

Fig. 52.- Embrió amb tres pro-nuclis, la qual cosa indica una dispèrmia. Els dos pro-nuclis majors són els dels espermatozoides mentre que el més petit és el d'origen femení.

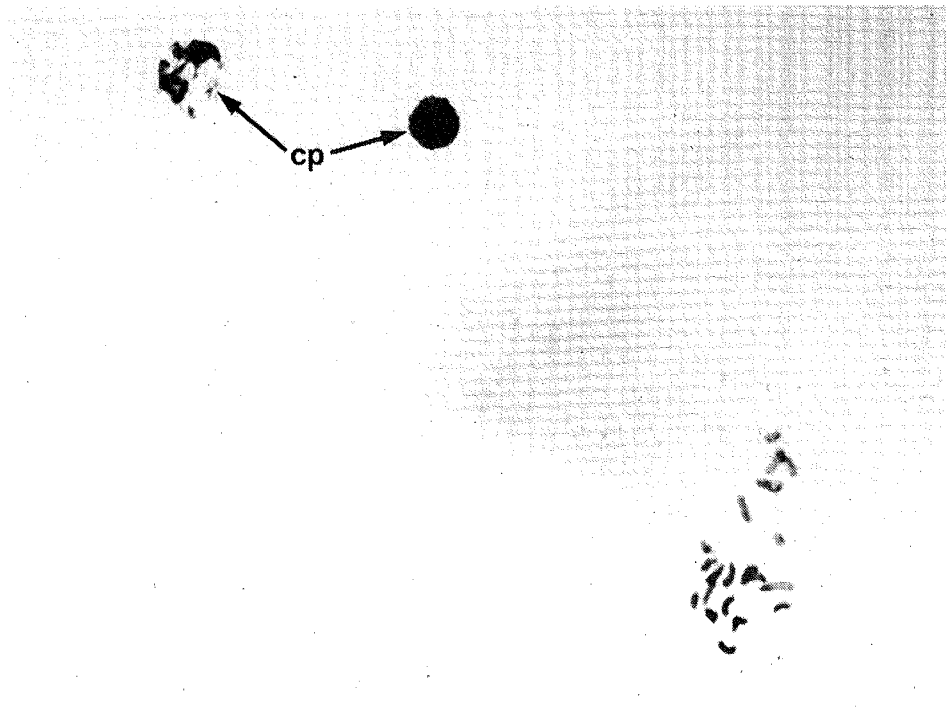


Fig. 53.- Embrió partenogenètic, amb un únic complement d'origen femení. S'observen clarament els dos corpuscles polars (cp) ja que l'activació partenogenètica ha fet acabar la meiosi femenina sense l'estímul de la penetració de l'espermatozoide. Per tant, els cromosomes presenten l'aspecte de somàtics.

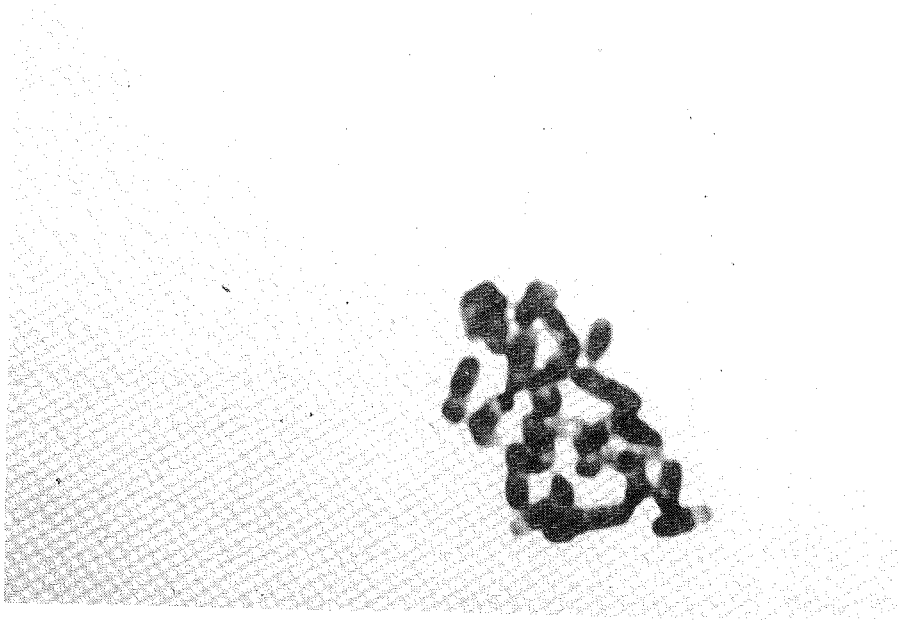


Fig. 54.- Complement cromosòmic no analitzable donada la baixa qualitat de l'extensió que ha provocat un gran nombre de superposicions les quals impedeixen una anàlisi acurada de llur constitució cromosòmica.

### 3.6. Anàlisi estadística

Un cop reunides totes les dades s'ha procedit a l'anàlisi estadística per a determinar l'existència de diferències significatives (no a causa de l'atzar) entre les dues poblacions, in vivo i in vitro.

Per aconseguir-ho s'ha triat el test de dependència o independència de factors mitjançant les taules de contingència de 2x2 amb la correcció per a la continuïtat (correcció de Yates) de les quals s'obtenen els estadígrafs de prova de la  $\chi^2_C$ .

La correcció de Yates s'ha d'aplicar perquè les dades que es manegen són essencialment discontinües, mentre que les taules de la  $\chi^2$  que es consulten estan calculades a partir de la distribució original contínua. Això dona com a resultat la tendència a subestimar la probabilitat final i, per tant, a acceptar més freqüentment algunes diferències com a significatives quan, en realitat, no ho serien. Aquesta tendència es pot corregir reduint el valor calculat de la  $\chi^2$  amb la fórmula següent:

$$\chi^2_C = \frac{(|\text{Obs.} - \text{Esp.}| - 1/2)^2}{\text{Esp.}}$$

Aquest ajust és vàlid només quan existeix un grau de llibertat però no ha d'emprar-se quan es treballa amb diversos valors de  $\chi^2$  combinats.

La correcció de la continuïtat té un gran interès i és gairebé obligada quan les freqüències són baixes i, en canvi, afecta en menor mesura en mostres de mida gran (Snedecor, 1970).

Per altra banda, quan una de les freqüències és nul·la és més correcte el càlcul exacte de la P. Si simplifiquem la taula de contingència de 2x2 de la següent manera:

	F	$\bar{F}$	Suma
Exp. 1	x	y	a'
Exp. 2	z	u	b'
Suma	a	b	n

La P es calcula, en general, com:

$$P = \frac{a! b! a'! b'!}{x! y! z! u! n!} + \frac{a! b! a'! b'!}{(x-1)! (y+1)! (z+1)! (u-1)! n!} + \dots$$

$$+ \frac{a! b! a'! b'!}{0! (y+x)! (z+x)! (u-x)! n!}$$

essent  $x$  el valor mínim.

Quan  $x=0$ ,  $P$  és igual a l'últim terme d'aquesta suma (Ehrenberg, 1977).

El nivell de significació triat ( $\alpha$ ) és del 5% però els casos en els que la diferència és marcadament significativa es consigna el major nivell de confiança assolit.

En general es considera que si:

$P > 0.05$	la diferència no és significativa
$0.01 < P < 0.05$	la diferència és significativa
$0.001 < P < 0.01$	la diferència és clarament significativa
$P < 0.001$	la diferència és altament significativa

(Ehrenberg, 1977)

Cal tenir en compte que aquest tipus d'anàlisi no és vàlida quan es realitza amb freqüències relatives, i, si bé d'aquestes se'n poden fer estimacions de les absolutes, significa introduir factors d'incertesa en l'anàlisi efectuada. Per aquesta raó, en el cas concret de les aneuploidies, no s'ha realitzat el test d'independència de factors ja que la freqüència que apareix en les dades només és una estimació teòrica del seu valor real; en canvi el test s'ha desenvolupat amb la freqüència d'hiperploidies que apareixen com freqüències absolutes.

### 3.7. Recopilació de dades

#### 3.7.1. Característiques generals de la mostra

Les característiques generals de la mostra estan recollides en la Taula 1.

En els experiments in vivo es van acoplar cent quatre femelles amb cinquanta dos mascles rendint 1.291 oòcits fecundats, dels quals ha estat possible analitzar-ne 1.022. La resta no ho ha estat per les raons esmentades anteriorment (veure 3.5.3.2.).

Per als experiments in vitro s'han emprat noranta sis femelles i quaranta vuit mascles com a donadors d'oòcits i espermatozoides, respectivament. S'han obtingut 1.284 embrions d'entre els quals 1.033 eren prou bons com per a fer-ne l'anàlisi citogenètica.

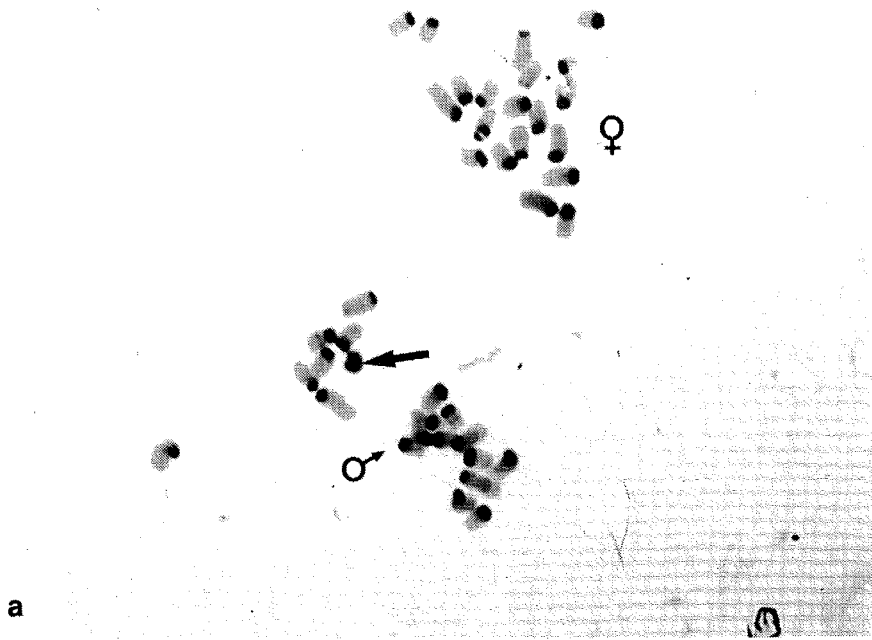
La freqüència de fertilització (nombre d'oòcits fecundables/nombre d'oòcits fecundats) ha estat enregistrada en cadascun dels experiments i la seva mitjana apareix a la Taula 1. La freqüència de fertilització in vivo ha hagut de ser determinada ja que en el ratolí rarament s'assoleix el valor 100% (Hartmann, 1983). Com sigui que el valor in vivo és del 82.60% i el in vitro 81.82%, l'eficiència de fecundació de la FIV en relació a la in vivo se situa en un nivell del 99%. Aquest és un valor molt bo que abona la validesa dels resultats obtinguts, car en general es consideren anòmales les freqüències inferiors al 80% (Wolf, 1976).

Una petita part de la mostra, 102 embrions fecundats in vivo i 169 in vitro s'han bandejat amb bandes C que permeten identificar el cromosoma Y com a C- (fig. 55) i, per tant, determinar la relació de sexes. Aquesta relació ( $\sigma$ :  $\text{♀}$ ) és de 1.04 in vivo i 1.22 in vitro. Els complements cromosòmics incomplets han estat descartats per la determinació del sexe malgrat s'hi hagi observat un cromosoma Y. Cas de no fer-ho així apareixeria un augment artefactual de complements masculins. No s'ha detectat cap diferència significativa en la relació de sexes embrionaris.

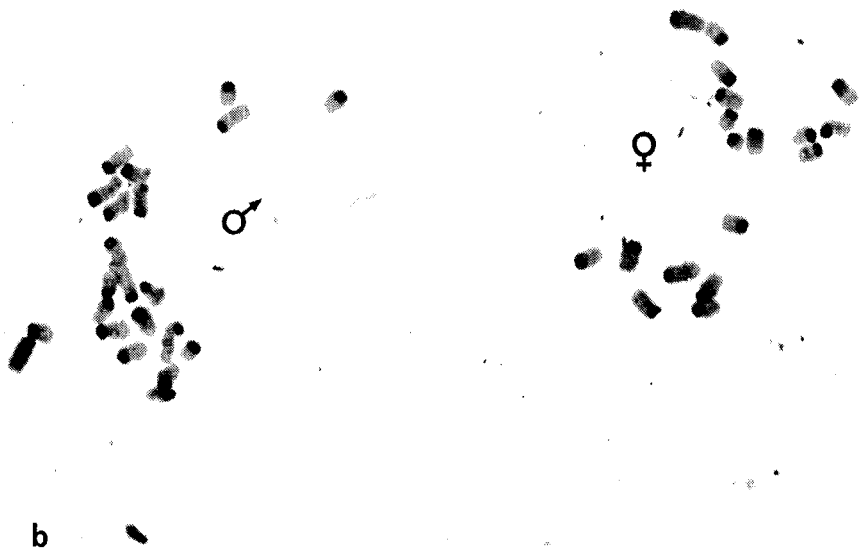
Fig. 55.- Cromosomes de la primera divisió embrionària de ratolí tenyits amb bandes C, mitjançant les quals es pot determinar el sexe de l'embrió.

a- embrió mascle. El cromosoma Y s'assenyala amb una fletxa en el complement d'origen patern.

b- embrió femella. En el complement d'origen patern no s'observa cap cromosoma Y (dos dels cromosomes del complement femení s'han desplaçat per efecte de la fixació cap al masculí).



a



b



### 3.7.2. Anomalies numèriques i estructurals

Les anomalies numèriques i estructurals detectades estan reflectides en la Taula 2. Aquesta inclou aneuploïdies, pòlipoïdies i anomalies estructurals tan in vivo com in vitro.

#### ANEUPLOÏDIES

El nombre d'hiperploïdies és la suma del de trisomies ( $2n+1$ ) més el d'altres hiperploïdies observades.

El nombre d'altres hiperploïdies ha estat determinat incloent-hi els embrions que presentaven entre 41 i 45 cromosomes. Aquests límits han estat fixats arbitràriament per tal de distingir els embrions amb trisomies múltiples dels embrions triploides que haguessin sofert una pèrdua cromosòmica per efecte de la fixació.

La incidència de les hipoploïdies ( $2n-1$ ) no s'ha determinat directament sinó que és una estimació que l'equipara a la d'hiperploïdies.

Aquesta aproximació és necessària perquè les superposicions i pèrdues cromosòmiques durant l'extensió augmenten artificialment el nivell d'hiperploïdies detectades. Ha estat freqüentment utilitzada per diferents autors i es basa en el fet de que, al nostre sistema, ambdues són el resultat de la no disjunció i que per tant l'aparició de l'una va sempre acompanyada de l'altra.

S'ha suggerit que el nombre de monosomies excediria el de trisomies en embrions pre-implantacionals més avançats a causa de l'aparició per pèrdua anafàsica durant les divisions mitòtiques successives (Bond, 1983), però no és aquest el nostre cas.

Per tant, el nivell total d'aneuploïdies és la suma de la freqüència d'aparició de les hiperploïdies més el de les hipoploïdies (el doble de les hiperploïdies).

De 1.022 embrions analitzats in vivo, 43 són hiperploides (36 trisomies i 7 d'altres hiperploïdies) la qual cosa representa un 4.21% i un nivell d'aneuploïdies d'un 8.42%. Per altra banda de 1.033 estudiats in vitro 28 són hiperploides (24 trisomies i 4 d'altres hiperploïdies) amb una

TAULA 2.- Dades de la incidència del nombre total d'anomalies cromosòmiques trobades en els embrions de ratolí fecundats in vivo i in vitro.

	<u>IN VIVO</u> (%)	<u>IN VITRO</u> (%)
<u>Aneuploïdia</u>	(8.41)	(5.42)
. Hiperploïdia	43 (4.21)	28 (2.71)
Trisomia	36 (3.52)	24 (2.32)
Altres hiperploïdies	7 (0.68)	4 (0.39)
. Hipoploïdia	(4.21)	(2.71)
<u>Poliploïdia</u>	106 (10.37)	147 (14.23)
<u>Anomalies estructurals</u>	18 (1.76)	18 (1.74)
TOTAL	(20.74)	(21.39)

incidència de 2.71% d'hiperploïdia i 5.42% d'aneuploïdia.

No s'han detectat diferències significatives entre la freqüència d'hiperploïdies dels embrions fecundats in vivo (4.21) i in vitro (2.71).

#### POLIPLOÏDIES

Del total d'embrions analitzats in vivo, 106 (10.37%) són poliploides ja siguin triploides, tetraploides o pentaploides, mentre que dels fecundats in vitro se n'observen 147 (14.23%).

Aquestes diferències impliquen un increment significatiu ( $P < 0.025$ ) en els embrions obtinguts per FIV en relació als fertilitzats in vivo, que es comentarà en la discussió.

#### ANOMALIES ESTRUCTURALS

Les anomalies estructurals inclouen fragments, anells i fusions centrals obtingut-se la mateixa freqüència d'aparició tant in vivo (1.76%) com in vitro (1.74%) amb 18 embrions detectats en cada un.

#### FREQÜÈNCIA TOTAL

La freqüència total d'anomalies és la suma de les freqüències d'aneuploïdies, poliploïdies i anomalies estructurals (20.74% in vivo i 21.39% in vitro) i es refereix a la proporció d'embrions anòmals obtinguts en cada sèrie.

#### 3.7.3. Origen de les poliploïdies

La Taula 3 evidencia l'origen dels poliploides incloent-s'hi triploides, tetraploides i pentaploides. Quan només s'ha detectat un complement cromosòmic ( $3n$ ,  $4n$  o  $5n$ ) no es podia determinar la causa de la poliploïdia i per tant s'ha enregistrat com d'origen incert.

Els poliploides es poden originar, com ja hem vist, per tres mecanismes: polispèrmia, espermatozoide diploide i oòcit diploide.

Les freqüències de cada un d'aquests possibles orígens apareixen referits

TAULA 3.- Origen dels poliploides inclosos triploides, tetraploides i pentaploides en embrions de ratolí fecundats in vivo i in vitro.

	<u>% total</u>		<u>% triploides</u>	
	<u>In vivo</u>	<u>In vitro</u>	<u>In vivo</u>	<u>In vitro</u>
<u>Triploides</u>	103 (10.08)	144 (13.94)		
Dispèrnia	56 ( 5.48)	91 ( 8.81)	(54.37)	(63.19)
♂ <sup>2n</sup>	6 ( 0.59)	16 ( 1.55)	( 5.83)	(11.11)
♀ <sup>2n</sup>	24 ( 2.35)	22 ( 2.13)	(23.30)	(15.28)
Incert	17 ( 1.66)	15 ( 1.45)	(16.50)	(10.42)
<u>Tetraploides</u>	2* ( 0.20)	3 ( 0.29)		
♀ <sup>n</sup> + ♂ <sup>2n</sup> + ♂ <sup>n</sup>		2 ( 0.19)		
Trispèrnia		1 ( 0.10)		
Pentaploides	1* ( 0.10)			
* Origen incert				

tant al total d'embrions analitzats com al nombre de triploides.

D'un total de 103 embrions triploides in vivo (10.08%), 56 són dispèrmics representant el 54.37% del total de triploides, essent, per tant, la causa més freqüent de triploidia. El mateix succeeix en els embrions in vitro entre els quals es detecten 144 triploides (13.94%) dels quals 91 (63.19%) són dispèrmics. Hi ha, per tant, un increment clarament significatiu ( $P < 0.005$ ) de les dispèrmies en els embrions fecundats in vitro (8.81%) enfront dels in vivo (5.48%) que comentarem en la discussió.

Quant als espermatozoides diploides se'n troben sis en els embrions obtinguts per fecundació in vivo, és a dir intervenen en un 0.59% de les fecundacions. Per contra estan presents en setze embrions fecundats in vitro (1.73% del total). Això significa que un 5.83% i un 11.11% dels triploides in vivo i in vitro respectivament han estat produïts per un espermatozoide diploide. L'augment dèbilment significatiu ( $P < 0.06$ ) de la freqüència de fecundació per part d'espermatozoides diploides en condicions in vitro que s'han deriva serà discutit més endavant.

Pel que fa als oòcits diploides no hi ha diferències significatives entre els embrions obtinguts in vivo i in vitro, detectant-se en 24 (2.35%) i 22 (2.13%) casos, respectivament, en cada població, es a dir en un 23.30% i 15.28% dels triploides.

Pensem que la relació entre les diferents clàsses de triploides ha d'és ser la mateixa entre els d'origen incert ja que se suposa que la seva aparició és a causa de l'atzar i, per tant, se'n troben el mateix nombre entre els fecundats in vivo (17) i els in vitro (15).

Referint-nos a l'anàlisi dels tetraploides i pentaploides se n'ha detectat un nombre massa baix com per permetre cap comparació entre les dues poblacions. S'observen dos casos de dispèrmia on hi intervé un espermatozoide diploide i una trispèrmia entre els de la sèrie in vitro. La resta de tetraploides i pentaploides, tots ells derivats de la fecundació in vivo, són d'origen incert.

### 3.7.4. Contribució dels pro-nuclis masculins i femenins

A la Taula 4 s'avalua la contribució dels pro-nuclis masculí i femení en la incidència d'anomalies cromosòmiques en ambdues poblacions.

L'anàlisi s'ha efectuat en aquells embrions que presentaven una diferència clara entre els cromosomes d'origen patern i matern que permetés una identificació precisa de l'origen de l'anomalia detectada.

Dels 1.291 embrions fecundats in vivo s'han identificat 840 complements d'origen patern i 850 materns. Per altra banda, dels 1.284 fecundats in vitro s'han estudiat 907 complements masculins i 882 femenins.

Si comparem les dues poblacions, in vivo i in vitro, en cadascun dels dos sexes veiem que no hi ha cap diferència significativa en la incidència d'anomalies llevat del cas de la disminució del nombre d'espermatozoides diploides en la fecundació in vivo a la que ja hem fet esment ( $P < 0.05$ ), la qual serà discutida més endavant.

De la mateixa manera si comparem ambdós sexes en cadascuna de les poblacions, in vivo i in vitro, tampoc no hi ha diferències significatives entre ells llevat del cas que acabem d'esmentar d'una disminució clarament significativa ( $P < 0.005$ ) del nombre d'espermatozoides diploides (6) detectats, enfront dels 24 pro-nuclis femenins diploides observats in vivo. Aquesta diferència en el nombre de gàmetes diploides no es dona in vitro.

Cal esmentar que hi ha una diferència significativa ( $P < 0.05$ ) entre el nombre de complements masculins (10) i el de femenins (2) amb anomalies estructurals in vitro.

És de destacar que la incidència d'aneuploidies és aproximadament la mateixa en ambdós sexes, situant-se al voltant del 2.5% in vitro i al 4% in vivo. Aquestes lleugeres diferències, encara que no significatives, seran comentades a la discussió.

La freqüència total d'anomalies, resultant de la suma de les incidència d'aneuploïdies, diploïdies i anomalies estructurals, és també molt semblant en els dos sexes i en les dues poblacions estudiades, situant-se entre un 5% i un 7% en tots el casos.

TAULA 4.- Contribució dels genomes d'origen patern i matern al total d'anomalies cromosòmiques.

		♂%	♀%
Analitzats	<u>in vivo</u>	840	850
	<u>in vitro</u>	907	882
<u>Aneuploïdia</u>	<u>in vivo</u>	(3.82)	(4.00)
	<u>in vitro</u>	(2.42)	(2.50)
. Hiperploïdia	<u>in vivo</u>	16 (1.91)	17 (2.00)
	<u>in vitro</u>	11 (1.21)	11 (1.25)
Trisomia	<u>in vivo</u>	14 (1.67)	16 (1.88)
	<u>in vitro</u>	9 (0.99)	11 (1.25)
Altres hiperploïdies	<u>in vivo</u>	2 (0.24)	1 (0.12)
	<u>in vitro</u>	2 (0.22)	—
. Hipoploïdia	<u>in vivo</u>	(1.91)	(2.00)
	<u>in vitro</u>	(1.21)	(1.25)
<u>Diploïdes</u>	<u>in vivo</u>	6 (0.71)	24 (2.82)
	<u>in vitro</u>	18 (1.98)	22 (2.49)
<u>Anomalies estructurals</u>	<u>in vivo</u>	5 (0.6)	7 (0.82)
	<u>in vitro</u>	10 (1.10)	2 (0.23)
Total d'anomalies	<u>in vivo</u>	(5.13)	(7.64)
	<u>in vitro</u>	(5.50)	(5.22)

### 3.8. Estudi de mutàgens

#### 3.8.1. Característiques generals

Tal com hem descrit al capítol 2, "Material i Mètodes", s'ha utilitzat com a mutagen la  $\beta$ -Propiolactona en dosis de 2mg/Kg de pes de l'animal, injectades intraperitonealment a diferents temps després de la inducció de la superovulació per acció de l'hormona HCG. Aquests temps han estat: 1.5, 3, 6, 9 i 11 hores i el tipus de fecundació emprat ha depès de criteris pràctics a l'hora de fer cadascun dels experiments, de manera que a 1.5, 3 i 11 hores s'ha emprat la tècnica de la FIV, mentre que a 6 i 9 hores s'han obtingut els embrions in vivo.

S'ha utilitzat un total de 15 femelles i 5 mascles en els experiments in vivo i 39 femelles i 13 mascles en els in vitro, distribuïts de la següent manera: 9 ♀ i 3 ♂ a 1.5 hores, 9 ♀ i 4 ♂ a 3 hores, 9 ♀ i 3 ♂ a les 6 hores, 6 ♀ i 2 ♂ a les 9 hores i 21 ♀ i 6 ♂ a les 11 hores (Taula 5).

D'aquests donants de gàmetes s'han obtingut un total de 794 embrions dels quals se n'analitzaren 715: 109 a les 1.5 hores, 193 a les 3 hores, 71 a les 6 hores, 100 a les 9 hores i 242 a les 11 hores amb una freqüència de fertilització que oscil.lava entre els 72.57% a les 1.5 hores i el 90.08% a les 9 hores (Taula 6).

#### 3.8.2. Anomalies numèriques i estructurals

El tipus i incidència de les anomalies numèriques i estructurals observades entre els embrions obtinguts de femelles tractades amb el mutagen apareixen a la Taula 7. Aquesta Taula té unes característiques idèntiques a la Taula 2, però especificant-hi el temps d'injecció de la  $\beta$ PL.

#### ANEUPLOÏDIES

Es pot observar que la freqüència d'aparició de les hiperploïdies és lleugerament diferent a la dels controls, però aquestes diferències no són significatives.



TAULA 5.- Nombre d'animals emprats en els estudis amb mutàgens.

	1.5	3	6	9	11	Total
♂	3	4	3	2	6	18
♀	9	9	9	6	21	54

TAULA 6.- Característiques generals de la mostra d'embrions obtinguts després del tractament de les femelles amb BPL al cap de diferents temps de la inducció de la superovulació.

	1.5	3	6	9	11	Total
Oòcits fecundats	124	208	82	109	271	794
Embrions analitzats	109	193	71	100	242	715
Freqüència fecundació	(72.57)	(89.66)	(82.00)	(90.08)	(78.32)	

TAULA 7.- Anomalies numèriques i estructurals detectades en l'estudi d'inducció d'anomalies cromosòmiques per acció de la  $\beta$ PPL en cadascun dels temps d'aplicació.

	1.5	3	6	9	11
<u>Aneuploïdies</u>	(11.00)	( 9.33)	( 8.45)	( 4.00)	( 9.10)
. Hiperploïdies	6 ( 5.50)	9 ( 4.66)	3 ( 4.23)	2 ( 2.00)	11 ( 4.55)
Trisomies	6 ( 5.50)	9 ( 4.66)	3 ( 4.23)	2 ( 2.00)	10 ( 4.13)
Altres hiperploïdies	—	—	—	—	1 ( 0.41)
. Hipoploïdies	( 5.50)	( 4.66)	( 4.23)	( 2.00)	( 4.55)
<u>Poliploïdies</u>	10 (9.17)	51 (26.42)	5 ( 7.04)	8 ( 8.00)	44 (18.18)
<u>Anomalies estructurals</u>	1 (0.92)	3 ( 1.55)	—	—	3 ( 1.24)
TOTAL	(21.29)	(37.30)	(15.49)	(12.00)	(32.72)

## POLIPLOÏDIES

S'ha detectat un augment considerable altament significatiu ( $P < 0.001$ ) del nombre de poliploïdies al cap de tres hores: 51 de 193 analitzats (26.42%) enfront del 14.23% del control. La resta de diferències tampoc no son significatives, però cal destacar el lleuger augment al cap d'onze hores (18.18%) per les raons que veurem més endavant.

## ANOMALIES ESTRUCTURALS

Tampoc no es detecta cap diferència significativa en relació amb els controls.

### 3.8.3. Origen de les poliploïdies

Per tal d'esbrinar les causes d'aquest augment de les poliploïdies esmentat s'han agrupat els diferents orígens només de les triploïdies a la Taula 8, ja que no apareixen ni tetraploïdies ni pentaploïdies. La Taula 8 és equivalent a la Taula 3 i en ella es mostren l'origen i la incidència de les triploïdies en relació al total d'embrions estudiats i al total de triploides en cadascun dels temps d'aplicació del mutagen.

La Taula mostra un increment altament significatiu del nombre d'òcits diploides al cap de tres hores ( $P < 0.001$ ), 22 embrions de 193 analitzats (11.40%) al cap d'onze hores ( $P < 0.01$ ), 12 embrions de 242 (4.92%) enfront d'un 2.13% al control. Per altra banda, el fet de no detectar cap més diferència significativa en les dades obtingudes, confirma que sigui aquesta la causa de l'esmentat increment de poliploïdes.

Si comparem els nivells d'aparició d'òcits diploides en ambdós temps es pot veure que la incidència és significativament més elevada ( $P < 0.025$ ) al cap de tres hores que no pas al cap d'onze, la qual cosa podria explicar el fet que no s'observés un augment significatiu de poliploïdies en aquest darrer temps (veure Taula 7).

TAULA 8.- Origen dels triploides en l'estudi del mutagen, referits al total d'embrions i al total de triploides analitzats.

	1.5		3		6		9		11	
	% Tot.	% Trip.	% Tot.	% Trip.	% Tot.	% Trip.	% Tot.	% Trip.	% Tot.	% Trip.
Dispèrmia	4 (3.67)	(40.00)	21 (10.88)	(41.18)	1 (1.41)	(20.00)	3 (3.00)	(37.50)	29 (11.98)	(65.91)
♂2n	5 (4.59)	(50.00)	1 ( 0.52)	( 1.96)	—	—	—	—	1 ( 0.41)	( 2.27)
♀2n	1 (0.92)	(10.00)	22 (11.40)	(43.14)	1 (1.41)	(20.00)	5 (5.00)	(62.50)	12 ( 4.92)	(27.27)
Incert	—	—	7 ( 3.63)	(13.73)	3 (4.23)	(60.00)	—	—	2 ( 0.83)	( 4.55)

#### 3.8.4. Origen de les aneuploïdies

Per tal d'analitzar l'efecte de la **β**PL sobre l'aparició d'aneuploïdies s'ha comparat la incidència d'hiperploïdies en les femelles amb la incidència d'aquesta anomalia en els mascles, els quals, com ja hem dit, presenten una freqüència d'aparició espontània d'aneuploïdies igual a les femelles (veure 3.7.4.) i, a més a més, no han estat tractats amb el mutagen, per la qual cosa poden actuar de control.

La Taula 9 mostra els resultats obtinguts en cadascun dels temps d'aplicació, no havent-se detectat cap increment significatiu en la freqüència d'aparició de les hiperpoliploïdies en les femelles. Aquesta dada serà comentada a la discussió.

#### 3.8.5. Anàlisi en metafase II

Finalment s'ha desenvolupat un experiment encaminat a conèixer si l'acció de la **β**PL injectada immediatament abans de la metafase I (al cap de tres hores impedia l'extrusió del primer corpuscle polar i, per tant, produïa o metafases II amb quaranta cromosomes o oòcits amb dues metafases II (tal com s'obté després d'un cultiu amb citocalasina) (fig. 56).

Els resultats obtinguts es recullen en la Taula 10. Només en dos casos dels 95 analitzats (2.11%) semblava observar-se una metafase II amb quaranta cromosomes però no amb absoluta seguretat (fig. 57) donada la dificultat d'obtenir bones preparacions amb aquest material.

Malgrat tot es detecta una diferència significativa ( $P < 0.02$ ) entre els oòcits amb una possible metafase II amb quaranta cromosomes i el nombre d'embrions triploides amb un complement femení diploide (22 de 193 analitzats) després d'injectar la **β**PL al cap de tres hores de la injecció de HCG. Aquest fet es comentarà a la discussió.

TAULA 9.- Origen de les aneuploïdies en cadascun dels progenitors després del tractament de les femelles amb **B**PL en cadascun dels temps.

	1.5	3	6	9	11
Analitzats					
♂	98	164	43	81	222
♀	95	144	47	84	205
Hiperploïdes					
♂	3 (3.06)	5 (3.05)	1 (2.33)	2 (2.47)	5 (2.25)
♀	2 (2.11)	2 (1.39)	1 (2.13)	—	3 (1.46)

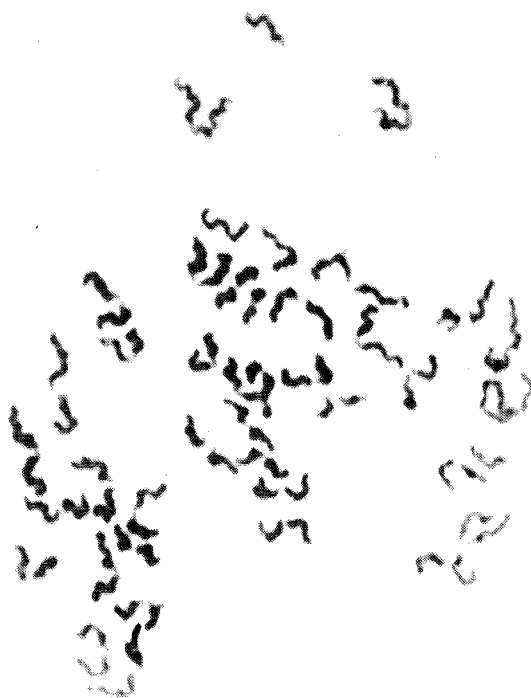


Fig. 56.- Aspecte de la metafase II d'un oòcit de ratolí madurat in vitro en un medi amb citocalasina, droga que impedeix la citoquinesi. S'hi observen quaranta cromosomes donat que la citocalasina ha impedit l'extrusió del primer corpuscle polar. (Foto C. Nogués).

TAULA 10.- Resultats de l'estudi amb oòcits no fecundats (MII) obtinguts de femelles injectades amb **BPL** al cap de tres hores de la inducció de la superovulació.

---

Analitzats	95
Metafase I	1 (1.05)
Metafase II, 20 cromosomes	89 (93.68)
Anomalies estructurals (fragmentació)	3 (3.16)
Metafase II, 40 cromosomes	2 (2.11)

---



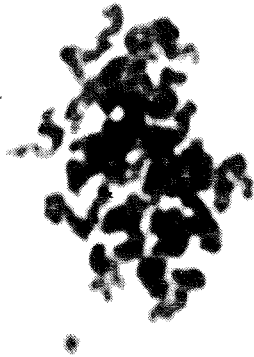


Fig. 57.- Aspecte d'una possible metafase II doble (amb quaranta cromosomes) provocada per la PL. Malgrat la baixa qualitat de la preparació el nombre de cromosomes sembla ser superior a vint, encara que no es pugui afirmar amb absoluta certesa.

#### 4. DISCUSSIÓ

#### 4.1. Dades derivades de les tècniques de fertilització in vitro i cultiu d'embrions

L'adaptació i posada a punt de la tècnica de FIV ha obert un seguit de línies d'investigació sobre la biologia de la reproducció la base de treball de les quals són les tècniques de fertilització, creixement i cultiu d'embrions pre-implantacionals en condicions in vitro.

L'elevada eficiència de fecundació in vitro assolida en relació amb la in vivo (un 99.06%) indica clarament l'eficàcia de la metodologia emprada i alhora abona la validesa dels resultats obtinguts.

Quant a les característiques dels gàmetes obtinguts cal fer certes consideracions:

##### OÒCITS

Ja hem esmentat (veure 3.1.1.) el percentatge lleuregament elevat (un 14.82%) de gàmetes femenins que no eren vàlids per a ser fecundats donades llurs característiques d'immaduresa. Hem apuntat que l'estimulació hormonal per a induir la superovulació, especialment en femelles pre-púbbers, podria menar a l'aparició d'un nombre més elevat d'oòcits no fecundables que farien disminuir la freqüència final de fecundació.

Malgrat aquesta disminució de la fertilitat apareix un efecte compensador quant al nombre total d'oòcits obtinguts mercès a la superovulació que superen molt el nombre que se n'obtidria amb cicles normals d'ovulació.

Cal tenir en compte també la comoditat de poder provocar l'ovulació en el moment desitjat, independentment del cycle estral propi de cada animal, la qual cosa facilita el treball experimental i disminueix la provisió d'animals a emprar.

Alguns dissenys experimentals (Albanese, 1982) utilitzen soques de ratolí que ovulen naturalment un nombre elevat d'oòcits. De tota manera aquestes soques (Alderley Park I, obtingudes a la divisió farmacèutica de la ICI) són normalment difícils d'aconseguir, poc emprades en general, per la qual cosa es dificulten les comparacions amb altres autors, no rendeixen tants oòcits com les tècniques de superovulació i no disminu-

eixen el proveïment d'animals a emprar ja que l'ovulació segueix estant subjecte al cicle propi de cada animal.

#### ESPERMATOZOIDES

Pel que fa als gàmetes masculins, una de les característiques que pot influir més en el resultat de la FIV és, com ja hem vist (2.1.5.3.), la seva concentració.

Si bé aquest paràmetre pot induir l'aparició de poliploïdies, com veurem més endavant, la disminució del nombre d'espermatozoides a nivells fisiològics es tradueix en una disminució dràstica no desitjable de l'eficiència de FIV, la qual es pot evitar si s'empren substàncies estimuladores de la motilitat i supervivència dels espermatozoides (veure 2.1.5.3.). Cal recordar que l'ús d'aquestes substàncies no està gaire estès en els experiments de FIV i que el seu efecte en les característiques genètiques dels embrions és encara desconegut.

Per tant, el fet d'emprar-ne en aquest cas disminuiria la validesa del model que s'utilitza per a assolir els objectius proposats en iniciar-se aquest treball (veure 1.8.).

#### CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE LA PRIMERA DIVISIÓ EMBRIONÀRIA

Ja s'ha esmentat la superioritat de les preparacions obtingudes d'embrions derivats de la FIV enfront dels de la in vivo com a conseqüència de la major sincronia en el procés de la fecundació en condicions in vitro.

L'asincronia del procés in vivo deriva del fet que en una femella la fecundació pot tenir lloc al llarg d'un període de diverses hores ja que l'ovulació pot durar àdhuc dues hores fins que tots els oòcits arribin a l'oviducte on aquesta tindrà lloc. A més a més els diferents mascles no cobreixen les femelles al mateix temps i, per tant, diferents femelles tindran embrions en diferents estadis postfertilització a l'hora de recollir-los.

Altres autors (Fraser i Maudlin, 1979) han coincidit en aquesta apreciació i, per tant, la FIV s'ha emprat preferentment, i sempre que ha estat possible, en l'estudi del mutagen.

## 4.2. Anàlisi citogenètica

### 4.2.1. Característiques generals

#### EFICIÈNCIA DE FERTILITZACIÓ

L'eficiència de fertilització s'ha calculat com el nombre d'òcits fecundats en relació al nombre d'òcits fecundables. No s'ha emprat el nombre total d'òcits ovulats, com seria d'esperar, perquè, com ja hem vist, els processos de manipulació hormonal necessaris per a induir la superovulació provoquen l'aparició d'òcits anòmals que no serien ovulats en altres condicions. Aquest fet seria especialment patent en les femelles pre-púbères (Pedersen, 1972).

Aquesta circumstància fa que la fertilitat disminueixi d'una manera aparent, però a causa d'un paràmetre independent del procés de fecundació, que és el que es tracta d'avaluar, sobretot en el cas de la FIV.

És per aquesta raó que s'han rebutjat els òcits que, d'antuvi, presentaven aspectes de degenerats, atrèsics o immadurs.

#### RENDIMENT D'EMBRIONS ANALITZABLES

S'ha comentat ja el fet que la major sincronia de la FIV es tradueix en un major nombre d'embrions analitzables.

Aquesta circumstància es veu reflectida en el fet que s'analitzaren aproximadament el mateix nombre d'embrions in vitro (1033) procedents de 96 femelles i 48 mascles que in vivo (1022) obtinguts de 104 femelles i 52 mascles (Taula 1).

#### RELACIÓ DE SEXES

Quant a la relació de sexes determinada amb la tècnica de bandes C en ambdues poblacions, i malgrat sigui una mostra petita dels embrions estudiats, és clar que la no desviació del valor teòric 1:1 en cap dels casos fa pensar:

. D'una banda que si es manté in vivo tal com seria d'esperar és que el mètode de detecció i la mida de la mostra són suficientment bons.

. De l'altra, si també es manté in vitro, es presuposa la no existència d'un avantatge selectiu dels espermatozoides portadors d'un o l'altre cromosoma sexual en aquestes condicions. Per tant, si hi hagués diferències en la relació de sexes en el moment del naixement, només podria significar una major resistència a les manipulacions in vitro dels embrions del sexe afavorit.

#### 4.2.2. Aneuploïdies

La incidència d'aneuploïdies ha estat estimada com el doble de la d'hiperploïdies. Es pensa que aquesta mesura del nivell d'aneuploïdies seria apropiada perquè les hipoploïdies observades podrien ser a causa de la pèrdua o encobriment de cromosomes durant la fixació (Golbus, 1981a).

La freqüència total d'hiperploïdies és de 4.21% per als embrions fecundats in vivo i 2.71% per als obtinguts in vitro, la qual cosa implica una freqüència d'aneuploïdies del 8.41% i el 5.42% respectivament.

La major incidència d'hiperploïdies, malgrat que no sigui estadísticament significativa, dels embrions in vivo pot ser a causa de la pitjor qualitat de les preparacions comparades amb les in vitro, les quals són de millor qualitat i, per tant, més fàcilment analitzables i menys susceptibles d'error.

Pel que fa al nivell d'aneuploïdies de mascles i femelles són molt similars tant in vivo (un 3.82% en mascles i un 4.00% en femelles) com in vitro (un 2.42% en mascles i un 2.50% en femelles).

Per tant, la incidència total d'aneuploïdies detectada en els embrions fecundats in vivo (un 8.41%) concorda perfectament amb la suma de les incidències d'aneuploïdia dels mascles i femelles (un 7.82%). El mateix succeeix en la població in vitro on les aneuploïdies representen el 5.42% dels embrions i les contribucions paterna i materna sumades donarien un nivell del 4.92%.

Veiem doncs que, en el nostre sistema, la freqüència d'aneuploïdies no depèn del sexe i no es veu influïda per les tècniques de FIV.

Això comporta dues conseqüències immediates:

. El fet que l'acabament de la metafase II en els oòcits tingui lloc en un ambient in vitro no incrementa el nombre de fenòmens de no disjunció a l'hora de distribuir els cromosomes entre el zigot i el segon corpuscle polar.

Aquest fet és diferent quan es tracta de la metafase I. Tal com demostrà Golbus (1981a) la freqüència d'hiperploïdies s'incrementa pel fet de realitzar la represa de la meiosi i la maduració dels oòcits en condicions in vitro, especialment en les femelles més joves.

. De la mateixa manera sembla no haver-hi cap tipus de selecció en contra d'espermatozoides aneuploides per part del tracte genital femení, ja que el nombre d'ells que fecunda és similar tant in vivo com in vitro. Per tant, en cas que hi hagués diferències morfològiques dels espermatozoides associades a l'aneuploïdia, no serien detectades pel tracte genital femení.

Redi i col. (1984) arriben a aquesta mateixa conclusió a través d'estudis d'aneuploïdia avaluada segons el contingut total de DNA determinat amb la tinció de Feulgen a diferents parts del tracte genital femení.

A l'hora de comparar les dades sobre el nivell d'aneuploïdies que s'han obtingut amb les d'altres autors cal tenir en compte una sèrie de factors que poden influir en la incidència detectada, com són:

#### EDAT DE LES FEMELLES

S'ha descrit en el ratolí un increment del nivell d'aneuploïdies relacionat amb l'augment de l'edat materna (Martin i col., 1976; Bond i Chandley, 1983; Brook i col., 1984) semblant al descrit en humans en relació a la síndrome de Down.

#### TIPUS D'ANIMALS EMPRATS

Si bé no s'han detectat diferències entre diverses soques endogàmiques

en els nivells d'aneuploïdies (Maudlin i Fraser, 1978) sí que sembla existir, en canvi, un increment en els híbrids ( $F_1$ ) resultants dels encreuaments de dues d'aquestes soques (Hansmann i Jenderny, 1983), que presenten nivells d'aneuploïdia superiors a les respectives soques paternes per separat.

#### MÈTODE D'OBTENCIÓ DELS OÒCITS

S'ha pensat en la possibilitat que la superovulació incrementés el nombre d'aneuploïdies dels oòcits obtinguts per ovulació natural. Si bé sembla que això hagi estat descartat (Golbus, 1981a) no ocorre el mateix amb els oòcits obtinguts per maduració in vitro, tal com hem esmentat anteriorment.

Tenint en compte aquestes circumstàncies es poden comparar les freqüències d'aneuploïdia trobades en ambdós sexes amb les detectades per altres autors.

. Quant al nivell d'hiperploïdia detectat en oòcits en metafase I per Hansmann i Jenderny (1983) en ratolins híbrids ( $F_1$ ) i tenint en compte que la majoria de no disjunció es dona en metafase I, els seus valors de 1.52% concorden prou bé amb les nostres estimacions (un 1.25% in vitro i un 2.00% in vivo), així com amb el 2.32% d'aneuploïdies de Golbus (1981a) amb oòcits superovulats (en metafase II) d'animals encruats a l'atzar.

. Pel que fa a la nostra freqüència d'aneuploïdies en mascles (un 2.42% in vitro) concorda amb les dades de Polani i Jagiello (1976) on aquesta se situa en un 2.08% en mascles joves.

. En relació al total d'aneuploïdies en els embrions analitzats, les nostres dades (un 5.42% in vitro i un 8.41% in vivo) són molt similars als controls presentats per Martin-DeLeon i Boice (1982) (un 5.3% d'aneuploïdia).

Contràriament Fraser i Maudlin (1979), en una sèrie preliminar d'experiments similars, detectaren un nivell d'aparició espontània d'aneuploïdies considerablement inferior al nostre, entre un 1.5% in vivo i un 2.4% in



vitro. En general els nivells d'aneuploïdia estimats per la majoria d'autors estan més propers a aquest valor que no pas als que s'han detectat en el nostre experiment (per a revisió veure Bond i Chandley, 1983).

Les causes d'aquestes diferències poden ser tres:

- . La utilització de la inducció de la superovulació en femelles pre-púbères (de 24 a 28 dies) que s'han emprat per a obtenir els oòcits. Cal tenir en compte que la totalitat de dissenys experimentals consultats utilitzen femelles adultes, de dos a quatre mesos d'edat, com a font d'oòcits.

L'increment de la no-disjunció en femelles molt joves ja ha estat apuntat en l'espècie humana, on sembla aparèixer un nombre elevat de trisomies 21 en dones molt joves (de menys de 15 anys ) equivalent al nivell que presenten mares de trenta a trenta-cinc anys (Erickson, 1978).

- . La utilització d'animals híbrids de la  $F_1$  (C57B1/6J x CBA/Ca) com a donants dels gàmetes i embrions, tal com suggeriren Hansmann i Jenderny (1983).

- . La fertilització per espermatozoides fisiològicament envellits, malgrat provenir de mascles joves, a causa d'una inactivitat sexual dels mascles emprats, tal com apunten Boice i Martin-DeLeon (1984), ja que els nostres donants no havien estat mai aparellats amb femelles.

#### 4.2.3. Poliploïdies

La freqüència total de poliploïdes en la nostra sèrie és de 10.37% in vivo i 14.23% in vitro.

En general es considera que són diversos els factors que afecten la producció d'embrions poliploïdes. Aquestes circumstàncies caldrà tenir-les en compte a l'hora de comparar i d'extreure conclusions d'un treball experimental. Entre les causes d'increment del nivell de poliploïdia figuren:

. L'endarreriment en la fecundació (Vickers, 1969; Szöllosi, 1975) que provoca un envelliment gamètic, amb el consegüent deteriorament dels grànuls corticals i el fus acromàtic de l'oòcit, tal com s'ha descrit anteriorment (veure 2.1.5.1.).

. La utilització de gonadotrofines per induir l'ovulació (Takagi i Sasaki, 1976; Maudlin i Fraser, 1977), fonamentalment la PMSG, ja que la HCG sembla no afectar la constitució cromosòmica, almenys dels embrions de conill (Shaver, 1970).

. El genotip dels animals donants dels gàmetes.

Malgrat que s'ha postulat la possibilitat que diferents soques de ratolí presentessin diferents nivells de poliploïdies, els estudis de Maudlin i Fraser (1978) semblen desmentir-ho, si bé detecten diferències individuals importants, sobretot entre els diferents mascles, atribuïbles a origen genètic.

Aquest mateix fet s'ha detectat en la nostra mostra, encara que les desviacions puguin ser atribuïdes a diferències individuals entre femelles, fonamentalment in vitro, com si alguns animals produïssin animals amb una reacció cortical menys efectiva.

. La concentració d'espermatozoides en el lloc de la fecundació, comptant que a major nombre de gàmetes masculins major és la probabilitat de què dos d'ells interaccionin amb l'oòcit simultàniament de manera que evitin els mecanismes de blocatge de la polispermia, i, per tant, la provoquin (veure 1.1.2.1.C.).

#### 4.2.3.1. Triploïdies

La triploïdia és la més freqüent de les poliploïdies, que representa un 10.08% del total in vivo i un 13.94% del total in vitro.

L'anàlisi estadística revela un increment significatiu del nombre de triploides in vitro, l'origen del qual pot ser atribuït a un augment de les dispèrmies i de la fertilització per part d'espermatozoides diploides, mentre que el nivell d'errors en l'extrusió del segon corpuscle po-

lar (òcits diploides) roman inalterat.

## DISPÈRMIA

En els nostres resultats es pot constatar un augment significatiu de la incidència de la dispèrmia com a conseqüència de la FIV (8.81% enfront d'un 5.48% in vivo) tal com va ser apuntat per Fraser i col. (1976) en llur treball inicial on encara es descrivia un nombre no gaire elevat d'embrions.

Fraser i Maudlin (1978) van confirmar la suposició que atribuïa l'origen d'aquest augment a un excés d'espermatozoides en l'ambient que envolta l'òcit en condicions in vitro (correlacionant freqüència de polispèrmia amb concentració d'espermatozoides in vitro), a causa de l'elevada concentració de gàmetes masculins que requereixen aquestes tècniques en comparació amb els nivells fisiològics in vivo.

Per altra banda s'ha detectat un increment del nivell de polispèrmia in vivo en la nostra sèrie (un 5.48%) en relació amb la majoria d'autors consultats, que la situen al voltant del 1% (per a revisió veure Golbus, 1981b). Els nostres resultats semblen indicar que la prevenció de la polispèrmia a causa del nombre baix d'espermatozoides in vivo no seria tan important com ha estat suggerida anteriorment (Wolf, 1981).

Aquest increment no pot ser atribuït a un efecte d'envelliment dels gàmetes en el tracte genital femení (tal com hem descrit anteriorment) ja que els mascles i les femelles eren ajuntats per l'acoplament immediatament després de la inducció de l'ovulació i, per tant, els espermatozoides haurien de trobar-se en l'oviducte en el moment de l'ovulació.

Tal com Jaffe i col. (1983) descriuen, un 17.4% dels òcits de ratolí tenen més d'un espermatozoide en l'espai perivitel·lí, la qual cosa fa pensar que aquest augment relatiu de la polispèrmia in vivo sigui a causa de la disminució de l'efectivitat del mecanisme de blocatge de la polispèrmia a nivell de membrana (veure 1.1.2.1.C.). Una causa d'aquest fet podria ser la inducció de la superovulació en femelles pre-púbères. Malgrat que actualment no hi hagin estudis destinats a comparar la incidència de polispèrmies en femelles d'edat primerenca amb les d'edat

més avançada, un efecte d'aquest tipus no es pot pas descartar d'entrada, ja que de moment no es disposa de cap dada que ho contradigui.

#### ESPERMATOZOIDES DIPLOIDES

Un altre aspecte a comentar és l'increment d'espermatozoides diploides en la FIV (un 1.55% in vitro enfront d'un 0.59% in vivo).

Aquest fet es pot explicar si tenim en compte que els espermatozoides diploides presenten una acusada macrocefàlia. Si suposem que en condicions in vitro no hi ha cap selecció contra els espermatozoides que tenen aquesta anomalia morfològica derivada de llur nucli diploide mentre que el tracte genital femení actuaria eliminant-los, tindrem que in vivo arribaria una proporció molt inferior d'espermatozoides anòmals al lloc de la fecundació.

Aquesta hipòtesi s'adiu amb els resultats obtinguts per Krzanowska (1974), la qual suggereix una selecció d'aquest tipus a nivell de la unió uterotubal. A més a més els nivells d'espermatozoides detectats in vitro de la nostra sèrie (un 1.55%) concorden amb la proporció de macrocefàlics (un 1.6%) descrits per Krzanowska (1974) en mascles joves.

Més recentment Redi i col. (1984) han abonat aquestes suposicions sobre la selecció pre-zigòtica, conclouent que mentre els espermatozoides morfològicament normals arriben sense dificultat a l'oviducte, malgrat continuen una quantitat de DNA anòmala (veure 4.2.2.), els que presenten anomalies morfològiques severes, la macrocefàlia entre elles, són ràpidament eliminats pel tracte genital femení.

Pel que fa als nivells detectats in vivo que indiquen certs errors en la selecció pre-zigòtica exercida pel tracte femení, aquestes dades estan d'acord amb els resultats obtinguts per Martin-DeLeon i Boice (1982) que també detectaren la intervenció d'espermatozoides diploides en la fecundació in vivo.

#### OÒCITS DIPLOIDES

Sembla clar que els fenòmens de no extrusió del segon corpuscle polar que donen lloc a l'aparició dels oòcits diploides no es veuen afavorits per les condicions in vitro.

El nombre d'òcits diploides és el mateix tant in vivo com in vitro, semblant al d'espermatozoides diploides in vitro, però significativament superior al d'espermatozoides diploides in vivo.

Aquesta situació s'explica si suposem que el nivell espontani d'aparició de diploïdia en els gàmetes, tant masculins com femenins, és el mateix però, tal com s'ha vist anteriorment, la selecció en contra dels espermatozoides diploides actuaria només in vivo i els eliminaria del lloc de la fecundació.

Queda clar, doncs, que l'increment del nombre d'espermatozoides diploides in vitro és només aparent ja que és a causa de la disminució real del nombre de gàmetes masculins diploides detectat en la població in vivo.

En general les nostres dades sobre l'origen de les triploïdies contradueixen clarament la hipòtesi de Takagi i Sasaki (1976) feta amb experiments in vivo que suposa que les causes de triploïdia d'origen femení (digínia) superarien en freqüència a les d'origen masculí (diàndria). Pensem que aquesta observació és produïda com a conseqüència de la utilització de la fecundació in vivo per part d'aquests autors, la qual cosa disminuiria el nombre d'espermatozoides diploides detectat per efecte de la selecció a la que ja s'ha fet esment, acompanyada d'una incidència baixa de polispèrmia, però que, malgrat tot, no significaria una major producció de gàmetes diploides del sexe femení en relació al masculí.

#### 4.2.3.2. Tetraploïdies

La freqüència de tetraploides observada en la nostra mostra (un 0.29% in vitro i un 0.20% in vivo) s'acosta al valor donat per Donahue (1972) d'un 0.3%, mentre que esdevé netament inferior a la de Takagi i Sasaki (1976) (un 0.68%).

#### 4.2.3.3. Pentaploïdies

El nostre cas de pentaploïdia d'origen incert és l'únic que s'ha trobat descrit en la bibliografia de fecundació in vivo.

Alguns autors (Witkowska, 1981) han obtingut nivells fins i tot superiors de poliploïdia, però sempre treballant amb FIV i oòcits sense zona pel·lúcida que intervingui prevenint la polispèrmia.

De tota manera la freqüència tan baixa en què s'ha obtingut no permet comparances estadísticament significatives entre ambdues poblacions, in vivo i in vitro.

#### 4.2.4. Anomalies estructurals

El nombre d'anomalies estructurals és molt semblant tant in vivo (un 1.76%) com in vitro (un 1.74%). La majoria són trencaments cromosòmics d'origen desconegut, però també s'hi troben rearmaments en una freqüència més baixa.

Sembla lògic pensar que les condicions in vitro no incideixin d'una manera especial en la fecundació per espermatozoides portadors d'aquest tipus d'anomalies, i si bé el mateix podria succeir amb els oòcits, el fet que hi hagi una disminució apreciable d'oòcits anòmals in vitro podria desmentir-ho. Aquesta disminució es podria explicar si d'alguna manera els oòcits anòmals fossin menys resistents a les condicions in vitro, i, per tant, morissin amb més facilitat abans d'ésser fecundats, però aquesta és una suposició que cal confirmar.

#### 4.2.5. Freqüència total d'anomalies observades

La freqüència total d'anomalies observades, expressada com la suma de les freqüències d'aneuploïdia, poliploïdia i anomalies estructurals en la nostra sèrie és molt semblant en les dues poblacions estudiades (un 20.74% in vivo i un 21.39% in vitro).

Ja s'ha vist com la contribució dels gàmetes a aquest nivell d'anomalies és relativament baixa (al voltant d'un 5% en ambdós sexes)(Taula 4) la qual cosa fa pensar que són en realitat els errors en la fecundació i els processos posteriors que ella desencadena els que fan augmentar el nombre de concepcions anòmales.

En principi caldrà pensar, doncs, que la tècnica de FIV no implica, per si mateixa, un major risc de concepcions cromosòmicament anòmales. Cal tenir en compte, però, que tal com s'ha dit, la distribució de les anomalies sí que depèn del tipus de fecundació emprat.

Encara que se situï aquest risc al voltant del 20% en la concepció, la selecció postzigòtica, abans del naixement, més acusada després de les manipulacions in vitro, pot eliminar la immensa majoria d'embrions anòmals, fins a obtenir la freqüència del 0.1% d'anomalies cromosòmiques entre els humans nascuts per FIV (1 sobre 1.000 casos) que ha estat descrita fins ara.

### 4.3. Comparació amb les estimacions a l'espècie humana

#### 4.3.1. Incidència d'aparició d'anomalies cromosòmiques en ambdues espècies

Ja s'han vist les dificultats que comporta una estimació de la freqüència primària d'aparició d'anomalies cromosòmiques a l'espècie humana (veure 1.4.). De tota manera és interessant de comparar les freqüències d'anomalies obtingudes en el nostre sistema experimental amb les estimacions de què es disposa a l'espècie humana (obtingudes fonamentalment a través d'estudis amb avortaments).

Malgrat tot cal fer constar diverses qüestions a tenir en compte en interpretar les desviacions que sorgeixen entre ambdues espècies.

Per una banda cal recordar que les freqüències d'anomalies cromosòmiques a l'espècie humana només són estimacions del que pot ser la incidència real al moment de la fecundació, i que, per tant, un error en l'apreciació en la taxa d'avortaments espontanis, per exemple, pot implicar variacions importants en les dades finals obtingudes. Per altra banda el model animal presentat és un reflex fidel d'aquesta freqüència primària d'aparició, però tot i així, les condicions del disseny experimental esmentades (veure 2.1.4. i 4.2.) poden influir en els resultats obtinguts.

Cal tenir en compte també que el moment en què es realitza l'estudi és molt important a l'hora d'efectuar avaluacions del nombre d'anomalies observades. Mentre que en el nostre treball es detecten totes les anomalies que sorgeixen al moment de la concepció, ja que els estudis cromosòmics tenen lloc immediatament després que es produeixi, a l'espècie humana no hi ha dades paral·leles i, per tant, s'ha d'estudiar el nombre d'anomalies cromosòmiques en avortaments espontanis que tenen lloc com a culminació d'un procés de selecció dels embrions, el qual fa que mentre que el primer trimestre de gestació s'estima que un 50% dels fetus presenten alteracions cromosòmiques, al segon trimestre aquesta proporció ja ha disminuït al 27% del total (Creasy i col., 1976).



Un altre factor que interessa quan es fan estimacions en l'home és la determinació de la proporció d'avortaments espontanis en relació al total de concepcions. Mentre que alguns autors (Warburton i Fraser, 1964) consideren que es troba al voltant del 15% dels embarassos que es poden reconèixer, dades més recents (Miller i col., 1980) han estimat el nivell d'avortaments espontanis postimplantacionals, mitjançant la detecció precoç de l'embràs amb augments de l'hormona  $\beta$ -HCG, en un 43% del total de concepcions.

Els estudis realitzats en avortaments espontanis postimplantacionals (la primera setmana, abans de la qual no són detectables i abans de la vintena setmana de gestació) han situat la incidència d'anomalies cromosòmiques al moment de l'avortament al voltant del 50%, distribuïdes de la següent manera (per revisió veure Golbus, 1981b; Bond i Chandley, 1983):

	<u>(% del total d'avortaments)</u>
Trisomies autosòmiques:	26%
45, X0:	9%
Trisomies gonosòmiques i monosomies autosòmiques:	1.28%
Triploïdies:	8%
Tetraploïdies:	3%
Anomalies estructurals:	2%
Mosaics	1%
Total:	<u>50.28%</u>

És clar que aquestes dades no tenen en compte tots els avortaments pre-implantacionals els quals poden presentar un percentatge elevat d'anomalies cromosòmiques. Aquests avortaments es donen abans que la mare pugui reconèixer el seu embaràs i, per tant, són impossibles d'analitzar directament.

Sembla ser que una de les anomalies cromosòmiques que indueix l'avortament pre-implantacional amb més freqüència és el grup de les monosomies

autosòmiques. Efectivament, si s'analitzen les dades postimplantacionals anteriors es veu que les trisomies autosòmiques representen un 26% de les causes d'avortament postimplantacional, mentre que les monosomies autosòmiques no arriben a un 1.28%. Aquest fet evidencia que la pèrdua d'un autosoma per part d'un embrió ha d'ésser un esdeveniment altament incompatible amb la seva supervivència i que, per tant, la mort cel·lular i el posterior avortament es donarà en una elevadíssima proporció entre els embrions afectats per aquesta anomalia.

Aquesta suposició és abonada pels treballs de Gropp i col. (1974) utilitzant el model del ratolí, en els quals es descriu la pèrdua dels embrions monosòmics abans de llur implantació.

Si suposem que la majoria de les trisomies són originades pel mecanisme de no-disjunció, mercès al qual la producció d'un trisòmic va acompanyada de l'aparició d'un monosòmic (veure 1.3.2.) la freqüència d'ambdues haurà de ser molt semblant al moment de la concepció, per la qual cosa caldria esperar una incidència de les monosomies entre els avortaments postimplantacionals propera al 25%.

Un cas excepcional és el dels embrions X0 (monosomia del cromosoma X) que semblen ser més comuns del què caldria esperar si fossin a causa exclusivament del mecanisme de la no-disjunció. La monosomia del cromosoma X podria sorgir per un endarreriment del del gonosoma en el fus meiótic o bé, en una de les primeres divisions embrionàries, per la seva exclusió dels nuclis d'ambdues cèl·lules filles (Bond i Chandley, 1983). Aquest comportament del cromosoma X sembla donar-se també en el model del ratolí (Russell i Montgomery, 1974).

Per altra banda, si tenim en compte que els embrions portadors d'una monosomia del tipus Y0 són incompatibles amb la vida cel·lular i que, per tant, es poden incloure en el grup dels monosòmics pels autosomes, i que, com ja hem dit, una part important dels X0 podrien sorgir durant les primeres divisions embrionàries, es pot assumir que la freqüència d'aneuploïdies totals al moment de la concepció assolirà nivells al voltant d'un 21.5% (resultant de suposar la incidència de trisomies i monosomies amb un valor del 25% cadascuna i tenint en compte que els avortaments postimplantacionals representen el 43% de les concepcions).

Quant als poliploides, la relativament elevada proporció (un 11%) que apareix en avortaments ha fet suposar que la seva eliminació es donaria majoritàriament en estadis postimplantacionals, i que, per tant, les estimacions efectuades amb avortaments espontanis coincidirien, a grans trets, amb la incidència primària d'aparició al moment de la concepció.

Pel que fa a les anomalies estructurals es desconeix el seu efecte sobre la supervivència de l'embrió i, per tant, poca cosa es pot dir sobre si són seleccionats majoritàriament en els estadis pre-implantacionals o postimplantacionals.

Tenint en compte aquests factors podem estimar la incidència primària d'anomalies cromosòmiques en la concepció a l'espècie humana propera als valors següents:

	<u>(% del total de concepcions)</u>
Aneuploïdies:	21.5%
Triploïdies:	3.44%
Tetraploïdies:	1.29%
Anomalies estructurals:	0.86%
Total:	<u>27.09%</u>

(Aquestes dades són les que resulten de multiplicar les incidències observades en avortaments postimplantacionals, afegint-hi les estimacions de les monosomies, per un 0.43%, corresponent al 43% de les concepcions que avorten espontàniament).

Per altra banda Mattei i col. (1981) han estudiat entre els nascuts vius l'origen, patern o matern, d'aquestes anomalies arribant a les següents conclusions:

. En l'aneuploïdia el 20% seria d'origen patern, on es donarien els fenòmens de la no-disjunció de la mateixa manera tant en la primera com en la segona divisió meiòtica, mentre que el 80% d'origen femení seria a causa gairebé exclusivament d'errors en la primera divisió meiòtica.

. Quant a les triploïdies, el 47.9% seria a causa de les dispèrmies, el 29.5% a la fecundació per espermatozoides diploides i el 22.6% a la fecundació d'òcits diploides, és a dir, el 77.4% dels triploides seria d'origen masculí.

. Pel que fa a les anomalies estructurals, les reestructuracions de novo que impliquen trencaments i reparacions correspondrien majoritàriament al sexe masculí, a causa probablement de la replicació cromosòmica contínua que es dona al llarg de la vida reproductiva com a conseqüència de la producció continuada d'espermatozoides, mentre que les fusions centríques serien igualment freqüents en ambdós sexes.

Si es comparen totes aquestes dades a l'espècie humana amb les que s'han obtingut en la nostra sèrie, fonamentalment a través de la fecundació in vivo, s'aprecien algunes diferències i coincidències a destacar.

En primer lloc la proporció total de concepcions anòmales en ambdues espècies és lleugerament superior en la humana (un 27.09%) que no pas en el ratolí (un 20.74%), així com la distribució de cadascun dels tipus d'anomalies detectades, que també és lleugerament diferent.

Així mentre que en l'espècie humana predominen les aneuploïdies (un 21.5% enfront d'un 8.41% en ratolí) al nostre model experimental serien les poliploïdies, sobretot in vitro, les anomalies més freqüents (un 14.23% in vitro i un 10.37% in vivo enfront d'un 4.73% en l'espècie humana). En el cas de les anomalies estructurals sembla que les diferències, malgrat existeixin, no són tan importants (un 0.86% en l'home i un 1.75% al ratolí).

Al cas dels humans hi ha un tipus d'anomalia, d'entre totes, que sorgeix de les diferents divisions embrionàries i que, per tant, el nostre disseny experimental és incapaç de detectar.

Quant a l'origen d'aquestes anomalies es dona la mateixa situació. Hi ha una coincidència en la proporció de dispèrmies (un 54.37% dels triploides a la concepció en ratolí in vivo i un 47.9% dels triploides postimplantacionals en l'home) i de fecundació d'òcits diploides (el 23.30% dels triploides del model animal in vivo i el 22.6% dels triploides postimplantacionals a l'espècie humana). Contràriament, mentre que la pro-

ducció d'espermatozoides diploides pot ser que no variï d'una espècie a l'altra (un 1.02% en l'home i un 1.55% en el ratolí in vitro), sembla com si el tracte genital femení en els ratolins fos més efectiu a l'hora d'eliminar espermatozoides anòmals fent que intervinguin en la fecundació en menor proporció (un 5.83% dels triploides in vivo en el ratolí enfront d'un 29.5% en l'espècie humana).

Pel que fa al nivell de tetraploïdia detectat sembla que és molt superior entre els humans (un 1.29%) que no pas els ratolins (un 0.20%).

Si el que s'observa és l'origen, ja sigui patern o matern, de les aneuploïdies es veu que mentre que en el cas del model animal la contribució sembla ser del 50% en ambdós sexes, en el cas humà les estimacions apunten cap a una major incidència en la dona (un 80%) enfront de les d'origen masculí (un 20%). Cal tenir en compte que aquestes dades inclouen el grup de dones amb una edat materna avançada, la qual cosa fa augmentar la incidència d'anomalies detectades.

La utilització de femelles de ratolí molt joves (pre-púbers) en el nostre cas, requeriria una comparació amb una població de dones també joves, però malauradament no es disposa de dades en aquest sentit.

#### 4.3.2. Problemàtica de la fertilització in vitro en humans

Quines seran, doncs, les conclusions extrapolables del nostre model experimental als problemes derivats dels programes de FIV en humans?

Ja s'ha fet esment de que, en principi, la FIV per si mateixa no té cap efecte en el nombre d'anomalies cromosòmiques excepte en el cas de l'increment de les poliploïdies, concretament de l'augment de la incidència de polispèrmies i fertilització per espermatozoides diploides.

En el cas de les polispèrmies s'ha argüït que l'experimentador encarregat de la FIV podria distingir, en la majoria dels casos, la presència de tres pro-nuclis en el zigot i eliminar selectivament els embrions triploides concebuts. Aquesta possibilitat és molt més remota en el cas de la fecundació per part d'un espermatozoide diploide, ja que si bé

provocaria l'aparició d'un pro-nucli teòricament molt més gran que l'altre, això seria difícil d'identificar a la pràctica amb el zigot en cultiu i, per tant, no es podria eliminar selectivament.

Quant a la freqüència d'anomalies cromosòmiques entre els éssers humans fecundats in vitro s'ha apuntat (veure 4.2.5.) que el valor d'un cas de trisomia 21 sobre mil individus (un 0.1%) no té perquè contradir les apreciacions fetes fins ara. Pot ser que la forta pressió selectiva postzigòtica que actuaria sobre els embrions anòmals, reforçada en certa manera després dels tractaments in vitro, n'eliminés la immensa majoria abans del naixement a terme.

Aquesta selecció explicaria, si més no en part, la relativament baixa taxa de naixements que s'obtenen després de l'aplicació de la FIV, malgrat que llur eficiència de fecundació sigui extraordinàriament elevada i molt semblant a la que se suposa que es dona in vivo.

Aquesta disminució en la taxa de naixements respecte el què caldria esperar tenint en compte l'eficiència de fecundació és més a causa del nombre relativament baix d'embrions que s'implanten respecte al total que és transferit que no pas un increment de la taxa d'avortaments espontanis després d'una FIV.

Això fa pensar que és la selecció a nivell pre-implantacional la que actua d'una forma més dràstica disminuint la taxa d'implantació, mentre que el manteniment de la selecció postimplantacional deixa aproximadament igual la taxa d'avortaments espontanis clínicament detectables.

Una altra qüestió a considerar és que les dones integrades en els programes de FIV són, generalment, d'una edat reproductiva avançada i que, per tant, la seva incidència d'avortaments espontanis i de risc d'anomalies cromosòmiques (fonamentalment trisomies) és també superior a la mitjana de la població.

D'altra banda tampoc es disposa de dades sobre els resultats d'anàlisis citogenètiques amb avortaments induïts després de diagnòstics prenatals (amb cultiu de cèl.lules de líquid amniòtic) d'embrions humans fecundats in vitro, ni tan sols si s'han produït aquests avortaments. Seria interessant de contrastar aquestes dades amb les de poblacions control per a treure'n resultats directes indicatius dels efectes d'aquesta tècnica sobre la dotació cromosòmica de l'embrió, però sembla que, ara per ara,

són realment difícils d'obtenir a causa del descrèdit que podrien implicar aquest tipus de resultats.

En definitiva caldrà suposar que l'aplicació de tècniques de FIV a certs problemes d'infertilitat humana no augmentarà el nombre d'anomalies cromosòmiques entre els nascuts vius, mercès a la pressió selectiva exercida contra els embrions anòmals, mentre que l'efecte d'increment de certs tipus d'anomalies que ella comporta es traduirà, simplement, en una disminució en l'eficàcia de la propia tècnica en rendir un nombre inferior d'éssers humans nascuts vius.

#### 4.4. Estudi del mutagen

Els resultats obtinguts amb la utilització de la  $\beta$ P<sub>L</sub> com a mutagen presenten dues vessants en llur interpretació.

Si bé s'ha demostrat clarament el caràcter genotòxic de la  $\beta$ P<sub>L</sub>, reflectit en l'increment d'anomalies cromosòmiques totals provocades per llur administració a les femelles (al voltant d'un 35% amb els embrions tractats i aproximadament un 20% entre els controls), la intensitat de l'efecte ha depès del moment de la injecció de la substància. Així mentre que al cap de tres i d'onze hores de la HCG es detecta clarament l'efecte mutagènic, al cap d'una i mitja, de sis i de nou hores no s'observa cap diferència amb el control.

La coincidència del moment de la injecció "efectiva" amb les metafases I i II de la meiosi femenina afegida a les dades obtingudes dels estudis en la segona metafase meiòtica que mostren que tan sols s'afecta aquesta, han fet que el mecanisme d'acció del mutagen sigui difícil de interpretar.

Malgrat tot es comentaran les desviacions observades en relació a la població control, circumscrites als dos temps d'aplicació "efectiva" del mutagen, al cap de tres i d'onze hores de la inducció de la represa de la meiosi per acció de la HCG.

##### 4.4.1. Aneuploïdies

Ja s'ha dit que no hi ha cap increment en el nombre d'aneuploïdies per efecte del mutagen, tant si comparem la incidència entre els embrions tractats i el control, com si comparem la freqüència d'aparició en cada sexe.

Això és vàlid per a tots els diferents temps d'aplicació de la  $\beta$ P<sub>L</sub> i fa pensar que aquesta substància no induirà l'aparició de fenòmens de no-disjunció en les corresponents anafases meiòtiques.

Aquesta és una dada important a l'hora d'intentar esbrinar un possible mecanisme d'acció de la  $\beta$ P<sub>L</sub> sobre els oòcits de ratolí que veurem més endavant (veure 4.4.4.).



#### 4.4.2. Poliploïdies

S'ha observat un increment en la producció del nombre d'oòcits diploïdes com a resultat de l'aplicació de la  $\beta$ PL, precisament en el moment que coincideixen amb les dues metafases de la divisió meiòtica.

L'aparició d'oòcits diploïdes es produeix com a conseqüència de la no-extrusió d'un corpuscle polar, ja sigui el primer o el segon. Hi ha, però, una dada important extreta dels estudis en metafases II que cal considerar: l'acció de la  $\beta$ PL impedeix l'extrusió del segon corpuscle polar, però no la del primer. Si no fos així, és a dir, si impedís tant l'extrusió del primer com la del segon corpuscle polar, al cap de tres hores de l'aplicació de la  $\beta$ PL apareixerien metafases II amb quaranta cromosomes amb la mateixa proporció que embrions triploïdes a causa de la fecundació d'oòcits diploïdes i això no succeeix (2.11% en metafase II i 11.40% en els tractats al cap de tres hores).

#### 4.4.3. Anomalies estructurals

El nombre d'anomalies estructurals tampoc s'incrementa per la presència de la  $\beta$ PL.

Aquesta substància ha estat descrita com un agent alquilant que provoca anomalies en l'aparellament de bases (veure 2.4.1.2.). i que podria induir l'aparició de trencaments.

Malgrat això no és d'estranyar que no es detecti cap tipus de variació en la incidència d'anomalies estructurals ja que els agents alquilants actuen principalment en la fase S del cicle cel.lular, fase que no es troba entre els temps d'aplicació del mutagen en el disseny experimental en la femella.

#### 4.4.4. Possible mecanisme d'acció

Si s'intenta fer un model d'acció del mutagen sobre els oòcits de les

femelles de ratolí tractades hi ha quatre punts que cal prendre en consideració, de manera que el mecanisme d'acció proposat pugui explicar-los tots.

- . Cal tenir en compte primer de tot que la  $\beta$ P<sub>L</sub> és una substància amb una mitjana de vida d'acció curta en solució a la temperatura corporal d'un mamífer i que, per tant, l'acció genotòxica, sigui quina sigui, s'haurà d'exercir molt poc després del moment de l'aplicació.

- . La  $\beta$ P<sub>L</sub> impedeix l'extrusió del segon corpuscle polar només quan s'aplica immediatament abans de la metafase I i II de la meiosi, però no interfereix l'extrusió del primer corpuscle malgrat que hi sigui present abans de la metafase I.

- . No es detecta cap tipus d'acció a altres temps d'injecció diferents dels esmentats.

- . La  $\beta$ P<sub>L</sub> no incrementa la incidència dels fenòmens de no-disjunció.

Quin podria ser, doncs, el mecanisme que expliqués, d'una banda, aquesta mena d'acció diferida entre l'aplicació del mutagen abans de la metafase I i la interferència en l'extrusió del segon corpuscle polar després de l'anafase II i, de l'altra, l'acció immediata del mutagen quan l'aplicació té lloc abans de la metafase II?

No es pot pensar que sigui una acció retardada del mutagen ja que, com s'ha dit, té una mitjana de vida curta i, a més a més s'hauria d'observar alguna acció, encara que fos lleu, en altres temps d'aplicació.

Tampoc no es pot suposar que l'acció sigui a causa d'un efecte sobre les proteïnes del fus acromàtic perquè en aquest cas també s'afectaria l'extrusió del primer corpuscle polar i s'incrementaria d'alguna manera la freqüència dels fenòmens de no-disjunció (tal com fan les drogues que actuen sobre el fus acromàtic) cosa que, tal com s'ha dit, no succeeix.

Tenint en compte els diferents tipus d'acció del compost sobre les molècules biològiques (veure 2.4.1.2.) es pot postular la següent hipòtesi sobre el tipus d'acció del compost:

Una possibilitat seria que induís la formació de complexos de DNA, prèviament desnaturalitzat, entre cromàtides aparellades en la metafase meiòtica corresponent. O bé, cosa força més factible, que es formessin complexos durables entre les proteïnes centromèriques entre si i entre elles i el DNA.

Aquests complexos podrien correspondre a la unió entre DNA i proteïnes de membrana observades en altres estudis (veure 2.4.1.2.) (cal tenir en compte que, en els cromosomes acrocèntrics com els del ratolí, els centròmers es consideren associats a les proteïnes de la membrana nuclear a causa de la seva proximitat amb els telòmers dels braços curts) (Ashley i Pocock, 1981).

Si aquests complexos fossin prou estables romandrien inalterats després de l'extrusió del primer corpuscle polar fins arribar a l'anafase II, moment en què impedirien la separació de cromàtides i, per tant, l'extrusió del segon corpuscle polar.

D'altra banda la formació d'aquests complexos en el moment en què l'òocit es troba en metafase II també explicaria un comportament idèntic en l'anafase de la segona divisió meiòtica (Fig. 58).

Aquesta és l'única explicació coherent amb totes les dades obtingudes. Seria interessant efectuar altres comparacions per assegurar la validesa del model com podrien ser: l'observació al microscopi electrònic de l'estructura del fus, la comprovació bioquímica de la formació d'aquests complexos entre les proteïnes centromèriques i el DNA etc..., alguns dels quals estem considerant de dur a terme en un futur.

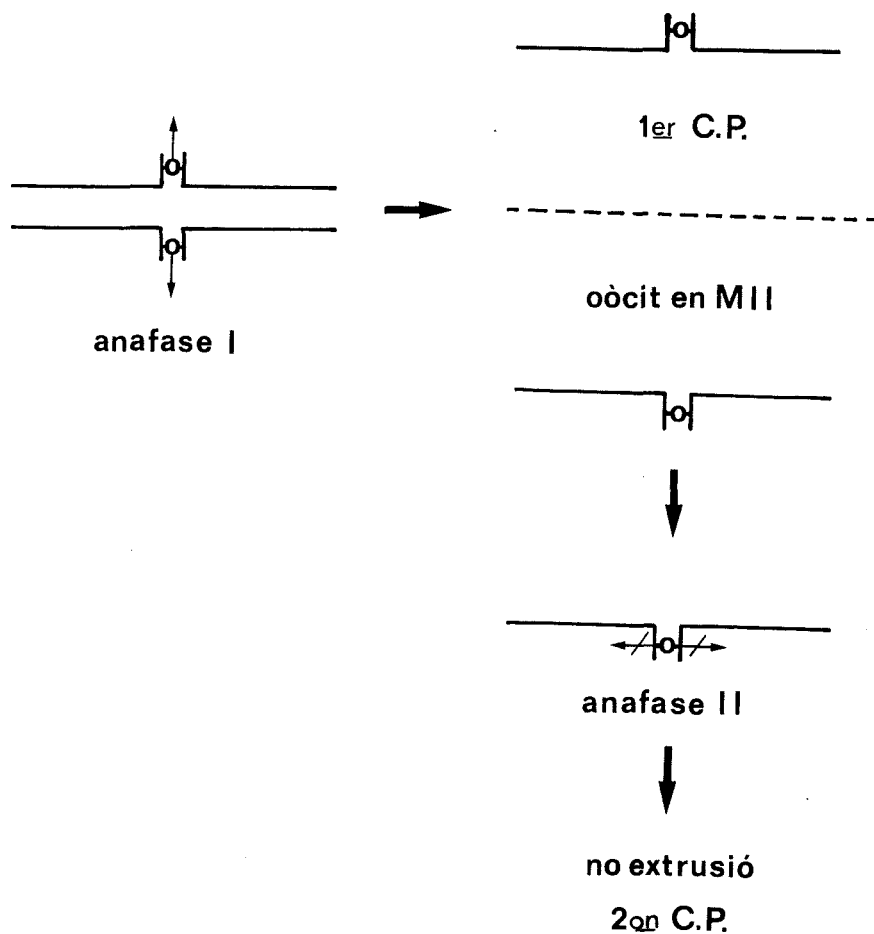


Fig. 58.- Esquema del possible mecanisme d'acció de la  $\beta$ P.L sobre el complement cromosòmic d'un oòcit tractat abans de la metafase I (tres hores) i/o de la metafase II (onze hores), on es postula la formació de complexos entre proteïnes centròmèriques i el DNA cromosòmic.

## 5. CONCLUSIONS

- 5.1. L'eficiència de fertilització in vitro en el nostre sistema és del 99% respecte de la in vivo. Aquest resultat abona la validesa de les dades obtingudes mitjançant aquest mètode de fecundació.
- 5.2. La FIV aporta un nombre més elevat de preparacions de la primera divisió embrionària analitzables; per tant, s'ha emprat preferentment en els casos en què ambdós sistemes eren indistintament utilitzables.
- 5.3. La relació de sexes es manté 1:1 després d'una FIV, del mateix mode que després d'una in vivo. No hi ha, per tant, cap selecció sobre els espermatozoides portadors d'un o l'altre cromosoma sexual.
- 5.4. La freqüència d'aparició d'aneuploïdies en el ratolí és igual en ambdós progenitors.
- 5.5. La incidència d'aneuploïdies al moment de la concepció és independent del tipus de fecundació utilitzada, per la qual cosa no és influida per les tècniques de FIV.
- 5.6. Es detecta un increment dels embrions poliploides entre els fecundats in vitro. L'origen d'aquest augment s'ha atribuït a l'aportació d'un major nombre de dispèrmies i d'un major nombre d'espermatozoides diploides que intervenen en la fecundació.
- 5.7. La incidència d'aparició de gàmetes diploides és equivalent en ambdós sexes, però el nombre d'espermatozoides diploides detectables in vivo és inferior per efecte de la selecció del tracte genital femení que els elimina del lloc de la fecundació.
- 5.8. S'ha confirmat l'existència d'un tipus de selecció pre-zigòtica del tracte genital femení que actua sobre els espermatozoides diploides, eliminant-los. Per altra banda aquesta selecció no detecta els gàmetes portadors dels altres tipus d'anomalies cromosòmiques estudiades.

- 5.9. La incidència d'anomalies estructurals és independent del tipus de fecundació emprada, essent, per tant, molt semblant entre els embrions fecundats in vivo i in vitro.
- 5.10. La freqüència total d'anomalies cromosòmiques estudiades és aproximadament igual tant in vivo com in vitro. La contribució dels gàmetes en la suma total d'anomalies és relativament baixa, mentre que són els errors en el processos lligats o induïts per la pròpia fecundació els que augmenten la incidència observada.
- 5.11. La FIV no incrementa el nombre total d'anomalies cromosòmiques detectades, però canvia la seva distribució i origen augmentant la incidència de dispèrmies i de fecundacions per espermatozoides diploides.

Quant a l'estudi del mutagen  $\beta$ PL podem concloure:

- 5.12. L'acció del mutagen es tradueix en un augment dels complements femenins diploides observats.
- 5.13. L'activitat mutagènica impedeix l'extrusió del segon corpuscle polar quan s'aplica la substància immediatament abans de les metafases I i II, mentre que és pràcticament inoperant en altres moments d'aplicació.
- 5.14. L'efecte genotòxic no interfereix amb l'extrusió del primer corpuscle polar ni augmenta la freqüència d'aneuploidies observades.
- 5.15. Es proposa un possible mecanisme d'acció consistent en la formació de complexos estables entre DNA i proteïnes centromèriques que impediria la separació entre cromàtides a l'anafase II, després de la fecundació, inhibint l'extrusió del segon corpuscle polar.
- 5.16. Els resultats obtinguts evidencien la utilitat del mètode com a complement en les proves de mutagenicitat, ja que una acció d'aquest tipus difícilment pot ser detectada emprant altres tests de mutagenicitat clàssics.

6. BIBLIOGRAFIA



- ACKERMAN S.B., SWANSON R.J., ADAMS P.J., EDWARD WORTHAM J.W. (1983). Comparison of strains and culture media used for mouse in vitro fertilization. *Gamete Research*, 7, 103-109
- ADLER I., GRANT BREWEN J. (1982). Effects of chemicals on chromosome-aberration production in male and female germ cells. de Serres & Hollaender (Eds.). *Chemical Mutagens. Principles and methods for their detection*. 7, pp. 1-35. Plenum Press. New York.
- ALBANESE R. (1982). The use of fertilized mouse eggs in detecting potential clastogens. *Mutat. Res.*, 97, 315-326
- ANDERSON G.B. (1969). Fertilization, Early development, and embryotransfer. Dins: Cole H.H. & Cups P.T. (Eds.). *Reproduction in domestic animals*. pp. 285-314. Academic Press. New York.
- ANGELL R.R., AITKEN R.J., VAN LOOK P.F.A., LUNSDEN M.A. TEMPLETON A.A. (1983). Chromosome abnormalities in human embryos after in vitro fertilization. *Nature*, 303, 336-338
- ASHLEY T., POCOK N. (1981). A proposed model of chromosomal organization in nuclei at fertilization. *Genetica*, 55, 161-169
- BASLER A., BUSELMAIER B., RÖHRBORN G. (1976). Elimination of spontaneous and chemically induced chromosome aberrations in mice during early embryogenesis. *Hum. Genet.*, 33, 121-130
- BAVISTER B.D. (1980). Recent progress in the study of early events in mammalian fertilization. *Develop. Growth and Differ.*, 22, 385-402
- BAVISTER B.D. (1981). Analysis of culture media for in vitro fertilization and criteria for success. Dins: Mastroianni L. & Biggers J.D. (Eds.) *Fertilization and embryonic development in vitro*. pp. 42-63 Plenum Press. New York.

- BEARER E.L., FRIEND D.S. (1982). Modifications of anionic lipid domains preceding membrane fusion in guinea pig sperm. *J. Cell Biol.*, 92, 604-615.
- BEDFORD J.M. (1979). Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis. Dins: Fawcett D.W., Bedford J.M. (Eds.). *The spermatozoon. Maturation, Motility, Surface Properties and Comparative aspects.* pp. 7-21 Urban & Schwarzenberg. Baltimore.
- BEDFORD J.M. (1982). Fertilization. Dins: Austin C.R., Short R.V. (Eds.). *Reproduction in mammals. Vol.2*, 128-163
- BEDFORD J.M. (1983). Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Reprod.*, 28, 108-120
- BELLVÉ A.R., O'BRIEN D.A. (1983). The mammalian spermatozoon: structure and temporal assembly. Dins: Hartmann J.F. (Ed.). *Mechanism and control of animal fertilization.* pp. 55-137 Academic Press. New York.
- BEYLER S.A., ZANEVELD L.J.D. (1982). Inhibition of in vitro fertilization of mouse gametes by proteinase inhibitors. *J. Reprod. Fertil.*, 66, 425-431
- BIGGERS J.D., WHITTEN W.K., WHITTINGHAM D.G. (1971). The culture of mouse embryos in vitro. Freeman W.H. (Ed.). *Methods in Mammalian Embryology.* pp. 86-116, San Francisco.
- BINOR Z., WOLF D.P. (1979). In vitro maturation and penetration of mouse primary oocytes after removal of the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.*, 56, 309-314
- BOICE M.L., MARTIN DELEON P.A. (1984). Sperm aging after sexual rest: contribution to heteroploid. *Am. J. Hum. Genet.*, 36, 865

- BOND D.J., CHANDLEY A.C. (1983). Aneuploidy. Oxford Monographs on Medical Genetics. Vol. 11. Oxford University Press. Oxford.
- BOUÉ J., BOUÉ A., LAZAR P. (1975). The epidemiology of human spontaneous abortions with chromosomal anomalies. Dins: Blandau R.J. (Ed.). Aging Gametes. Their Biology and Pathology. Proceedings of the International Symposium on Aging Gametes. pp. 330-348, Seattle, Wash. S. Karger. Basel.
- BRACKETT B.G. (1981). In vitro culture of the zygote and embryo. Dins: Mastroianni L. & Biggers J.D. (Eds.) pp. 63-82, Plenum Press. New York.
- BRACKETT B., HALL J., OH Y. (1978). In vitro fertilizing ability of testicular, epididymal and ejaculated rabbit spermatozoa. Fertil. Steril., 29, 571-582
- BREWEN J.G. , PAYNE H.S. (1976). Studies on chemically induced dominant lethality. II. Cytogenetic studis of MMS induced dominant lethality in maturing dictyate mouse oocytes. Mutat. Res., 37, 77-82
- BREWEN J.G., PAYNE H.S. (1978). Studies on chemically induced dominant lethality. III. Cytogenetic analysis of TEM-effects on maturing dyctiate mouse oocytes. Mutat. Res., 37, 77-82
- BRINSTER R.L. (1965). Studies on the development of mouse embryos in vitro. IV. Interaction of energy sources. J. Reprod. Fertil., 10, 227
- BROOK J.D., GOSDEN R.G., CHANDLEY A.C. (1984). Maternal ageing and aneuploid embryos- Evidence from the mouse that biological and not chronological age is the important influence. Hum. Genet., 66, 41-45
- BRUSICK D.J. (1977). The genetic properties of beta-propiolactone. Mutat. Res., 39, 241-256
- CHANG M.C., HAMADA A., HUNT D.M. (1971). Fertilization of denuded rabbit eggs in vitro by sperm recovered from the interns or vagina. Nature, 232, 343-344

- CLEGG E.D. (1983). Mechanisms of mammalian sperm capacitation. Dins: Hartmann J.F. Mechanism and control of animal fertilization. pp. 177-212, Academic Press. New York.
- CREASY M.R., CROLLA J.A., ALBERMAN E.D. (1976). A cytogenetic study of human spontaneous abortions using banding techniques. Hum. Genet., 31, 177-196
- DAVIS B.K. (1978). Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. Symposium on the Pharmacological Effects of Lipids: AOCs. pp. 145-158
- DONAHUE R.P. (1972). Cytogenetic analysis of the first cleavage division in mouse embryos. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 74-77
- DRAVLAND E., MEIZEL S. (1981). Stimulation of hamster sperm capacitation and acrosome reaction in vitro by glucose and lactate and inhibition by the glycolytic inhibitor -chlorohydrin. Gamete Research, 4, 515-523
- EDWARDS R.G. (1983). Chromosomal abnormalities in human embryos. Nature, 303, 283
- EHRENBERG L. (1977). Aspects of statistical inference in testing for genetic toxicity. Kilbey B.J. (Ed.) Handbook of Mutagenicity test Procedures. pp. 419-459
- EPSTEIN C.J. (1981). Animal models for autosomal trisomy. Dins: De la Cruz F.F. & Gerald P.S. (Eds.). Trisomy 21 (Down Syndrome). pp. 263-274. University Park Press, Baltimore.
- ERICKSON J.D. (1978). Down syndrome; paternal age, maternal age and birth order. Am. Hum. Genet., 41, 289-298
- FISHBEIN L., FLAMM W.G., FALK H.L. (Eds.) (1970). Chemical mutagens. Environmental effects on biological systems. Academic Press. New York.

FLORMAN H.M., SALING P.M., STOREY B.T. (1982). Fertilization of mouse eggs in vitro. Time resolution of the reactions preceding penetration of the zona pellucida. *J. Androl.*, 3, 373-381

FLORMAN H.M., STOREY B.T. (1982). Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Develop. Biol.*, 91, 121-130

FRASER L.R. (1977). Differing requirements for capacitation in vitro of mouse spermatozoa from two strains. *J. Reprod. Fertil.*, 49, 83-87

FRASER L.R. (1979a). Rate of fertilization in vitro and subsequent nuclear development as a function of the post-ovulatory age of the mouse egg. *J. Reprod. Fertil.*, 55, 153-160

FRASER L.R. (1979b). Accelerated mouse sperm penetration in vitro in presence of caffeine. *J. Reprod. Fertil.*, 57, 377-384

FRASER L.R. (1981). Dibutyryl cyclic AMP decreases capacitation time in vitro in mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 62, 63-72

FRASER L.R. (1982). P-Aminobenzamidine an acrosin inhibitor inhibits mouse sperm penetration of the zona pellucida but not the acrosome reaction. *J. Reprod. Fertil.*, 64, 185-194

FRASER L.R. (1983a). Mouse sperm capacitation assessed by kinetics and morphology of fertilization in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 69, 419-428

FRASER L.R. (1983b). Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability acrosome reaction and hyperactivated motility in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 69, 539-553

FRASER L.R. , DRURY L.M. (1975). The relationship between sperm concentration and fertilization in vitro of mouse eggs. *Biol. Reprod.*, 13, 513-518

- FRASER L.R., DRURY L.M. (1976). Effect of removal of epididymal secretions fertilization in vitro of mouse eggs. *J. Reprod. Fertil.*, 48, 125-128
- FRASER L.R., MAUDLIN I. (1978). Relationship between sperm concentration and the incidence of polyspermy in mouse embryos fertilized in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 52, 103-106
- FRASER L.R., MAUDLIN I. (1979). Analysis fo aneuploidy in first cleavage mouse embryos fertilized in vitro and in vivo. *Environmental Health Perspectives*, 31, 141-149
- FRASER L.R., QUINN P.S. (1981). A glycolytic product is obligatory for initiation of teh sperm acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. *J. Reprod. Fertil.*, 61, 25-35
- FRASER L.R., ZANELLOTTI H.M., PATON G.R., DRURY L.M. (1976). Increased incidence of triploidy in embryos derived from mouse eggs fertilized in vitro. *Nature*, 260, 39-40
- GADDUM-ROSE P., BLANDAU R.J., LANGLEY L., SATO K. (1982). Sperm tail entry into the mouse egg in vitro. *Gamete Research*, 6, 215-223
- GALLIMORE P.A., RICHARDSON C.R. (1973). An improved banding technique exemplified in the karyotype analysis of two strains of rat. *Chromosoma*, 41, 259
- GENEROSO W., CAIN K., KRISHNA M., HUFF, S. (1979). Genetic lesions induced by chemicals in spermatozoa and spermatids of mice are repaired in the egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 435-437
- GOLBUS M.S. (1981a). The influence of strain, maternal age, and method of maturation on mouse oocyte aneuploidy. *Cytogenet. Cell Genet.*, 31, 84-90

GOLBUS M.S. (1981b). Chromosome aberrations and mammalian preproduction. Dins: Mastroianni L. & Biggers J.D. (Eds.). Fertilization and embryonic development in vitro. pp. 258-274, Plenum Press. New York.

GOODPASTURE J.C., REDDY J.M., ZANEVELD L.J.D. (1981). Acrosin, proacrosin inhibitor of guinea pig spermatozoa capacitated and acrosome-reacted in vitro. Biol. Reprod., 25, 44-55

GORDON M., DANDEKAR P.V., EAGER P.R. (1978). Identification of phosphatases on the membranes of guinea pig sperm. Anat. Res., 191, 123-134

GREEN D.P.L. (1978). The mechanism of the acrosome reaction. Dins: Johnson M.H. (Ed.). Development in Mammals. vol. 3, pp. 65-81, North Holland. Amsterdam.

GREEN D.P.L., PURVES R.D. (1984). Mechanical hypothesis of sperm penetration. J. Biophys., 45, 659-662

GROPP A., EPSTEIN G.J. (1982). Value of an animal model for trisomy. Dins: Progress in clinical and biological research. Proc. 6th Int. Congress of Human Genetics, Jerusalem, 13-18 Sept. 1981, Liss. New York.

GROPP A., GIERS D., KOLBUS U. (1974). Trisomy in the fetal backcross progeny of male and female metacentric heterozygotes of the mouse. Cytogenet. Cell Genet., 13, 511-535

GUYTON A.C. (1983). Tratado de Fisiología Médica. 5ª Edición. Interamericana, México.

GWATKIN R.B.L., ANDERSEN O.F., WILLIAMS D.T. (1974). Capacitation of mouse spermatozoa in vitro: involvement of epididymal secretions and cummulus oophorus. J. Reprod. Fertil., 41, 253-256

HANSMANN I. (1979). The use of pre- and post- implantation mammalian embryos to study the cytogenetic effects of mutagens on parental germ cells. Genetics, 92, s139-s142

- HANSMANN I. JENDERNY J. (1983). The genetic basis of non-disjunction: Increased incidence of hyperploidy in oocytes from F<sub>1</sub> hybrid mice. *Hum. Genet.*, 65, 56-60
- HARLOW G.M. QUINN P. (1982). Development of preimplantation mouse embryos in vivo and in vitro. *Aus. J. Biol. Sci.*, 35, 187-193
- HARPER M.J. (1982). Sperm and egg transport. Dins: Austin C.R. & Short R.V. (Eds.). *Reproduction in mammals*. Vol. 2, 102-127
- HARRISON R.A.P. DOTT H.M. FOSTER G.C. (1982). Bovine Serum Albumin, Sperm motility, and the "dilution effect". *J. Exp. Zool.*, 222, 81-88
- HARTMANN J.F. (1983). Mammalian fertilization: Gamete surface interactions in vitro. Dins Hartmann J.F. (Ed.). *Mechanism and control of animal fertilization*. pp. 325-364, Academic Press, New York.
- HEFFNER L.F. STOREY B.T. (1981). The role of calcium in maintaining motility in mouse spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, 218, 427-434
- HOLT W.V. (1980). Surface-bound sialic acid on ram and bull spermatozoa: Deposition during epididymal transit and stability during washing. *Biol. Reprod.*, 23, 847-857
- HOPPE P.C. (1976). Glucose requirement for mouse sperm capacitation in vitro. *Biol. Reprod.*, 15, 39-45
- IGUSA Y. MIYAZAKI S. (1983). Effects of altered extracellular and intracellular calcium concentration on hyperpolarizing responses of the hamster egg. *J. Physiol.*, 340, 611-632
- IMAI H. NIWA K. IRITANI A. (1982). The importance of the presence of metabolizable sugars in a medium for in vitro fertilization of hamster eggs with postovulatory oviduct contents. *Exp. Zool.*, 220, 261-265



IWAMATSU T. CHANG M.C. (1970). Further investigation of capacitation of sperm and fertilization of mouse eggs in vitro. *J. Exp. Zool.*, 175, 271-282

IWAMATSU T. CHANG M.C. (1971). Factors involved in the fertilization of mouse eggs in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 26, 197-208

JAFFE L.A. SHARP A.P. WOLF D.P. (1983). Absence of an electrical polyspermy block in the mouse. *Develop. Biol.*, 96, 317-323

JILEK F. PAVLOK A. (1975). Antibodies against mouse ovaries and their effect on fertilization in vitro and in vivo in the mouse. *J. Reprod. Fertil.*, 42, 377-380

KAJII T. OHAMA K. MIKAMO K. (1978). Anatomic and chromosomal anomalies in 944 induced abortuses. *Hum. Genet.*, 43, 247-258

KALETA E. (1977). Influence of genetic factors on the fertilization of mouse ova in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 51, 375-381

KANE M.T. HEADON D.R. (1980). The role of commercial bovine serum albumin preparations in the culture of one-cell rabbit embryos to blastocysts. *J. Reprod. Fertil.*, 60, 469-475

KRZANOWSKA H. (1974). The passage of abnormal spermatozoa through the interotubal function of the mouse. *J. Reprod. Fertil.*, 38, 81-90

LIEBFRIED M.L. BAVISTER B.D. (1981). The effects of taurine and hypotaurine on in vitro fertilization in the golden hamster. *Gamete Research*, 4, 57-63

MARTIN R.H. (1983). A detailed method for obtaining preparation of human sperm chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 35, 252-256

MARTIN R.H. DILL F.J. MILLER J.R. (1976). Nondisjunction in aging female mice. *Cytogenet. Cell Genet.*, 17, 150-160

MARTIN R.H. LIN C.C. 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-DELEON P.A. BOICE M.L. (1982). Sperm aging in the male and cytogenetic anomalies an animal model. *Hum. Genet.*, 62, 70-77

MATTEI J.F. MATTEI M.G. Ayme S. GIRAUD F. (1981). Contribution of the male to zygotic anomalies. Dins: Spira A., Jouanet P (Eds.). *Facteurs de la fertilité humaine/ Human fertility factors*. pp. 171-182. Les Colloques de l'Inserm.

MAUDLIN I. FRASER L.R. (1977). The effect of PMSG dose on the incidence of chromosomal anomalies in mouse embryos fertilized in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 50, 275-280

MAUDLIN I. FRASER L.R. (1978). The effect of sperm and egg genotype on the incidence of chromosomal anomalies in mouse embryos fertilized in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 52, 107-112

MEIZEL S. (1978). The mammalian sperm acrosome reaction: A biochemical approach. Dins: Johnson M.H. (Ed.). *Development in Mammals*. Vol.3 pp. 1-62, North Holland, Amsterdam.

MILLER J.F. WILLIAMSON E. GLUE J. GORDON Y.B. GRUDZINSKAR J.G. SYKES A. (1980). Fetal loss after implantation. *Lancet*, II, 554-556

MIYAMOTO H. ISHIBASHI T. (1975). The role of calcium ions in fertilization of mouse and rat eggs in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 45, 523-526

MIYAZAKI S. (1983). Periodic hyperpolarizations in fertilized hamster eggs: possible linkage of a Ca influx to intracellular Ca release. Dins: Liss A.R. (Ed.). *The physiology of excitable cells*. pp.219-231, New York.

- MORTON B.E. FRASER C.F. SAGADRACA R. (1979). Inhibition of sperm dilution damage by purified factors from hamster caudal epididymal plasma and by defined diluents. *Fertil. Steril.*, 32, 107-114
- NIWA K. ARAKI M. IRITANT A. (1980). Fertilization in vitro of eggs and first cleavage of embryos in different strains of mice. *Biol. of Reprod.* 22, 1155-1159
- OLIPHANT G. BRACKETT B.G. (1973). Capacitation of mouse spermatozoa in media with elevated ionic strength and reversible decapacitation with epididymal extracts. *Fertil. Steril.*, 24, 948-955
- OLIPHANT G. LUNDEMAN A.E. (1981). Collection of gamete in laboratory animals and preparation of sperm for in vitro fertilization. *Diss: Mastroianni L. & Biggers J.D. Fertilization and embryonic development in vitro.* pp. 11-28, Plenum Press, New York.
- ORGBIN-GRIST M.C. FOURNIER-DELPECH S. (1982). Sperm-Egg interaction: Evidence for maturation changes during epididymal transit. *J. Androl.*, 3, 429-433
- PEDERSEN R.A. GOLDSTEIN L.S. (1979). Detecting mutations expressed during early development of cultured mammalian embryos. *Genetics*, 92, s143-2151
- PEDERSEN T. (1972). Follicle growth in the mouse ovary. *Diss: Biggers J. & Schuetz A.W. (Eds.).* pp. 361-376
- PERREAULT S. ZANEVELD L.J. ROGERS B.J. (1980). Inhibition of fertilization in the hamster by sodium aurothiomalate, a hyaluronidase inhibitor. *J. Repro. Fertil.*, 60, 461-467
- PERREAULT S.D. ZIRKIN B.R. ROGERS B.J. (1982). Effect of trypsin like inhibitors on acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Biol. Reprod.* 26, 343-351

POLANI P.E. JAGIELLO G.M. (1976). Chiasmata, meiotic univalents and age in relationship to aneuploidy imbalance in mice. *Cytogenet. Cell Geent.*, 16, 505-529

QUINN P. HARLOW G.M. (1978). The effect of Oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *J. Exp. Zool.*, 206, 73-80

QUINN P. STANGER J.D. WHITTINGHAM D.G. (1982). Effect of albumin on fertilization of mouse ova in vitro. *Gamete Research*, 6, 305-313

QUINN P. WHITTINGHAM D.G. (1982). Albumin, seminal plasma and mammalian fertilization. Dins: Häfez E.S.E. & Semm K.(Eds) *In vitro fertilization and embryotransfer*. MTP Press Limited (International Medical Publishers) pp. 31-37, Lancaster.

QUINN P. WHITTINGHAM D.G. (1982). Effect of fatty acids on fertilization and development of mouse embryos in vitro. *J. Androl.*, 3, 440-445

REDI C.A. GARAGNA S. PELLICIARI C. MANFREDI ROMANINI M.G. CAPANNA E. WINKING H. GROPP A. (1984). Spermatozoa of chromosomally Heterozygous mice and their fate in male and female genital tracts. *Gamete Research*. 9, 273-286

ROGERS B.J. (1978). Mammalian sperm capacitation and fertilization in vitro: A critique of methodology. *Gamete Research*, 1, 165-223

ROGERS B.J. (1981). Factors affecting mammalian in vitro fertilization. Dins: Jagiello G & Vogel H.J. *Bioregulators of reproduction*. Biomedical Sciences Symposia Serie. pp. 459-487, Academic Press, New York.

ROGERS B.J. UENO M. YANAGIMACHI R. (1981). Fertilization by guinea pig spermatozoa requires potassium ions. *Biol. Reprod.*, 25, 639-648

ROGERS J. CHANG L. YANAGIMACHI R. (1979). Glucose effect on respiration: Possible mechanism for capacitation in guinea pig spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, 207, 107-112

- RÖHRBORN G. HANSMANN I. (1971). Induced chromosome aberrations in infertilized oocytes of mice. *Humangenetik*, 13, 184-188
- RÖHRBORN G. HANSMANN I. BUCKEL U. (1977). Cytogenetic analysis of pre- and postovulatory oocytes and pre-implantation embryos in mutagenesis of mammals. Dins: Kilbey B.J. (Ed.). *Handbook Mutagenicity test Procedures*. pp. 301-310
- RUDAK E. (1981). Interespecific fertilization. Dins Jagiello G & Vogel H. *Bioregulators of reproduction. Biomedical Sciences Symposia*. pp. 167-186 Academic Press, New York.
- RUDAK E. JACOBS P.A. YANAGIMACHI R. (1978). Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature*, 274, 911-913
- RUSSELL L.B. MONTGOMERY C.S. (1974). The incidence of sex-chromosome anomalies following irradiation of mouse spermatogonia with single or fractionated doses of X-rays. *Mut. Res.* , 25, 367-376
- SALING P.M. O'RAND M.G. (1982). Anti-mouse sperm antiserum. Fertility Inhibition in vitro and preliminary antigen identification. *J. Androl.*, 3, 434-439
- SATO K. BLANDAU R.J. (1979). Second meiotic division and polar body formation in mouse eggs fertilized in vitro. *Gamete Research*, 2, 283-293
- SERRES C. KANN M.L. (1984). Motility induction in hamster spermatozoa from caput epididymidis: effects of forward motility protein (FMP) and calmodulin inhibitor. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 24, 81-94
- SHALGI R. DEKEL N. KRAICER P.F. (1979). The effect of LH on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 55, 429-435
- SHAVER E.L. (1970). The chromosome complement of blastocysts from rabbits injected with various doses of HCG before ovulation. *J. Reprod. Fertil.*, 23, 335-337

SIDDIQUEY A.K.S. COHEN J. (1982). In vitro fertilization in the mouse and the relevance of different sperm/egg concentrations and volumes. *J. Reprod. Fertil.*, 66, 237-242

SNEDECOR G.W. (1970). *Metodos estadísticos. Aplicados a la investigación agrícolica y biológica.* CECSA. Mexico.

STANGER J.D. (1983). The effect of catecholamines and their antagonists on the fertilization of cummulus-free mouse ova in vitro at a suboptimal spermatozoa density. *Gamete Research.*, 7, 111-122

STANGER J.D. QUINN P. (1982). Fertilization of cummulus-free, zona intact mouse ova in vitro at high and low sperm concentrations. *Gamete Research*, 5, 61-70

SUMNER A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatic. *Exp. Cell Res.*, 75, 304

SZÖLLOSI D. (1975). Mammalian eggs aging in the fallopian tubes. *Dins: Blandau R.J. (Ed.). Aging Gametes. Their Biology and Pathology. Proceedings of the International Symposium on Aging Gametes.* pp. 98-121, Seattle, Wash.S. Karger. Basel.

TAKAGI N. SASAKI M. (1976). Digynic triploidy after superovulation in mice. *Nature*, 264, 278-281

TANAKA N. (1981). Studies on chemical induction of chromosomal aberrations in postcopulation germ cells and zygotes of female mice. I Comparative studies on the frequency of first-cleavage chromosomal aberrations and dominant-lethal mutations. *Jpu. J. Genet.*, 56, 117-129

TANAKA N. KATOH M. IWAHARA S. (1981). Formation of chromosome-type aberrations at the first cleavage after MMS treatment in late spermatozoa of mice. *Cytogenet. Cell Genet.*, 31, 145-152

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

TASH J.S. MEANS A.R. (1982). Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biol. Reprod.*, 26, 745-763

TAYMOR M. SEIBEL M. SMITH D. LEVESQUE L. BORTEN M. (1982). Radioimmunoassay for LH: use of a rapid LH assay for oocyte harvest. Dins: Hafez & Semm (Eds.). *In vitro fertilization and embryotransfer*. MTP Press Limited (International Medical Publishers. pp. 161-171, Lancaster.

TEASE C. (1982). Similar dose-related chromosome non-disjunction in young and old female mice after X-irradiation. *Mutation Research*, 95, 287-296

TEMPLADO C. MARINA S. EGOZCUE J. (1976). Three cases of low chiasma frequency associated with infertility in man. *Andrologia*, 8, 285-289

TEMPLADO C. MARINA S. SUAREZ CANAL F. GIL VERNET E. IZQUIERDO L. EGOZCUE J. (1978). Four cases of low chiasma frequency diagnosed in semen. *Intern. J. Androl.*, 1, 153-161

THADANI V.M. (1982). Mice produced from eggs fertilized in vitro at a very low sperm: egg ratio. *J. Exp. Zool.*, 219, 277-283

TSUNODA Y. (1977). Inhibitory effect of anti-mouse egg serum on fertilization in vitro and in vivo in the mouse. *J. Reprod. Fertil.*, 50, 353-355

TSUNODA Y. CHANG M.C. (1975a). In vitro fertilization of rat and mouse eggs by ejaculated sperm and the effect of energy sources on in vitro fertilization of rat eggs. *J. Exp. Zool.*, 193, 79-86

TSUNODA Y. CHANG M.C. (1975). Penetration of mouse eggs in vitro: Optimal sperm concentration and minimal number of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 44, 139-142

TSUNODA Y. SONA T. SUGIE T. (1982). Inhibition of fertilization by zona pellucida antibody. Dins: Hafez E.S.E. & Semm K. (Eds.) *In vitro fertilization and embryo transfer*. MTP Press Limited (International Medical Publishers) pp. 117-129, Lancaster.

USSELMAN M.C. CONE R.A. (1983). Rat sperm mechanically immobilized in the caudal epididymis by "immobilin" a high molecular weight glycoprotein. *Biol. Reprod.*, 29, 1241-1250

VAIDYA R.A. GLASS R.H. DANDEKAR P. JOHNSON K. (1971). Decrease in the electrophoretic mobility of rabbit spermatozoa following intrauterine incubation. *J. Reprod. Fertil.*, 24, 299-301

VICKERS A.D. (1969). Delayed fertilization and chromosomal anomalies in mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 20, 69-76

VIDAL F. TEMPLADO C. NAVARRO J. MARINA S. EGOZCUE J. (1982). Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile male. *Human Genet.*, 60, 301-304

WARBURTON D. FRASER F.C. (1964). Spontaneous abortion risks in man: data from reproductive histories collected in a Medical Genetics Unit. *Am. J. Hum. Genet.*, 16, 1-27

WHITTINGHAM D.G. (1971). Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl. 14, 7-21

WITKOUSKA A. (1981). Pronuclear development and the first cleavage division in Polyspermic mouse eggs. *J. Reprod. Fertil.*, 62, 493-498



WOLF D.P. (1981). The mammalian egg's block to polyspermy. Dins: Mastroianni L. & Biggers J.D. (Eds.). Fertilization and embryonic development in vitro. pp. 185-201, Plenum Press, New York.

WOLF D.P. HAMADA M. Age-dependent losses in the penetrability of mouse eggs. J. Reprod. Fertil., 48, 213-214

YANAGIMACHI R. (1981). Mechanisms of fertilization in mammals. Dins: Mastroianni L. & Biggers J.D. (Eds.). Fertilization and embryonic development in vitro. pp. 82-185, Plenum Press, New York.

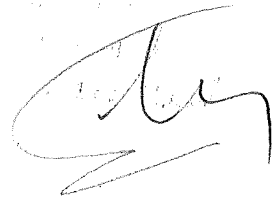
YANAGIMACHI R. PHILLIPS D.M. (1984). The status of acrosomal caps of hamster spermatozoa immediately before fertilization in vivo. Gamete Research, 9, 1-19

YU S.F. WOLF D.P. (1981). Polyspermic mouse eggs can dispose of supernumerary sperm. Develop. Biol., 82, 203-210

ZACKOWSKI J.L. MARTIN-DELEON P.A. (1984). The effect of post-ovulatory oocyte aging on chromosome anomalies in mouse oocytes fertilized in vitro. Am. J. Hum. Genet., 36, 119S

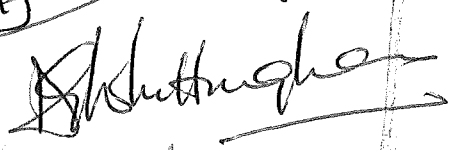
UNIVERSITAT DE BARCELONA

19 de Juliol  
1985



Vocant

~~Jr. Clupal~~  
J. Clupal



com a ...  
'curm lende'