els percentatges descrits oscil·len entre el 60% i el 70% (Gianaroli et al., 2002; Munné



et al., 2002; Staessen et al., 2004), similars als presentats en dones amb avortaments de repetició (72% i 70.7%, Gianaroli et al., 2000 i Rubio et al., 2003, respectivament).

Tot i que el percentatge d'embrions anormals observat en pacients amb meiosi masculina alterada no és tan elevat com el presentat en altres indicacions de DGP, considerem que un 42.5% justifica el DGP en aquest grup de pacients.

### 6.3.2 Freqüència d'aneuploidies

---

Hi ha una gran variabilitat quant a quins són els cromosomes més implicats en les aneuploidies dels embrions segons els autors i les indicacions (Magli et al., 2002; Silber et al., 2003; Staessen et al., 2003). Els més freqüentment implicats són els cromosomes 16, 18, 21 i 22.

L'aneuploidia del cromosoma 18 va ser la més freqüent en el nostre grup de pacients (13.1%). Aquest valor és superior als descrits quan s'ha dut a terme DGP per altres causes de factor masculí (3.7%, 7.3% i 5%: Magli et al., 2002; Staessen et al., 2003 i Silber et al., 2003, respectivament). En pacients amb avortaments de repetició, Rubio et al. (2003) presenten una freqüència d'aneuploidia per al cromosoma 18 similar a la nostra (10.1%), mentre que en pacients d'edat avançada es descriuen freqüències molt més elevades (32-35%) (Gianaroli et al., 2002).

La segona aneuploidia més freqüent en la nostra sèrie és la del cromosoma 21 (8.1%). Similar a les descrites en pacients amb aneuploidies dels cromosomes sexuals (6.1% i 11.6%, Magli et al., 2002 i Staessen et al., 2003, respectivament), però superior a la presentada en casos en què s'han utilitzat espermatozoides testiculars (3%) (Silber et al. 2003). Aquesta dada podria estar relacionada amb la tendència ja descrita del cromosoma 21 a presentar fenòmens de no-disjunció (Blanco et al., 1996; Soares et al., 2001). En altres indicacions per al DGP es troben freqüències d'aneuploidia per al cromosoma 21 més elevades. La freqüència presentada en dones d'edat avançada oscil·la entre el 29% i el 54% (Gianaroli et al., 2002), mentre que, en cicles de DGP per avortaments de repetició, Rubio et al. (2003) presenten una incidència del 24.1%.

La incidència d'aneuploidies dels cromosomes sexuals va ser del 6.2%. No és una freqüència especialment elevada tenint en compte que pacients sotmesos a ICSI poden produir un elevat nombre d'embrions amb anomalies dels cromosomes sexuals, tal com han descrit alguns autors (Liebaers et al., 1995; In't Veld et al., 1997, Devroey i Van Steirteghem, 2004). Una altra dada que faria esperar una incidència més elevada d'aneuploidies dels cromosomes sexuals en els embrions de la nostra sèrie és que gran part dels pacients inclosos en el nostre treball presentaven una separació precoç dels cromosomes X i Y en l'estudi meiòtic, fet que podria comportar un percentatge elevat d'espermatozoides amb aneuploidies dels cromosomes sexuals i, per tant, un elevat percentatge d'embrions anormals per aquests cromosomes. Fins i tot en altres indicacions per al DGP es troben incidències més elevades d'aneuploidies dels cromosomes sexuals: Rubio et al. (2003) troben una incidència del 10.9% en pacients amb avortaments de repetició, i Gianaroli et al. (2002) presenten unes freqüències del 27% al 36% en pacients d'edat avançada.

Els percentatges d'haploidia (3.1%) i poliploidia (2.5%) observats en la nostra sèrie són comparables als descrits en altres sèries de DGP per factor masculí (Magli et al., 2002; Silber et al., 2003 i

Stuessen et al., 2003). També es presenten percentatges similars en sèries de DGP per a altres indicacions. En pacients amb avortaments de repetició es presenta un 4.3% d'haploïdia i un 1.3% de poliploïdia (Rubio et al. (2003), mentre que, en dones d'edat avançada, Staessen et al. (2004) presenten un 2.1% d'embrions haploides i poliploides, Gianaroli et al. (2005) reporten un 3.1% d'haploïdia i un 3.6% de poliploïdia en una sèrie de 1029 cicles de DGP per a diverses indicacions.

La majoria dels estudis descriuen percentatges d'embrions anormals i freqüències d'aneuploidies per als cromosomes analitzats superiors als de la nostra sèrie. Es tracta de grups diferents de pacients amb altres indicacions per al DGP (altres causes d'esterilitat masculina, avortaments de repetició o dones d'edat avançada), i podria ser que els pacients amb alteracions de la meiosi presentessin aneuploidies per a altres cromosomes diferents dels estudiats. S'hauria de considerar la possibilitat que alguns cromosomes estiguessin més especialment implicats que altres en les aneuploidies d'aquests pacients, per tal de determinar quines serien les sondes més apropiades per realitzar un adequat screening d'aneuploidies en pacients amb alteracions meiótiques.

La incorporació de protocols com la multiplex-FISH (M-FISH) permet l'anàlisi de les preparacions meiótiques identificant cada un dels bivalents individualment en paquitè i en metafase I i cada cromosoma en metafase II (Sarrate et al., 2004). Aquesta tècnica permetria saber si alguns cromosomes estan més implicats que altres en les anomalies de la meiosi, en general o individualment per a cada pacient, i, per tant, permetria fer un estudi personalitzat de FISH en espermatozoides per confirmar si els cromosomes més implicats en les anomalies meiótiques són també els més freqüents en les aneuploidies espermatiques i ajustar quines sondes caldria aplicar en cada cas quan es realitzi un cicle de DGP-AS.

### 6.3.3. Resultats dels cicles de FIV-ICSI amb i sense DGP

---

Les taxes d'embaràs i d'implantació són més elevades quan transferim embrions normals per als cromosomes estudiats en pacients que realitzen DGP per anomalies meiótiques, que quan no fan DGP (52% versus 43.9% i 32.1% versus 23.5%, respectivament), tot i això les diferències no són estadísticament diferents.

Per altra banda, caldria esperar una disminució en la taxa d'avortament pel fet de transferir embrions seleccionats citogenèticament, però no s'han observat diferències estadísticament significatives en la taxa d'avortament entre els dos grups (15.4% i 10.3%).

La utilització de sondes específiques més adients per a aquests tipus de pacients podria contribuir a seleccionar millor els embrions que s'han de transferir i, per tant, aconseguir una millora en les taxes d'embaràs i d'implantació.

S'ha de tenir en compte que per dur a terme un cicle de DGP-AS és important aconseguir una bona resposta ovàrica a l'estimulació. S'ha de disposar d'un nombre suficient d'embrions perquè tingui sentit seleccionar-los no només per la seva morfologia i desenvolupament, sinó també per la seva dotació cromosòmica. En un recull de cicles de DGP per a diferents indicacions, Gianaroli et al., (2005) troben un nombre més elevat d'embrions disponibles en el grup de dones que aconseguen l'embaràs que en el grup de les que no queden embarassades, evidenciant que amb un nombre elevat d'embrions augmenten les possibilitats de selecció i, per tant, d'embaràs.

Un estudi publicat, prospectiu i randomitzat, en dones d'edat avançada no presenta cap millora en els resultats pel fet d'haver realitzat DGP en aquestes pacients (Staessen et al., 2004). Es comparen 2 grups de 200 pacients més grans de 37 anys sotmeses a FIV amb i sense DGP, havent transferit els embrions en ambdós grups en dia +5. S'aconsegueix, com en el nostre cas, una millor taxa d'implantació, tot i que les diferències no són estadísticament significatives i que la mitjana d'embrions transferits en el grup control (sense DGP) és significativament superior a la del grup de DGP. Els autors suggereixen que la utilitat d'aquesta tècnica es faria evident en els casos en què la legislació limiti el nombre d'embrions a transferir, apuntant que el DGP podria ajudar a triar el millor embrió per a la transferència. Aquesta hipòtesi podria ser vàlida també en els casos de DGP per anomalies en la meiosi masculina. El DGP podria ser útil en qualsevol cas en que calgui o es vulgui limitar el nombre d'embrions per a la transferència, i potser en el futur es plantejarà el DGP com una eina de selecció embrionària per evitar els embarassos múltiples.

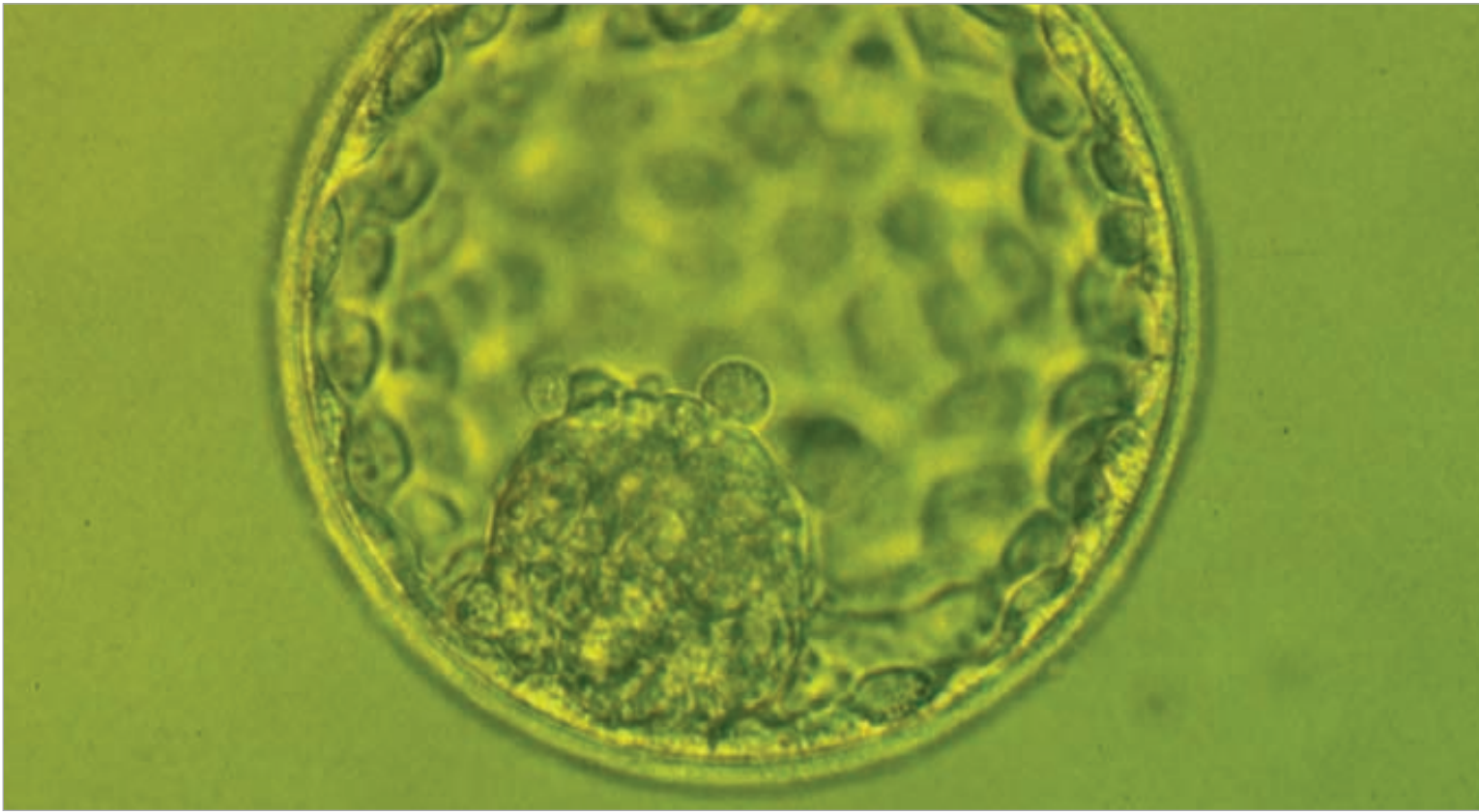
#### 6.4 Risc genètic i cribatge del pacient amb factor masculí greu

---

El fet que la incorporació de la ICSI en els laboratoris de FIV hagi permès tractar gairebé tots els factors masculins greus no implica que no sigui necessari dur a terme un estudi andrològic exhaustiu quan s'inicia l'estudi d'esterilitat de la parella. És fonamental la elaboració d'una història clínica amb una anamnesi completa, una exploració física andrològica i un estudi espermatogènic basal que inclogui determinació de volum testicular, seminograma i FSH sèrica. En els casos de factor masculí greu és imprescindible avaluar el risc genètic que presenta cada parella abans de realitzar un cicle de FIV-ICSI. En l'estudi del pacient amb oligoastenozoospermia greu, es recomanable dur a terme, a més del cariotip, estudis de meiosi, de FISH en espermatozoides o fins i tot estudis meiòtics amb M-FISH.

Tot i això, la correlació dels resultats d'aquestes proves diagnòstiques amb la taxa d'embaràs i les anomalies observades en la descendència dels pacients amb factor masculí greu s'hauran de determinar amb sèries més àmplies. El consell genètic ha de ser individualitzat en funció del risc de cada parella i ha de permetre valorar la utilitat del DGP-AS en cada cas.

És necessari donar un consell genètic acurat abans de dur a terme un cicle de FIV-ICSI, per considerar en cada cas si és recomanable fer un diagnòstic prenatal, un DGP per augmentar les probabilitats de transferir un embrió cromosòmicament normal o, fins i tot, optar per la utilització de semen de donant quan el risc genètic sigui molt elevat.



● ○ 07 · conclusions

1. Els estudis de FISH en espermatozoides mostren un increment d'espermatozoides amb anomalies cromosòmiques en els pacients estèrils estudiats. S'observa una incidència d'espermatozoides diploides més elevada tant en el grup de pacients amb astenozoospermia com en el grup amb oligoastenozoospermia. També s'observa una freqüència més elevada d'espermatozoides amb disomies per als cromosomes sexuals en els pacients amb oligoastenozoospermia.
2. Existeix una gran variabilitat en la freqüència de disomies per als cromosomes X, Y i 18 i en la freqüència de diploidies entre els diferents individus estudiats, fet que justifica els estudis de FISH en espermatozoides per determinar la incidència d'anomalies en cada pacient.
3. No s'observen diferències estadísticament significatives en les taxes de fecundació, embaràs, implantació i avortament entre els pacients amb oligoastenozoospermia greu que presenten alteracions de la meiosi i els que no les presenten.
4. Els resultats derivats dels estudis de DGP mostren que els embrions de pacients amb meiosi masculina alterada presenten un elevat percentatge d'anomalies cromosòmiques, comparable als descrits en sèries de DGP per altres causes de factor masculí.
5. Els resultats dels cicles de FIV-ICSI en pacients amb anomalies de la meiosi, en els quals es seleccionen els embrions mitjançant DGP, mostren un increment en les taxes d'implantació i d'embaràs, malgrat que les diferències no són estadísticament significatives.
6. Els estudis de meiosi i de FISH en espermatozoides són recomanables en pacients amb oligoastenozoospermia greu abans de dur a terme un cicle de FIV-ICSI, per tal de donar un consell genètic individualitzat en funció del risc de cada parella.



● ○ 08 · bibliografia

A

Aytoz A, Camus M, Tournaye H, Bonduelle M, Van Steirteghem A, Devroey P (1998) Outcome of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection and the effect of sperm origin and quality on this outcome. *Fertil Steril* 70:500-505

B

Baarends WM, van der Laan R, Grootegoed JA (2001) DNA repair mechanisms and gametogenesis. *Reproduction* 121:31-39

Barlow P, Vosa CG (1970) The Y chromosome in human spermatozoa. *Nature* 226:961-962

Barri PN. (1993) Respuesta anómala a la estimulación de la maduración folicular en fecundación in vitro. Tesis doctoral

Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR (1996) Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 11:2217-2222

Beatty RA (1977) F-bodies as Y chromosome markers in mature human sperm heads: a quantitative approach. *Cytogenet Cell Genet* 18:33-49

Bergh T, Ericson A, Hillensjo T, Nygren KG, Wennerholm UB (1999) Deliveries and children born after in-vitro fertilisation in Sweden 1982-95: a retrospective cohort study. *Lancet* 354:1579-1585

Bernardini L, Gianaroli L, Fortini D, Conte N, Magli C, Cavani S, Gaggero G, Tindiglia C, Ragni N, Venturini PL (2000) Frequency of hyper-, hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients. *Hum Reprod* 15:2165-2172

Bischoff FZ, Nguyen DD, Burt KJ, Shaffer LG (1994) Estimates of aneuploidy using multicolor fluorescence in situ hybridization on human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 66:237-243

Blanco J, Egozcue J, Vidal F (1996) Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 11:722-726

Blanco J, Rubio C, Simon C, Egozcue J, Vidal F (1997) Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,YYY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Hum Genet* 99:413-416

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: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenet Cell Genet* 83:275-280

- Boada M, Carrera M, De La Iglesia C, Sandalinas M, Barri PN, Veiga A (1998) Successful use of a laser for human embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis: report of two cases. *J Assist Reprod Genet* 15:302-307
- Bobrow M, Madan K, Pearson PL (1972) Staining of some specific regions of human chromosomes, particularly the secondary constriction of No. 9. *Nat New Biol* 238:122-124
- Bonduelle M, Legein J, Derde MP, Buysse A, Schietecatte J, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I (1995) Comparative follow-up study of 130 children born after intracytoplasmic sperm injection and 130 children born after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 10:3327-3331
- Bonduelle M, Legein J, Buysse A, Van Assche E, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC, Liebaers I (1996) Prospective follow-up study of 423 children born after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 11:1558-1564
- Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I (2002a) Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 17:2600-2614
- Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, Derde MP, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A (2002b) Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Hum Reprod* 17:671-694
- Bonduelle M, Bergh C, Niklasson A, Palermo GD, Wennerholm UB (2004) Medical follow-up study of 5-year-old ICSI children. *Reprod Biomed Online* 9:91-101
- Bonduelle M, Wennerholm UB, Loft A, Tarlatzis BC, Peters C, Henriët S, Mau C, Victorin-Cederquist A, Van Steirteghem A, Balaska A, Emberson JR, Sutcliffe AG (2005) A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Hum Reprod* 20:413-419

©

- Calderon G, Belil I, Aran B, Veiga A, Gil Y, Boada M, Martinez F, Parera N, Coroleu B, Penella J, et al. (1995) Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in-vitro fertilization: first results. *Hum Reprod* 10:2835-2839
- Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Burrello N, Palermo I, Gulisano A, Pafumi C, D'Agata R (2001a) High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. *Hum Reprod* 16:1433-1439
- Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Romeo R, Rappazzo G, D'Agata R (2001b) Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum Reprod* 16:1172-1179



- Carreras O, Pascual MA, Hereter L, Barri PN. (1994) 4000 punciones ecográficas para el programa de FIV del Institut Universitari Dexeus. Libro XVII reunión nacional de la sección de ecografía de la SEGO: 65
- Colombero LT, Hariprashad JJ, Tsai MC, Rosenwaks Z, Palermo GD (1999) Incidence of sperm aneuploidy in relation to semen characteristics and assisted reproductive outcome. *Fertil Steril* 72:90-96
- Coroleu B, Carreras O, Veiga A, Martell A, Martinez F, Belil I, Hereter L, Barri PN (2000) Embryo transfer under ultrasound guidance improves pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 15:616-620
- Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B (2002) Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 71:162-164
- Chang AS, Moley KH, Wangler M, Feinberg AP, Debaun MR (2005) Association between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series of 19 patients. *Fertil Steril* 83:349-354
- Chang MC (1959) Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature* 184(Suppl 7):466-467
- Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Pelletier R, Cozzi J, Sele B (1995) Meiotic segregation of the X and Y chromosomes and chromosome 1 analyzed by three-color FISH in human interphase spermatozoa. *Cytogenet Cell Genet* 71:126-130
- Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz-Romero J, Verlingue C, Claustres M, et al. (1995) Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 332:1475-1480
- Ⓓ
- De Braekeleer M, Dao TN (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6:245-250
- DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP (2003) Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 72:156-160
- Devroey P, Van Steirteghem A (2004) A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update* 10:19-28
- Downie SE, Flaherty SP, Swann NJ, Matthews CD (1997) Estimation of aneuploidy for chromosomes 3, 7, 16, X and Y in spermatozoa from 10 normospermic men using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 3:815-819

E

- Edelmann W, Cohen PE, Kane M, Lau K, Morrow B, Bennett S, Umar A, Kunkel T, Cattoretti G, Chaganti R, Pollard JW, Kolodner RD, Kucherlapati R (1996) Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell* 85:1125-1134
- Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF, Williamson E, Wood PJ (1982) Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril* 38:447-453
- Egozcue J, Templado C, Vidal F, Navarro J, Morer-Fargas F, Marina S (1983) Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum Genet* 65:185-188
- Egozcue J, Blanco J, Vidal F (1997) Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 3:441-452
- Egozcue J, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Sarrate Z, Vidal F (2003) Genetic analysis of sperm and implications of severe male infertility--a review. *Placenta* 24 Suppl B:S62-65
- Egozcue J, Sarrate Z, Codina-Pascual M, Egozcue S, Oliver-Bonet M, Blanco J, Navarro J, Benet J, Vidal F (2005) Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet Genome Res* 111:337-342
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J (2000) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 6:93-105
- Eiben B, Bartels I, Bahr-Porsch S, Borgmann S, Gatz G, Gellert G, Goebel R, Hammans W, Hentemann M, Osmers R, et al. (1990) Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet* 47:656-663
- ESHRE Task Force on Intracytoplasmic Sperm Injection. European Society for Human Reproduction and Embryology.(1998) Assisted reproduction by intracytoplasmic sperm injection: a survey on the clinical experience in 1994 and the children born after ICSI, carried out until 31 December 1993. *Hum Reprod* 13:1737-1746
- Evans EP, Breckon G, Ford CE (1964) An Air-Drying Method For Meiotic Preparations From Mammalian Testes. *Cytogenetics* 15:289-294

F

- Foresta C, Moro E, Ferlin A (2001) Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 22:226-239

## G

- Gardner RJM, Sutherland GR. (2004) Gametogenesis and conception, pregnancy loss and fertility. En: Chromosome abnormalities and genetic counselling. Oxford University Press, New York: 339-360
- Genesca A, Miro R, Caballin MR, Benet J, Germa JR, Egozcue J (1990) Sperm chromosome studies in individuals treated for testicular cancer. *Hum Reprod* 5:286-290
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munne S (1999) Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* 72:837-844
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Iammarrone E (2000) Preimplantation diagnosis after assisted reproduction techniques for genetically-determined male infertility. *J Endocrinol Invest* 23:711-716
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trombetta C, Boudjema E (2002) The role of preimplantation diagnosis for aneuploidies. *Reprod Biomed Online* 4 Suppl 3:31-36
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trengia V, Farfalli V, Cavallini G (2005) The beneficial effects of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy support extensive clinical application. *Reprod Biomed Online* 10:633-640
- Goldman AS, Hulten MA (1993) Analysis of chiasma frequency and first meiotic segregation in a human male reciprocal translocation heterozygote, t(1;11)(p36.3;q13.1), using fluorescence in situ hybridisation. *Cytogenet Cell Genet* 63:16-23
- Govaerts I, Devreker F, Koenig I, Place I, Van den Bergh M, Englert Y (1998) Comparison of pregnancy outcome after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 13:1514-1518
- Griffin DK, Wilton LJ, Handyside AH, Winston RM, Delhanty JD (1992) Dual fluorescent in situ hybridisation for simultaneous detection of X and Y chromosome-specific probes for the sexing of human preimplantation embryonic nuclei. *Hum Genet* 89:18-22
- Guttenbach M, Schmid M (1990) Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 46:553-558
- Guttenbach M, Schmid M (1991) Non-isotopic detection of chromosome 1 in human meiosis and demonstration of disomic sperm nuclei. *Hum Genet* 87:261-265
- Guttenbach M, Martinez-Exposito MJ, Michelmann HW, Engel W, Schmid M (1997) Incidence of diploid and disomic sperm nuclei in 45 infertile men. *Hum Reprod* 12:468-473

## H

- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM (1990) Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344:768-770
- Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S (2002) The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med* 346:725-730
- Hardarson T, Lundin K, Hamberger L (2000) The position of the metaphase II spindle cannot be predicted by the location of the first polar body in the human oocyte. *Hum Reprod* 15:1372-1376
- Hassold T, Jacobs P, Kline J, Stein Z, Warburton D (1980) Effect of maternal age on autosomal trisomies. *Ann Hum Genet* 44:29-36
- Hassold TJ, Sherman SL, Pettay D, Page DC, Jacobs PA (1991) XY chromosome nondisjunction in man is associated with diminished recombination in the pseudoautosomal region. *Am J Hum Genet* 49:253-260
- Hassold T, Pettay D, Robinson A, Uchida I (1992) Molecular studies of parental origin and mosaicism in 45,X conceptuses. *Hum Genet* 89:647-652
- Hassold TJ (1996) Mismatch repair goes meiotic. *Nat Genet* 13:261-262
- Hill JA, Anderson DJ (1990) Immunological mechanisms in recurrent spontaneous abortion. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 38:111-119
- Holmes JM, Martin RH (1993) Aneuploidy detection in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 91:20-24
- Hultén M, Eliasson R, Tillinger KG (1970) Low chiasma count and other meiotic irregularities in two infertile 46, XY men with spermatogenic arrest. *Hereditas* 65:285-290
- Hultén M, Barlow A Tease C. (2001) Meiotic studies in human. En: Rosney DE (ed) *Human Cytogenetics: Constitutional Analysis. A partial approach*. Oxford University press, Oxford, 211-236

## I

- In't Veld P, Brandenburg H, Verhoeff A, Dhont M, Los F (1995) Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 346:773
- In't Veld PA, Broekmans FJ, de France HF, Pearson PL, Pieters MH, van Kooij RJ (1997) Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. *Hum Reprod* 12:752-754

## J

Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H (1992) Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet* 29:103-108

Jacobs PA, Hassold TJ (1995) The origin of numerical chromosome abnormalities. *Adv Genet* 33:101-133

Joseph AM, Gosden JR, Chandley AC (1984) Estimation of aneuploidy levels in human spermatozoa using chromosome specific probes and in situ hybridisation. *Hum Genet* 66:234-238

Judis L, Chan ER, Schwartz S, Seftel A, Hassold T (2004) Meiosis I arrest and azoospermia in an infertile male explained by failure of formation of a component of the synaptonemal complex. *Fertil Steril* 81:205-209

## K

Kahraman S, Kumtepe Y, Sertyel S, Donmez E, Benkhalifa M, Findikli N, Vanderzwalmen P (2002) Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility. *Hum Reprod* 17:3193-3200

Kahraman S, Findikli N, Berkil H, Bakircioglu E, Donmez E, Sertyel S, Biricik A (2003) Results of preimplantation genetic diagnosis in patients with Klinefelter's syndrome. *Reprod Biomed Online* 7:346-352

Kahraman S, Sertyel S, Findikli N, Kumtepe Y, Oncu N, Melil S, Unal S, Yelke H, Vanderzwalmen P (2004) Effect of PGD on implantation and ongoing pregnancy rates in cases with predominantly macrocephalic spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 9:79-85

Klasen M, Schmid M (1981) An improved method for Y-body identification and confirmation of a high incidence of YY sperm nuclei. *Hum Genet* 58:156-161

Kuliev A, Verlinsky Y (2002) Current features of preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online* 5:294-299

Kurinczuk JJ (2003) Safety issues in assisted reproduction technology. From theory to reality- just what are the data telling us about ICSI offspring health and future fertility and should we be concerned? *Hum Reprod* 18:925-931

## L

Lassalle B, Testart J, Renard JP (1985) Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. *Fertil Steril* 44:645-651

- Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J (2001) Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 76:479-484
- Liebaers I, Bonduelle M, Van Assche E, Devroey P, Van Steirteghem A (1995) Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 346:1095
- Ludwig M, Diedrich K (2002) Follow-up of children born after assisted reproductive technologies. *Reprod Biomed Online* 5:317-322
- Ludwig M, Katalinic A (2002) Malformation rate in fetuses and children conceived after ICSI: results of a prospective cohort study. *Reprod Biomed Online* 5:171-178

(M)

- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Gordts S, Feliciani E (2002) Impact of parental gonosomal mosaicism detected in peripheral blood on preimplantation embryos. *Reprod Biomed Online* 5:306-312
- Makler A (1978) A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoal motility determination. *Fertil Steril* 30:192-199
- Manning M, Lissens W, Bonduelle M, Camus M, De Rijcke M, Liebaers I, Van Steirteghem A (2000) Study of DNA-methylation patterns at chromosome 15q11-q13 in children born after ICSI reveals no imprinting defects. *Mol Hum Reprod* 6:1049-1053
- Martin RH, Lin CC, Balkan W, Burns K (1982) Direct chromosomal analysis of human spermatozoa: preliminary results from 18 normal men. *Am J Hum Genet* 34:459-468
- Martin RH, Ko E, Rademaker A (1991) Distribution of aneuploidy in human gametes: comparison between human sperm and oocytes. *Am J Med Genet* 39:321-331
- Martin RH, Ko E, Chan K (1993) Detection of aneuploidy in human interphase spermatozoa by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Cytogenet Cell Genet* 64:23-26
- Martin RH (1996) The risk of chromosomal abnormalities following ICSI. *Hum Reprod* 11:924-925
- Martin RH (1998) Genetics of human sperm. *J Assist Reprod Genet* 15:240-245
- Martin RH, Rademaker AW, Greene C, Ko E, Hoang T, Barclay L, Chernos J (2003) A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. *Biol Reprod* 69:535-539
- McElreavey K, Krausz C (1999) Sex Chromosome Genetics '99. Male infertility and the Y chromosome. *Am J Hum Genet* 64:928-933

- Menézo Y, Veiga A. (1997) Cryopreservation of blastocysts. In vitro fertilization and Assisted Reproduction. Proceedings of the 10<sup>th</sup> World Congress of in vitro Fertilization and Assisted Reproduction. Gomel V, Leung PCK. Vancouver, 49-53
- Meschede D, Horst J (1997) Genetic counselling for infertile male patients. *Int J Androl* 20 Suppl 3:20-30
- Meschede D, Lemcke B, Exeler JR, De Geyter C, Behre HM, Nieschlag E, Horst J (1998) Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection-prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. *Hum Reprod* 13:576-582
- Miharu N, Best RG, Young SR (1994) Numerical chromosome abnormalities in spermatozoa of fertile and infertile men detected by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 93:502-506
- Moosani N, Pattinson HA, Carter MD, Cox DM, Rademaker AW, Martin RH (1995) Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 64:811-817
- Mroz K, Hassold TJ, Hunt PA (1999) Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors. *Hum Reprod* 14:1151-1156
- Munne S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, Tucker M, Marquez C, Sable D, Ferraretti AP, Massey JB, Scott R (1999) Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod* 14:2191-2199
- Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L, Cohen J (2000) Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril* 73:1209-1218
- Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Marquez C, Cohen J (2002) Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reprod Biomed Online* 4:223-232
- Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, Cohen J, Sable D (2003) Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 7:91-97
- Ⓝ
- Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde MC, Devroey P, Van Steirteghem AC (1995) The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 10:1123-1129

Novero V, Camus M, Tournaye H, Smitz J, Verheyen G, Joris H, Derde MP, Van Steirteghem AC, Devroey P (1997) Relationship between serum follicle stimulating hormone in the male and standard sperm parameters, and the results of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12:59-63

○

Ord T, Patrizio P, Mareello E, Balmaceda JP, Asch RH (1990) Mini-Percoll: a new method of semen preparation for IVF in severe male factor infertility. *Hum Reprod* 5:987-989

○

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340:17-18

Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, Kearns 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* 14:1266-1273

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

Parriego M, Solé M, Vidal F, Boada M, Santaló J, Egozcue J, Veiga A, Barri PN (2003) One- or two-cell biopsy: does it affect implantation potential in PGD? Abstract book TWIN-Meting Alpha-Andrology: 30

Patrizio P (1995) Intracytoplasmic sperm injection (ICSI): potential genetic concerns. *Hum Reprod* 10:2520-2523

Pawlowitzki IH, Pearson PL (1972) Chromosomal aneuploidy in human spermatozoa. *Humangenetik* 16:119-122

Pearson P, Ellis JD, Evans HJ (1970) A gross reduction in chiasma formation during meiotic prophase and a defective DNA repair mechanism associated with a case of human male infertility. *Cytogenetics* 9:460-467

Pearson P (1972) The use of new staining techniques for human chromosome identification. *J Med Genet* 9:264-275

Pfeffer J, Pang MG, Hoegerman SF, Osgood CJ, Stacey MW, Mayer J, Oehninger S, Kearns WG (1999) Aneuploidy frequencies in semen fractions from ten oligoasthenoteratozoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 72:472-478



Pieters MH, Geraedts JP, Meyer H, Dumoulin JC, Evers JL, Jongbloed RJ, Nederlof PM, van der Flier S (1990) Human gametes and zygotes studied by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 53:15-19

Ⓡ

Reubinoff BE, Abeliovich D, Werner M, Schenker JG, Safran A, Lewin A (1998) A birth in non-mosaic Klinefelter's syndrome after testicular fine needle aspiration, intracytoplasmic sperm injection and preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 13:1887-1892

Rieder CL, Schultz A, Cole R, Sluder G (1994) Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J Cell Biol* 127:1301-1310

Robbins WA, Segraves R, Pinkel D, Wyrobek AJ (1993) Detection of aneuploid human sperm by fluorescence in situ hybridization: evidence for a donor difference in frequency of sperm disomic for chromosomes 1 and Y. *Am J Hum Genet* 52:799-807

Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Minguez Y, Remohi J, Pellicer A (2001) Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 16:2084-2092

Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J, Pellicer A (2003) Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 18:182-188

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

Ⓢ

Santaló J, Estop AM, Egozcue J (1986) The chromosome complement of first-cleavage mouse embryos after in vitro fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 3:99-105

Sarrate Z, Blanco J, Egozcue S, Vidal F, Egozcue J (2004) Identification of meiotic anomalies with multiplex fluorescence in situ hybridization: Preliminary results. *Fertil Steril* 82:712-717

Sermon K, Van Steirteghem A, Liebaers I (2004) Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet* 363:1633-1641

Sermon K, Moutou C, Harper J, Geraedts J, Scriven P, Wilton L, Magli MC, Michiels A, Viville S, De Die C (2005) ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001. *Hum Reprod* 20:19-34

Silber SJ, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Lissens W, Ferec C, Liebaers I, Devroey P, Van Steirteghem AC (1995) The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility. *Hum Reprod* 10:2031-2043

Silber S, Escudero T, Lenahan K, Abdelhadi I, Kilani Z, Munne S (2003) Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 79:30-38

Soares SR, Templado C, Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2001) Numerical chromosome abnormalities in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 of paternal origin: generalised tendency to meiotic non-disjunction. *Hum Genet* 108:134-139

Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH (1995) Aneuploidy in human sperm: results of two- and three-color fluorescence in situ hybridization using centromeric probes for chromosomes 1, 12, 15, 18, X, and Y. *Cytogenet Cell Genet* 71:47-53

Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH (1996) Aneuploidy in human sperm: the use of multicolor FISH to test various theories of nondisjunction. *Am J Hum Genet* 58:356-362

Staessen C, Coonen E, Van Assche E, Tournaye H, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC, Liebaers I (1996) Preimplantation diagnosis for X and Y normality in embryos from three Klinefelter patients. *Hum Reprod* 11:1650-1653

Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, Michiels A, Van Landuyt L, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A (2003) PGD in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients. *Hum Reprod Update* 9:319-330

Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A (2004) Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 19:2849-2858

Steptoe PC, Edwards RG (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2:366

Surani MA (2002) Genetics: immaculate misconception. *Nature* 416:491-493

Ⓟ

Tarkowski A. (1966) An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 5: 394-400

Templado C, Vidal F, Marina S, Pomerol JM, Egozcue J (1981) A new meiotic mutation: desynapsis of individual bivalents. *Hum Genet* 59:345-348

Templado C, Navarro J, Requena R, Benet J, Ballesta F, Egozcue J (1990) Meiotic and sperm chromosome studies in a reciprocal translocation t(1;2)(q32;q36). *Hum Genet* 84:159-162

Templado C, Marquez C, Munne S, Colls P, Martorell MR, Ciepły K, Benet J, Van Kirk V, Navarro J, Estop AM (1996) An analysis of human sperm chromosome aneuploidy. *Cytogenet Cell Genet* 74:194-200

Tesarik J (1995) Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 346:1096

U

Ushijima C, Kumasako Y, Kihale PE, Hirotsuru K, Utsunomiya T (2000) Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 15:1107-1111

V

Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I, Van Steirteghem A (2000) Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 15:351-365

Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Calderon G, Egozcue S, Egozcue J, Barri PN (1999) Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Hum Reprod* 14:375-378

Vendrell JM, Aran B, Veiga A, Garcia F, Coroleu B, Egozcue S, Egozcue J, Barri PN (2003) Spermatogenic patterns and early embryo development after intracytoplasmic sperm injection in severe oligoasthenozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 20:106-112

Vidal F, Moragas M, Catala V, Torello MJ, Santalo J, Calderon G, Gimenez C, Barri PN, Egozcue J, Veiga A (1993) Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. *Hum Reprod* 8:1740-1743

Vidal F, Gimenez C, Rubio C, Simon C, Pellicer A, Santalo J, Egozcue J (1998) FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J Assist Reprod Genet* 15:310-313

Vogt PH (1998) Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod* 4:739-744

W

- Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL (2001a) Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy. *Hum Reprod* 16:2374-2378
- Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL (2001b) The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertil Steril* 75:348-353
- Warren AC, Chakravarti A, Wong C, Slaugenhaupt SA, Halloran SL, Watkins PC, Metaxotou C, Antonarakis SE (1987) Evidence for reduced recombination on the nondisjoined chromosomes 21 in Down syndrome. *Science* 237:652-654
- Wennerholm UB, Bergh C, Hamberger L, Lundin K, Nilsson L, Wikland M, Kallen B (2000a) Incidence of congenital malformations in children born after ICSI. *Hum Reprod* 15:944-948
- Wennerholm UB, Bergh C, Hamberger L, Westlander G, Wikland M, Wood M (2000b) Obstetric outcome of pregnancies following ICSI, classified according to sperm origin and quality. *Hum Reprod* 15:1189-1194
- Wilton L (2002) Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review. *Prenat Diagn* 22:512-518
- Williams BJ, Ballenger CA, Malter HE, Bishop F, Tucker M, Zwingman TA, Hassold TJ (1993) Non-disjunction in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two and three probes. *Hum Mol Genet* 2:1929-1936
- Wyrobek AJ, Alhborn T, Balhorn R, Stanker L, Pinkel D (1990) Fluorescence in situ hybridization to Y chromosomes in decondensed human sperm nuclei. *Mol Reprod Dev* 27:200-208

Y

- Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ (1976) The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 15:471-476
- Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut I, Sinclair KD (2001) Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 27:153-154

 **Barcelona**, desembre 2005